



УКРАЇНА

(19) UA (11) 94464 (13) C2

(51) МПК (2011.01)  
C07K 16/18 (2006.01)  
C12N 15/13 (2006.01)  
C12P 21/08 (2006.01)  
A61K 39/395 (2006.01)  
A61P 35/00  
G01N 33/577 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ВИДІЛЕНЕ АНТИТІЛО ДО DLL4 ТА ЙОГО ЗАСТОСУВАННЯ

1

2

(21) а200900120  
(22) 06.06.2007  
(24) 10.05.2011  
(86) PCT/US2007/070513, 06.06.2007  
(31) 60/811,357  
(32) 06.06.2006  
(33) US  
(31) 60/866,767  
(32) 21.11.2006  
(33) US  
(31) 60/866,772  
(32) 21.11.2006  
(33) US  
(31) 60/811,349  
(32) 06.06.2006  
(33) US  
(46) 10.05.2011, Бюл.№ 9, 2011 р.  
(72) ЯНЬ МІНХОНГ, US, ВУ ЯН, US  
(73) ДЖЕНЕНТЕК, ІНК., US  
(56) WO A 2005012359, 10.02.2005.  
US 2006134121, 22.06.2006.  
WO A 2007028110, 08.03.2007.  
WO 2007070671, 21.06.2007.  
LIU ZHAO-JUN ET AL: "Inhibition of endothelial cell proliferation by Notch1 signaling is mediated by repressing MAPK and PI3K/Akt pathways and requires MAML1." THE FASEB JOURNAL: OFFICIAL PUBLICATION OF THE FEDERATION OF AMERICAN SOCIETIES FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY MAY 2006, vol. 20, no. 7, May 2006 (2006-05), pages 1009-1011, XP002491745 ISSN: 1530-6860.  
PATEL NILAY S ET AL: "Up-regulation of delta-like 4 ligand in human tumor vasculature and the role of basal expression in endothelial cell function" CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, US, vol. 65, no. 19, October 2005 (2005-10), pages 8690-8697, XP002452160 ISSN: 0008-5472.  
HOLT L J ET AL: "Domain antibodies: proteins for therapy" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 21, no. 11, 1

November 2003 (2003-11-01), pages 484-490, XP004467495 ISSN: 0167-7799.  
DAVIES J ET AL: "Affinity improvement of single antibody VH domains: residues in all three hypervariable regions affect antigen binding" IMMUNOTECHNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV, NL, vol. 2, no. 3, 1 September 1996 (1996-09-01), pages 169-179, XP004070292 ISSN: 1380-2933.  
REHMAN AASIA O ET AL: "Notch signaling in the regulation of tumor angiogenesis" TRENDS IN CELL BIOLOGY, vol. 16, no. 6, May 2006 (2006-05), pages 293-300, XP002457721 ISSN: 0962-8924.  
WILLIAMS CASSIN KIMMEL ET AL: "Up-regulation of the Notch ligand Delta-like 4 inhibits VEGF-induced endothelial cell function" BLOOD, vol. 107, no. 3, February 2006 (2006-02), pages 931-939, XP002457722 ISSN: 0006-4971.  
NOGUERA IRENE ET AL: "Delta-like ligand 4 (Dll4) is critical for tumor growth and angiogenesis." PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH ANNUAL MEETING, vol. 47, April 2006 (2006-04), page 1342, XP001537721 & 97TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-ASSOCIATION-FOR-CANCER-RESEARCH (AACR); WASHINGTON, DC, USA; APRIL 01 -05, 2006 ISSN: 0197-016X (ABSTRACT).  
LIU ZHAO-JUN ET AL: "REGULATION OF NOTCH1 AND DLL4 BY VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR IN ARTERIAL ENDOTHELIAL CELLS: IMPLICATIONS FOR MODULATING ARTERIOGENESIS AND ANGIOGENESIS" MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, US, vol. 23, no. 1, 1 January 2003 (2003-01-01), pages 14-25, XP009083465 ISSN: 0270-7306.  
DORSCH MARION ET AL: "Ectopic expression of Delta4 impairs hematopoietic development and leads to lymphoproliferative disease" BLOOD 15 SEP 2002,, vol. 100, no. 6, 15 September 2002 (2002-09-15), pages 2046-2055, XP002484537.

(13) C2  
(11) 94464  
(19) UA

RIDGWAY JOHN ET AL: "Inhibition of Dll4 signalling inhibits tumour growth by deregulating angiogenesis" NATURE (LONDON), vol. 444, no. 7122, December 2006 (2006-12), pages 1083-1087, XP002457725 ISSN: 0028-0836 (ABSTRACT).

NOGUERA-TROISE IRENE ET AL: "Blockade of Dll4 inhibits tumour growth by promoting non-productive angiogenesis" NATURE (LONDON), vol. 444, no. 7122, December 2006 (2006-12), pages 1032-1037, XP002457724 ISSN: 0028-0836 (ABSTRACT).

LOBOV I B ET AL: "Delta-like ligand 4 (Dll4) is induced by VEGF as a negative regulator of angiogenic sprouting" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, vol. 104, no. 9, February 2007 (2007-02), pages 3219-3224, XP002457726 ISSN: 0027-8424.

SAINSON R C A ET AL: "Anti-Dll4 therapy: can we block tumour growth by increasing angiogenesis?" TRENDS IN MOLECULAR MEDICINE 2007 UNITED KINGDOM, vol. 13, no. 9, 2007, pages 389-395, XP002457727 ISSN: 1471-4914.

THURSTON G ET AL: "The Delta paradox: DLL4 blockade leads to more tumour vessels but less tumour growth" NATURE REVIEWS CANCER 2007 UNITED KINGDOM, vol. 7, no. 5, 2007, pages 327-331, XP002457728 ISSN: 1474-175X 1474-1768 (ABSTRACT).

**(57)** 1. Виділене анти-DLL4-антитіло, яке містить (а) щонайменше одну, дві, три, чотири або п'ять послідовностей гіперваріабельних областей (HVR), вибраних із групи, яка складається з:

(i) HVR-L1, що містить послідовність A1-A11, де A1-A11 являє собою RASQDVSTAVA (SEQ ID NO:10);

(ii) HVR-L2, що містить послідовність B1-B7, де B1-B7 являє собою SASFLYS (SEQ ID NO:11);

(iii) HVR-L3, що містить послідовність C1-C9, де C1-C9 являє собою QQSYTGTVT (SEQ ID NO: 18);

(iv) HVR-H1, що містить послідовність D1-D10, де D1-D10 являє собою GFTFTDNWIS (SEQ ID NO:1);

(v) HVR-H2, що містить послідовність E1-E18, де E1-E18 являє собою GYISPNSGFTYYADSYKG (SEQ ID NO:8) і

(vi) HVR-H3, що містить послідовність F1-F15, де F1-F15 являє собою VYYCARDNFGGYFDY (SEQ ID NO:9); і

(b) щонайменше один варіант HVR, де вказаний варіант послідовності HVR має модифікацію щонайменше одного залишку послідовності, представлена в SEQ ID NO:1-18.

2. Виділене анти-DLL4-антитіло, яке містить

(а) щонайменше одну, дві, три, чотири або п'ять послідовностей гіперваріабельних областей (HVR), вибраних із групи, яка складається з:

(i) HVR-L1, що містить послідовність A1-A11, де A1-A11 являє собою RASQDVSTAVA (SEQ ID NO:10);

(ii) HVR-L2, що містить послідовність B1-B7, де B1-B7 являє собою SASFLYS (SEQ ID NO:11);

(iii) HVR-L3, що містить послідовність C1-C9, де C1-C9 являє собою QQSYNGPST (SEQ ID NO:15);

(iv) HVR-H1, що містить послідовність D1-D10, де D1-D10 являє собою GFTFTDNWIS (SEQ ID NO:1);

(v) HVR-H2, що містить послідовність E1-E18, де E1-E18 являє собою GVINPNSGATEYADSVKG (SEQ ID NO:5); і

(vi) HVR-H3, що містить послідовність F1-F15, де F1-F15 являє собою VYYCARDNFGGYFDY (SEQ ID NO:9); і

(b) щонайменше один варіант HVR, де вказаний варіант послідовності HVR має модифікацію щонайменше одного залишку послідовності, представлена в SEQ ID NO:1-18.

3. Антитіло за п. 1 або 2, де варіант HVR-L3 містить 1-6 (1, 2, 3, 4, 5 або 6) замін у будь-якій комбінації з нижченаведених положень: 91 (S або W), 92 (Y або F), 93 (T, N або S), 94 (T або G), 95 (P, Q, A або T) і/або 96 (P, S, A або V).

4. Антитіло за п. 1 або 2, де варіант HVR-H2 містить 1-4 (1, 2, 3 або 4) заміни в будь-якій комбінації з наступних положень: 50 (V, L або Y), 52 (N або S), 52a (P або S) або 53 (N, Q, T або I).

5. Виділене анти-DLL4-антитіло, що містить одну, дві, три, чотири, п'ять або шість HVR, де кожна HVR містить, складається або по суті складається з послідовності, вибраної із групи, яка складається з SEQ ID NO:1-18, і де SEQ ID NO:10 відповідає HVR-L1, SEQ ID NO:11 відповідає HVR-L2, SEQ ID NO:12, 13, 14, 15, 16, 17 або 18 відповідає HVR-L3, SEQ ID NO:1 або 2 відповідає HVR-H1, SEQ ID NO:3, 4, 5, 6, 7 або 8 відповідає HVR-H2 і SEQ ID NO:9 відповідає HVR-H3.

6. Антитіло за п. 5, що містить HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, де кожна із цих областей містить, відповідно, SEQ ID NO:10, 11, 14, 2, 3 і 9.

7. Антитіло за п. 5, що містить HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, де кожна із цих областей містить, відповідно, SEQ ID NO:10, 11, 15, 1, 5 і 9.

8. Антитіло за п. 5, що містить HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, де кожна із цих областей містить, відповідно, SEQ ID NO:10, 11, 16, 1, 6 і 9.

9. Антитіло за п. 5, що містить HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, де кожна із цих областей містить, відповідно, SEQ ID NO:10, 11, 17, 1, 7 і 9.

10. Антитіло за п. 5, що містить HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, де кожна із цих областей містить, відповідно, SEQ ID NO:10, 11, 18, 1, 8 і 9.

11. Антитіло за будь-яким із пп. 1-10, де щонайменше частина каркасної послідовності являє собою консенсусну людську каркасну послідовність.

12. Антитіло за п. 1 або 2, де вказаною модифікацією є заміна, інсерція або делеція.

13. Антитіло за будь-яким із пп. 1-12, що містить людську консенсусну каркасну послідовність підгрупи каппа.

14. Антитіло за будь-яким із пп. 1-12, що містить людську консенсусну каркасну послідовність важкого ланцюга підгрупи III.

15. Антитіло за п. 14, де вказане антитіло має заміну в одному або декількох з положень 71, 73 і 78.

16. Антитіло за п. 15, де вказана заміна присутня в одному або декількох з положень R71A, N73T і N78A.

17. Полінуклеотид, що кодує антитіло за будь-яким із пп. 1-16.
18. Вектор, що містить полінуклеотид за п. 17.
19. Вектор за п. 18, який є експресуючим вектором.
20. Клітина-хазяїн, що містить вектор за п. 18 або 19.
21. Клітина-хазяїн за п. 20, що є прокаріотичною клітиною.
22. Клітина-хазяїн за п. 20, що є еукаріотичною клітиною.
23. Клітина-хазяїн за п. 20, що є клітиною ссавця.
24. Спосіб одержання анти-DLL4-антитіла, який передбачає (а) експресію вектора за п. 19 у прийнятній клітині-хазяїні й (b) виділення вказаного антитіла.
25. Спосіб одержання імунокон'югата, що містить анти-DLL4-антитіло, що передбачає (а) експресію вектора за п. 19 у прийнятній клітині-хазяїні й (b) виділення вказаного антитіла.
26. Спосіб за п. 24 або 25, де вказаною клітиною-хазяїном є прокаріотична клітина.
27. Спосіб за п. 24 або 25, де вказаною клітиною-хазяїном є еукаріотична клітина.
28. Спосіб детектування DLL4, що включає в себе детектування комплексу "DLL4-анти-DLL4-антитіло" у біологічному зразку.
29. Спосіб діагностики розладу, асоційованого з експресією DLL4, що передбачає детектування комплексу "DLL4-анти-DLL4-антитіло" у біологічному зразку, отриманому в пацієнта, що страждає на вказаний розлад, або в пацієнта з підозрою на такий розлад.
30. Спосіб за будь-яким із пп. 28-29, де вказане анти-DLL4-антитіло є детектовано міченим.
31. Композиція, що містить анти-DLL4-антитіло за будь-яким із пп. 1-16.
32. Композиція, що містить полінуклеотид за будь-яким із пп. 17-19.

33. Композиція за п. 31 або 32, що додатково містить носій.
34. Спосіб лікування пухлини, раку або розладу клітинної проліферації, що передбачає введення ефективної кількості антитіла за будь-яким із пп. 1-16 індивідууму, який потребує такого лікування, відповідно до чого пухлина, рак або розлад клітинної проліферації виліковують.
35. Спосіб за п. 34, де вказаним пухлинним, раковим або клітинно-проліферативним захворюванням є рак товстої кишки, рак легенів або рак молочної залози.
36. Спосіб за п. 34 або 35, що додатково передбачає введення ефективної кількості антиангіогенного засобу.
37. Спосіб за п. 36, де вказаним антиангіогенним засобом є антагоніст фактора росту судинного ендотелію (VEGF).
38. Спосіб за п. 37, де вказаним антагоністом VEGF є анти-VEGF-антитіло.
39. Спосіб за п. 38, де вказаним анти-VEGF-антитілом є бевацизумаб.
40. Спосіб за будь-яким із пп. 34-39, що додатково передбачає введення ефективної кількості хімотерапевтичного засобу.
41. Спосіб підвищення ефективності антиангіогенного засобу в індивідуума, що страждає на патологічний стан, асоційований з ангіогенезом, що передбачає введення індивідууму, крім антиангіогенного засобу, ефективної кількості антитіла за будь-яким із пп. 1-16, і тим самим підвищення ефективності вказаного антиангіогенного засобу.
42. Спосіб за п. 41, де вказаний патологічний стан, асоційований з ангіогенезом, являє собою пухлину, рак і/або розлад клітинної проліферації.
43. Спосіб за п. 41, де вказаним патологічним станом, асоційованим з ангіогенезом, є внутрішньоочне неоваскулярне захворювання.

В загальних рисах, даний винахід належить до галузі молекулярної біології. Більш конкретно, даний винахід належить до анти-DLL4-антитіл і до їх застосування.

Забезпечення кровопостачання є основною потребою для багатьох фізіологічних і патологічних процесів. Для активного росту тканин, таких як ембріони й пухлини, необхідно адекватне кровопостачання. Таке кровопостачання забезпечується завдяки продукуванню проангіогенних факторів, що стимулюють утворення нових кровоносних судин у процесі, який називається ангіогенезом. Утворення судин є складним, але планомірним біологічним процесом, що включає в себе всі або багато які з наступних стадій: а) проліферацію ендотеліальних клітин (ЕС) з існуючих ЕС або їх диференціювання із клітин-попередників; б) міграцію й коалесценцію ЕС з утворенням канатикоподібних структур; с) тубулогенез судинних канатиків з утворенням судин, які мають центральний просвіт; д) розростання існуючих канатиків або судин з

утворенням вторинних судин; е) наступне ремоделювання й утворення нових форм із первинного судинного сплетення; і f) рекрутинг періендотеліальних клітин в ендотеліальні судини, що надає цим судинам підтримуючих й модуляторних функцій; де вказаними клітинами є перицити для невеликих капілярів, клітини гладких м'язів для великих судин і клітини міокарда в серце. Hanahan, *Science* 277:48-50 (1997); Hogan & Kolodziej, *Nat. Rev. Genet.* 3:513-23 (2002); Lubarsky & Krasnow, *Cell* 112:19-28 (2003).

У цей час добре відомо, що ангіогенез бере участь у патогенезі різних захворювань. Такими захворюваннями є солідні пухлини й метастази, атеросклероз, ретролентальна фіброплазія, гемангіоми, хронічне запалення, внутрішньоочні неоваскулярні захворювання, такі як проліферативні ретинопатії, наприклад, діабетична ретинопатія, вікова дегенерація жовтої плями (AMD), неоваскулярна глаукома, імунне відторгнення імплантованої тканини рогівки й інших тканин, ревматоїдний

артрит і псоріаз. Folkman et al., J. Biol. Chem. 267:10931-34 (1992); Klagsbrun et al., Amu. Rev. Physiol. 53:217-39 (1991); і Garner A., "Vascular diseases," In: Pathobiology of Ocular Disease. A Dynamic Approach, Garner A., Klintworth GK, eds., 2nd Edition (Marcel Dekker, NY, 1994), pp 1625-1710.

У випадку росту пухлини, ангиогенез, мабуть, відіграє вирішальну роль у переході від гіперплазії до неоплазії й у забезпеченні надходження поживних елементів, необхідних для росту пухлин і утворення метастазів. Folkman et al., Nature 339:58 (1989). Неоваскуляризація сприяє переважному росту пухлинних клітин і набуванню ними проліферативної автономії в порівнянні з нормальними клітинами. Розвиток пухлини звичайно починається з однієї аберантної клітини, що може проліферуватися тільки до розміру в декілька кубічних міліметрів, що зумовлено певною відстанню від доступного капілярного ложа, і така клітина може залишатися «сплячою», тобто вона може не піддаватися подальшому росту й дисемінуванню протягом тривалого періоду. Потім деякі пухлинні клітини набувають ангиогенного фенотипу з активацією ендотеліальних клітин, які після проліферації й дозрівання утворюють нові капілярні кровоносні судини. Ці новостворені судини не тільки сприяють продовженню росту первинної пухлини, але також дисемінуванню й реколонізації метастатичних пухлинних клітин. Відповідно до цього спостерігається кореляція між щільністю мікросудин у пухлинних зрізах і виживаністю пацієнтів, що страждають раком молочної залози й деякими іншими пухлинами. Weidner et al., N. Engl. J. Med. 324:1-6 (1991); Horak et al., Lancet 340:1120-24 (1992); Macchiarini et al., Lancet 340:145-46 (1992). Точні механізми, що регулюють перемикання ангиогенезу, поки ще не встановлені, хоча й імовірно, що неоваскуляризація пухлинної маси є результатом загального співвідношення множини стимуляторів і інгібіторів ангиогенезу (Folkman, Nat. Med. 1(1):27-31 (1995)).

Процес розвитку судин строго регулюється. У цей час уже відомо, що велика кількість молекул, головним чином, секретованих факторів, продукуваних оточуючими клітинами, регулюють диференціювання, проліферацію, міграцію й коалесценцію ЕС із утворенням канатикоподібних структур. Так, наприклад, васкулярний ендотеліальний фактор росту (VEGF) був ідентифікований як ключовий фактор, що бере участь у стимуляції ангиогенезу й в індуванні проникності судин. Ferrara et al., Endocr. Rev. 18:4-25 (1997). Виявлення того факту, що втрата навіть одного алелю VEGF приводить до загибелі ембріона вказує на незамінну роль, що відіграє цей фактор в розвитку й диференціюванні судинної системи. Крім того, було показано, що VEGF є ключовим медіатором неоваскуляризації, асоційованої з розвитком пухлинних і внутрішньоочних захворювань. Ferrara et al., Endocr. Rev. див. вище. mPHK VEGF надекспресується більшістю досліджуваних людських пухлин. Berkman et al., J. Clin. Invest. 91:153-59 (1993); Brown et al., Human Pathol. 26:86-91 (1995); Brown et al., Cancer Res. 53:4727-35 (1993); Mattern et al., Brit. J. Cancer

73:931-34 (1996); Dvorak et al., Am. J. Pathol. 146:1029-39(1995).

Крім того, рівні концентрації VEGF у внутрішньоочній рідині в значній мірі корелюють із активною проліферацією кровоносних судин у пацієнтів із діабетичною ретинопатією й іншою асоційованою з ішемією ретинопатією. Aiello et al., N. Engl. J. Med. 331:1480-87 (1994). Крім того, були проведені дослідження, які виявили локалізацію VEGF у хориоїдальних неоваскулярних мембранах у пацієнтів, що страждають на AMD. Lopez et al., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 37:855-68 (1996).

Нейтралізуючі анти-VEGF-антитіла придушують ріст різних людських пухлинних клітинних ліній в «голих» мишей (Kim et al., Nature 362:841-44 (1993); Warren et al., J. Clin. Invest. 95:1789-97 (1995); Borgstrom et al., Cancer Res. 56:4032-39 (1996); Melnyk et al., Cancer Res. 56:921-24 (1996)), також інгібують внутрішньоочний ангиогенез у моделях ішемічних захворювань сітківки (Adamis et al., Arch. Ophthalmol. 114:66-71 (1996)). Тому моноклональні анти-VEGF-антитіла або інші інгібітори дії VEGF є перспективними кандидатами на їхнє застосування для лікування пухлинних і різних внутрішньоочних неоваскулярних захворювань. Такі антитіла описані, наприклад, в EP 817648, опублікованому 14 січня 1998 року; у заявках WO 98/45331 і WO 98/45332, опублікованих 15 жовтня 1998 року. Одне з анти-VEGF-антитіл, бевацизумаб, було дозволено Управлінням з контролю за якістю харчових продуктів, медикаментів і косметичних засобів (FDA) до його застосування в комбінації з хіміотерапією для лікування конкретних ракових захворювань, фрагмент анти-VEGF-антитіла, ранібізумаб, був дозволений FDA до застосування для лікування вікової (мокрої) дегенерації жовтої плями. У цей час обидва цих лікарських засоби проходять клінічні випробування.

Очевидно, що необхідність одержання агентів, які мають клінічні ознаки, що є оптимальними для розробки терапевтичних засобів, залишається актуальною. Винахід, описаний у даній заявці, задовольняє цій вимозі й має інші переваги.

Всі цитовані тут роботи, включаючи патентні заявки й публікації, у всій їхній повноті включені в даний опис за допомогою посилання.

Даний винахід частково оснований на ідентифікації різних DLL4-зв'язувальних агентів (таких як імункон'югати, антитіла і їхні фрагменти). DLL4 являє собою важливу й переважну терапевтичну мішень, і даний винахід належить до композицій і до способів, оснований на зв'язуванні з DLL4. Описані тут DLL4-зв'язувальні агенти відповідно до винаходу являють собою важливі терапевтичні й діагностичні засоби, які можуть бути використані для лікування патологічних станів, асоційованих з експресією і/або активністю каскаду реакцій DLL4-рецептору Notch. Відповідно до цього, даний винахід належить до способів, композицій, наборів і промислових виробів, асоційованих з BIX4-зв'язуванням.

Даний винахід належить до антитіл, які зв'язуються (наприклад, специфічно зв'язуються) з DLL4.



В одному зі своїх аспектів даний винахід належить до виділеного анти-01X4-антитіла, де повнорозмірна IgG-форма антитіла специфічно зв'язується з людським DLL4 з афінністю зв'язування приблизно 1 нМ або більше або приблизно 500 пМ або більше. Як добре відомо фахівцям, афінність зв'язування ліганду з його рецептором може бути визначена за допомогою різних аналізів і виражена різними кількісними величинами. Відповідно до цього, в одному з варіантів винаходу, афінність зв'язування виражена величинами  $K_d$  і являє собою природну афінність зв'язування (наприклад, з мінімальними ефектами авідності). Звичайно й переважно, афінність зв'язування вимірюють *in vitro* у безклітинному або в клітинному середовищі. Для вимірювання афінності зв'язування може бути використаний будь-який з відомих аналізів, включаючи описані тут аналізи, наприклад, Віаскоге®, радіоімунаналіз (PIA) і ELISA. У деяких варіантах винаходу виділене анти-DLL4-антитіло зв'язується з людським і мишачим DLL4 з аналогічною афінністю, тобто афінність зв'язування з людським DLL4 перевищує афінність зв'язування з мишачим DLL4 не більше ніж в 100 разів або менше. У деяких варіантах винаходу афінність зв'язування з людським DLL4 перевищує афінність зв'язування з мишачим DLL4 не більше ніж в 10 разів або менше. У деяких варіантах винаходу антитіло специфічно зв'язується з мишачим DLL4 з афінністю зв'язування приблизно 1 нМ або більше або приблизно 500 пМ або більше.

В одному зі своїх аспектів даний винахід належить до виділеного анти-DLL4-антитіла, де повнорозмірна IgG-форма антитіла специфічно зв'язується з людським DLL4 з  $K_{on}$  приблизно  $2 \times 10^5$  або більше або приблизно  $1 \times 10^5$  або більше. Як добре відомо фахівцям,  $K_{on}$  зв'язування ліганду з його рецептором може бути визначена за допомогою різних аналізів і виражена різними кількісними величинами.

В одному зі своїх аспектів даний винахід належить до виділеного антитіла, що зв'язується з лігандзв'язувальною областю DLL4. У деяких варіантах винаходу, виділене антитіло зв'язується з поліпептидом, що включає позаклітинний домен DLL4, або що складається або, в основному, що складається із цього домена. У деяких варіантах винаходу, виділене антитіло зв'язується з поліпептидом, що включає, що складається або, в основному, що складається з них, амінокислоти 252-282, 1-252, 1-286, 1-324 і/або 219-286 людського DLL4.

В одному зі своїх аспектів даний винахід належить до виділеного анти-DLL4-антитіла, яке конкурує з рецептором Notch за зв'язування з DLL4.

В одному зі своїх аспектів даний винахід належить до виділеного анти-DLL4-антитіла, яке інгібує, знижує і/або блокує біологічну активність DLL4.

В одному з аспектів винаходу, анти-DLL4-антитіло відповідно до винаходу включає:

(а) щонайменше одну, дві, три, чотири, п'ять або шість послідовностей гіперваріабельних областей (HVR), вибраних із групи, яка складається з:

(i) HVR-L1, що містить послідовність A1-A11, де A1-A11 являє собою RASQDVSTAVA (SEQ ID NO:10);

(ii) HVR-L2, що містить послідовність B1-B7, де B1-B7 являє собою SASFLYS (SEQ ID NO:11);

(iii) HVR-L3, що містить послідовність C1-C9, де C1-C9 являє собою QQSYNGPST (SEQ ID NO:15);

(iv) HVR-H1, що містить послідовність D1-D10, де D1-D10 являє собою GFTFTDNWIS (SEQ ID NO:1);

(v) HVR-H2, що містить послідовність E1-E18, де E1-E18 являє собою GVINPNSGATEYADSVKG (SEQ ID NO:5); і

(vi) HVR-H3, що містить послідовність F1-F15, де F1-F15 являє собою VYYCARDNFGGYFDY (SEQ ID NO:9); і

(b) щонайменше один варіант HVR, де вказаний варіант послідовності HVR має модифікацію щонайменше одного залишку послідовності, представленої в SEQ ID NO:1-18.

В одному з аспектів винаходу, анти-DLL4-антитіло відповідно до винаходу включає:

(а) щонайменше одну, дві, три, чотири або п'ять послідовностей гіперваріабельних областей (HVR), вибраних із групи, яка складається з:

(i) HVR-L1, що містить послідовність A1-A11, де A1-A11 являє собою RASQDVSTAVA (SEQ ID NO:10);

(ii) HVR-L2, що містить послідовність B1-B7, де B1-B7 являє собою SASFLYS (SEQ ID NO:11);

(iii) HVR-L3, що містить послідовність C1-C9, де C1-C9 являє собою QQSVNGPAT (SEQ ID NO:14);

(iv) HVR-H1, що містить послідовність D1-D10, де D1-D10 являє собою GFSFRDNWIS (SEQ ID NO:2);

(v) HVR-H2, що містить послідовність E1-E18, де E1-E18 являє собою GVINPNSGSTDYADSVKG (SEQ ID NO:3);

(vi) HVR-H3, що містить послідовність F1-F15, де F1-F15 являє собою VYYCARDNFGGYFDY (SEQ ID NO:9); і

(b) щонайменше один варіант HVR, де вказаний варіант послідовності HVR має модифікацію щонайменше одного залишку послідовності, представленої в SEQ ID NO:1-18.

В одному з аспектів винаходу, анти-DLL4-антитіло відповідно до винаходу включає:

(а) щонайменше одну, дві, три, чотири або п'ять послідовностей гіперваріабельних областей (HVR), вибраних із групи, яка складається з:

(i) HVR-L1, що містить послідовність A1-A11, де A1-A11 являє собою RASQDVSTAVA (SEQ ID NO:10);

(ii) HVR-L2, що містить послідовність B1-B7, де B1-B7 являє собою SASFLYS (SEQ ID NO:11);

(iii) HVR-L3, що містить послідовність C1-C9, де C1-C9 являє собою QQSYTGTVT (SEQ ID NO:18);

(iv) HVR-H1, що містить послідовність D1-D10, де D1-D10 являє собою GFTFTDNWIS (SEQ ID NO:1);

(v) HVR-H2, що містить послідовність E 1-E 18, де E 1-E 18 являє собою GYISPNSGFTYYADSVKG (SEQ ID NO:8) and

(vi) HVR-H3, що містить послідовність F1-F15, де F1-F15 являє собою VYYCARDNFGGYFDY (SEQ ID NO:9); i

(b) щонайменше один варіант HVR, де вказаний варіант послідовності HVR має модифікацію щонайменше одного залишку послідовності, пред'явленої в SEQ ID NO:1-18.

В одному зі своїх аспектів даний винахід належить до антитіла, що містить одну, дві, три, чотири, п'ять або шість HVR, де кожна HVR включає послідовність, або складається, або, в основному, складається з послідовності, вибраної із групи, яка складається з SEQ ID NO:1-18, і де SEQ ID NO:10 відповідає HVR-L1, SEQ ID NO:11 відповідає HVR-L2, SEQ ID NO:12, 13, 14, 15, 16, 17 або 18 відповідають HVR-L3, SEQ ID NO:1 або 2 відповідають HVR-H1, SEQ ID NO:3, 4, 5, 6, 7 або 8 відповідають HVR-H2, SEQ ID NO:9 відповідає HVR-H3. В одному з варіантів винаходу, антитіло відповідно до винаходу містить HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, де кожна із цих областей включає в вказаному порядку SEQ ID NO:10, 11, 12, 1, 3, 9. В одному з варіантів винаходу, антитіло відповідно до винаходу містить HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, де кожна із цих областей включає в вказаному порядку SEQ ID NO:10, 11, 13, 1, 4, 9. В одному з варіантів винаходу, антитіло відповідно до винаходу містить HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, де кожна із цих областей включає в вказаному порядку SEQ ID NO:10, 11, 14, 2, 3, 9. В одному з варіантів винаходу, антитіло відповідно до винаходу містить HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, де кожна із цих областей включає в вказаному порядку SEQ ID NO:10, 11, 15, 1, 5, 9. В одному з варіантів винаходу, антитіло відповідно до винаходу містить HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, де кожна із цих областей включає в вказаному порядку SEQ ID NO:10, 11, 16, 1, 6, 9. В одному з варіантів винаходу, антитіло відповідно до винаходу містить HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, де кожна із цих областей включає в вказаному порядку SEQ ID NO:10, 11, 17, 1, 7, 9. В одному з варіантів винаходу, антитіло відповідно до винаходу містить HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, де кожна із цих областей включає в вказаному порядку SEQ ID NO:10, 11, 18, 1, 8, 9.

Варіанти HVR в антитілі відповідно до винаходу можуть мати модифікації в одному або декількох (наприклад, у двох, трьох, чотирьох, п'яти або більше) залишках в HVR.

В одному з варіантів винаходу, варіант HVR-L3 містить 1-6 (1, 2, 3, 4, 5 або 6) замін у будь-якій комбінації в нижченаведених положеннях: 91 (S або W), 92 (Y або F), 93 (T, N або S), 94 (T або G), 95 (P, Q, A або T) і/або 96 (P, S, A або V).

В одному з варіантів винаходу варіант HVR-H2 містить 1-4 (1, 2, 3 або 4) замін у будь-якій комбінації в нижченаведених положеннях: 50 (V, L або

Y), 52 (N або S), 52a (P або S) або 53 (N, Q, T або I).

Букви в дужках після кожного положення вказують на репрезентативне заміщення (тобто репрезентативну заміну) амінокислот; і як очевидно фахівцеві в даній галузі, допустимість заміни однієї амінокислоти іншою амінокислотою відповідно до описаного тут винаходом може бути оцінена рутинними відомими і/або описаними тут методами.

В одному зі своїх аспектів даний винахід належить до антитіла, що включає область HVR-H1, яка містить послідовність SEQ ID NO:1 або 2. В одному зі своїх аспектів даний винахід належить до антитіла, що включає область HVR-H2, яка містить послідовність SEQ ID NO:3, 4, 5, 6, 7 або 8. В одному зі своїх аспектів даний винахід належить до антитіла, що включає область HVR-H3, яка містить послідовність SEQ ID NO:9. В одному зі своїх варіантів, даний винахід належить до антитіла, що включає область HVR-L1, яка містить послідовність SEQ ID NO:10. В одному зі своїх варіантів, даний винахід належить до антитіла, що включає область HVR-L2, яка містить послідовність SEQ ID NO:11. В одному зі своїх варіантів, даний винахід належить до антитіла, що включає область HVR-L3, яка містить послідовність SEQ ID NO:12, 13, 14, 15, 16, 17 або 18.

В одному зі своїх аспектів даний винахід належить до антитіла, що включає щонайменше одну, щонайменше дві або всі три нижченаведені послідовності:

(i) послідовність HVR-H1, що містить послідовність SEQ ID NO:1;

(ii) послідовність HVR-H2, що містить послідовність SEQ ID NO:5;

(iii) послідовність HVR-H3, що містить послідовність SEQ ID NO:9.

В одному зі своїх аспектів даний винахід належить до антитіла, що включає щонайменше одну, щонайменше дві або всі три нижченаведені послідовності:

(i) послідовність HVR-L1, що містить послідовність SEQ ID NO:10;

(ii) послідовність HVR-L2, що містить послідовність SEQ ID NO:11;

(iii) послідовність HVR-L3, що містить послідовність SEQ ID NO:15.

В одному зі своїх аспектів даний винахід належить до антитіла, що включає щонайменше одну, щонайменше дві або всі три нижченаведені послідовності:

(i) послідовність HVR-H1, що містить послідовність SEQ ID NO:1;

(ii) послідовність HVR-H2, що містить послідовність SEQ ID NO:8;

(iii) послідовність HVR-H3, що містить послідовність SEQ ID NO:9.

В одному зі своїх аспектів даний винахід належить до антитіла, що включає щонайменше одну, щонайменше дві або всі три нижченаведені послідовності:

(i) послідовність HVR-L1, що містить послідовність SEQ ID NO:10;

(ii) послідовність HVR-L2, що містить послідовність SEQ ID NO:11;

(iii) послідовність HVR-L3, що містить послідовність SEQ ID NO:18.

Амінокислотні послідовності SEQ ID NO:1-18 пронумеровані для кожної окремої HVR (тобто H1, H2 або H3), як показано на фігурах 1a і 1b, де вказана нумерація відповідає системі нумерації Кеббата, описаній нижче.

В одному зі своїх аспектів даний винахід належить до антитіл, що включають послідовності HVR важкого ланцюга, як показано на фігурах 1a і 1b.

В одному зі своїх аспектів даний винахід належить до антитіл, що включають послідовності HVR легкого ланцюга, як показано на фігурах 1a і 1b.

Деякі варіанти антитіл відповідно до винаходу включають варіабельний домен легкого ланцюга гуманізованого антитіла 4D5 (huMAb4D5-8) (HERCEPTIN®, Genentech, Inc., South San Francisco, CA, USA) (також описаного в патенті США № 6407213 і Lee et al., J. Mol. Biol. (2004), 340(5): 1073-93)), представленого нижче в SEQ ID NO:52.

1 Asp He Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys ArR Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Gln Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys 107 (SEQ ID NO:52) (залишки HVR підкреслені)

В одному з варіантів винаходу, послідовність варіабельного домену легкого ланцюга huMAb4D5-8 модифікована в одному або декількох положеннях 30, 66 і 91 (Asn, Arg і His вказані вище жирним шрифтом/курсивом, відповідно). В одному з варіантів винаходу, модифікована послідовність huMAb4D5-8 містить Ser у положенні 30, Gly у положенні 66 і/або Ser у положенні 91. Відповідно до цього, в одному з варіантів винаходу, антитіло відповідно до винаходу містить варіабельний домен легкого ланцюга, що має послідовність, представлену нижче в SEQ ID NO:53:

1 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Gln Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys 107 (SEQ ID NO:53) (залишки HVR підкреслені)

Замінені залишки в huMAb4D5-8 вказані вище жирним шрифтом/курсивом.

Антитіла відповідно до винаходу можуть містити будь-яку прийнятну послідовність каркасного домена у варіабельній області, за умови, що активність зв'язування з DLL4 буде, в основному, зберігатися. Так, наприклад, у деяких варіантах винаходу, антитіла відповідно до винаходу містять

консенсусну послідовність каркасної області людського важкого ланцюга підгрупи III. В одному з варіантів цих антитіл, консенсусна послідовність каркасних областей містить заміну в положенні 71, 73 і/або 78. У деяких варіантах цих антитіл, у положенні 71 присутній A, у положенні 73 присутній T і/або в положенні 78 присутній A. В одному з варіантів винаходу, вказані антитіла включають каркасні послідовності варіабельного домену важкого ланцюга huMAb4D5-8 (HERCEPTIN®, Genentech, Inc., South San Francisco, CA, USA) (також описаного в патентах США №№ 6407213 і 5821337 і в публікації Lee et al., J. Mol. Biol. (2004), 340(5):1073-93). В одному з варіантів винаходу, ці антитіла також включають консенсусну послідовність каркасної області людського легкого ланцюга κL. В одному з варіантів винаходу, вказані антитіла включають послідовності HVR легкого ланцюга huMAb4D5-8 (описані в патентах США №№ 6407213 і 5821337). В одному з варіантів винаходу, вказані антитіла включають послідовності варіабельного домену легкого ланцюга huMAb4D5-8 (HERCEPTIN®, Genentech, Inc., South San Francisco, CA, USA) (також описаного в патентах США №№ 6407213 і 5821337 і Lee et al., J. Mol. Biol. (2004), 340(5): 1073-93).

В одному з варіантів винаходу, вказане антитіло відповідно до винаходу включає варіабельний домен важкого ланцюга, де каркасна послідовність включає послідовність SEQ ID NO:19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 і/або 37, послідовності HVR H1, H2 і H3 являють собою SEQ ID NO:1, 5 і/або 9, відповідно. В одному з варіантів винаходу, антитіло відповідно до винаходу включає варіабельний домен легкого ланцюга, де каркасна послідовність включає послідовність SEQ ID NO:38, 39, 40 і/або 41, послідовності HVR L1, L2 і L3 являють собою SEQ ID NO:10, 11 і/або 15, відповідно.

В одному з варіантів винаходу, антитіло відповідно до винаходу містить варіабельний домен важкого ланцюга, де каркасна послідовність включає послідовність SEQ ID NO:19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 і/або 37, послідовності HVR H1, H2 і H3 являють собою SEQ ID NO:2, 3 і/або 9, відповідно. В одному з варіантів винаходу, антитіло відповідно до винаходу містить варіабельний домен легкого ланцюга, де каркасна послідовність включає послідовність SEQ ID NO:38, 39, 40 і/або 41, послідовності HVR L1, L2 і L3 являють собою SEQ ID NO:10, 11 і/або 14, відповідно.

В одному з варіантів винаходу, антитіло відповідно до винаходу містить варіабельний домен важкого ланцюга, де каркасна послідовність включає послідовність SEQ ID NO:19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 і/або 37, послідовності HVR H1, H2 і H3 являють собою SEQ ID NO:1, 8 і/або 9, відповідно. В одному з варіантів винаходу, антитіло відповідно до винаходу містить варіабельний домен легкого ланцюга, де каркасна послідовність включає послідовність SEQ ID NO:38, 39, 40 і/або 41, послідовності HVR L1, L2 і L3 являють собою SEQ ID NO:10, 11 і/або 18, відповідно.

В одному з варіантів винаходу, антитіло відповідно до винаходу містить варіабельний домен важкого ланцюга, де каркасна послідовність включає послідовність SEQ ID NO:46, 47, 48 і/або 49, послідовності HVR H1, H2 і H3 являють собою SEQ TD NO:1, 5 і/або 9, відповідно. В одному з варіантів винаходу, антитіло відповідно до винаходу містить варіабельний домен легкого ланцюга, де каркасна послідовність включає послідовність SEQ ID NO:42, 43, 44 і/або 45, послідовності HVR L1, L2 і L3 являють собою SEQ ID NO:10, 11 і/або 15, відповідно.

В одному з варіантів винаходу, антитіло відповідно до винаходу містить варіабельний домен важкого ланцюга, де каркасна послідовність включає послідовність SEQ ID NO:46, 47, 48 і/або 49, послідовності HVR H1, H2 і H3 являють собою SEQ ID NO:2, 3 і/або 9, відповідно. В одному з варіантів винаходу, антитіло відповідно до винаходу містить варіабельний домен легкого ланцюга, де каркасна послідовність включає послідовність SEQ ID NO:42, 43, 44 і/або 45, послідовності HVR L1, L2 і L3 являють собою SEQ ID NO:10, 11 і/або 14, відповідно.

В одному з варіантів винаходу, антитіло відповідно до винаходу містить варіабельний домен важкого ланцюга, де каркасна послідовність включає послідовність SEQ ID NO:46, 47, 48 і/або 49, послідовності HVR H1, H2 і H3 являють собою SEQ ID NO:1, 8 і/або 9, відповідно. В одному з варіантів винаходу, антитіло відповідно до винаходу містить варіабельний домен легкого ланцюга, де каркасна послідовність включає послідовність SEQ ID NO:42, 43, 44 і/або 45, послідовності HVR L1, L2 і L3 являють собою SEQ ID NO:10, 11 і/або 18, відповідно.

В одному з варіантів винаходу, антитіло відповідно до винаходу піддають афінному дозріванню з досягненням потрібної афінності зв'язування з мішенню. В одному з прикладів, афінно зріле антитіло відповідно до винаходу містить заміну в одному або декількох положеннях амінокислот H28, H30, H31, H32, H33, L91, L92, L93, L94, L95 і/або L96. В одному із прикладів, афінно зріле антитіло відповідно до винаходу містить одну або декілька з нижченаведених заміни: (a) у важкому ланцюзі, V50L, V50Y, N52S, P52aS, N53Q, N53T, N53I, S56A, S56F, T57S, D58E, D58I, D58A, D58Y, або (b), у легкому ланцюзі, S91W, Y92F, T93N, T93S, T94G, P95Q, P95A, P95T, P96S, P96A, P96V.

В одному з варіантів винаходу, антитіло відповідно до винаходу містить варіабельний домен важкого ланцюга, що включає послідовність SEQ ID NO:54. В одному з варіантів винаходу, антитіло відповідно до винаходу містить варіабельний домен легкого ланцюга, що включає послідовність SEQ ID NO:55. В одному з варіантів винаходу, антитіло відповідно до винаходу містить варіабельний домен важкого ланцюга, що включає послідовність SEQ ID NO:54, і варіабельний домен легкого ланцюга, що включає послідовність SEQ ID NO:55.

В одному з варіантів винаходу, антитіло відповідно до винаходу містить варіабельний домен важкого ланцюга, що включає послідовність SEQ ID NO:56. В одному з варіантів винаходу, антитіло

відповідно до винаходу містить варіабельний домен легкого ланцюга, що включає послідовність SEQ ID NO:57. В одному з варіантів винаходу, антитіло відповідно до винаходу містить варіабельний домен важкого ланцюга, що включає послідовність SEQ ID NO:56, і варіабельний домен легкого ланцюга, що включає послідовність SEQ ID NO:57.

В одному з варіантів винаходу, антитіло відповідно до винаходу містить варіабельний домен важкого ланцюга, що включає послідовність SEQ ID NO:58. В одному з варіантів винаходу, антитіло відповідно до винаходу містить варіабельний домен легкого ланцюга, що включає послідовність SEQ ID NO:59. В одному з варіантів винаходу, антитіло відповідно до винаходу містить варіабельний домен важкого ланцюга, що включає послідовність SEQ ID NO:58, і варіабельний домен легкого ланцюга, що включає послідовність SEQ ID NO:59.

В одному зі своїх аспектів даний винахід належить до антитіла, яке конкурує з будь-якими вищезгаданими антитілами за зв'язування з DLL4. В одному зі своїх аспектів даний винахід належить до антитіла, що зв'язується з таким же епітопом на DLL4, з яким зв'язується будь-яке з вищезгаданих антитіл.

Як відомо фахівцям і як докладно описано нижче, положення/межі амінокислот, що визначають гіперваріабельну область антитіла, можуть варіюватися залежно від оточуючих амінокислот і від різних дефініцій, відомих фахівцям (описаних нижче). Деякі положення у варіабельному домені можуть розглядатися як гібридні гіперваріабельні положення, де ці положення, очевидно, можуть бути присутніми в гіперваріабельній області відповідно до одного ряду ознак, можуть бути присутніми і поза гіперваріабельною областю відповідно до іншого ряду ознак. Одне або декілька із цих положень може також знаходитися в подовжених гіперваріабельних областях (як докладно визначено нижче).

У деяких варіантах винаходу, вказаним антитілом є моноклональне антитіло. У деяких варіантах винаходу, вказаним антитілом є поліклональне антитіло. У деяких варіантах винаходу, вказане антитіло вибране із групи, яка складається з химерного антитіла, афінно зрілого антитіла, гуманізованого антитіла й людського антитіла. У деяких варіантах винаходу, вказаним антитілом є фрагмент антитіла. У деяких варіантах винаходу, вказаним антитілом є Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub> або scFv.

В одному з варіантів винаходу, вказаним антитілом є химерне антитіло, наприклад, антитіло, що включає антигензв'язувальні послідовності, що походять від не-людського донора й приєднані до гетерологічної не-людської, людської або гуманізованої послідовності (наприклад, послідовностей каркасного і/або константного домена). В одному з варіантів винаходу, вказаним не-людським донором є миша. В одному з варіантів винаходу, антигензв'язувальна послідовність є синтетичною, наприклад, вона може бути отримана за допомогою мутагенезу (наприклад, шляхом скринінгу методом фагового представлення й т.п.). В одному з варіантів винаходу, химерне антитіло відповідно до

винаходу має мишачі V-області й людську C-область. В одному з варіантів винаходу, мишача V-область легкого ланцюга приєднана до людського легкого ланцюга каппа. В одному з варіантів винаходу, мишача V-область важкого ланцюга приєднана до людської C-області IgG1.

Гуманізованими антитілами відповідно до винаходу є антитіла, що мають амінокислотні заміни в FR і афінно зрілі варіанти із замінами в приєднаних CDR. Замінені амінокислоти в CDR або FR не обмежуються амінокислотами, які присутні в антитілі-донорі або реципієнті. В інших варіантах винаходу, антитіла відповідно до винаходу також містять заміни амінокислотних залишків в Fc-області, які поліпшують ефекторну функцію, включаючи поліпшення CDC- і/або ADCC-функції й посилення цитолізу В-клітин. Іншими антитілами відповідно до винаходу є антитіла, що мають специфічні заміни, які підвищують стабільність. В інших варіантах винаходу, антитіла відповідно до винаходу містять заміни амінокислотних залишків в Fc-області, які послаблюють ефекторну функцію, включаючи ослаблення CDC- і/або ADCC-функції і/або ослаблення цитолізу В-клітин. У деяких варіантах винаходу, антитіла відповідно до винаходу характеризуються зниженим рівнем зв'язування (наприклад, відсутністю зв'язування) з фактором C1q людської системи комплементу і/або з людським Fc-рецептором на природних клітинах-кілерах (NK). У деяких варіантах винаходу, антитіла відповідно до винаходу характеризуються зниженим рівнем зв'язування (наприклад, відсутністю зв'язування) з людським FcγRI, FcγRIIA і/або FcγRIIIA. У деяких варіантах винаходу, антитіла відповідно до винаходу належать до класу IgG (наприклад, IgG1 або IgG4) і містять щонайменше одну мутацію в E233, L234, G236, D265, D270, N297, E318, K320, K322, A327, A330, P331 і/або P329 (нумерація проходила відповідно до Європейської системи нумерації (EU)). У деяких варіантах винаходу, вказані антитіла включають мутацію L234A/L235A або D265A/N297A.

В одному зі своїх аспектів даний винахід належить до антитіл проти поліпептидів DLL4, які містять будь-яку з описаних тут антигензв'язувальних послідовностей, де вказані антитіла проти поліпептидів DLL4 специфічно зв'язуються з DLL4.

Антитіла відповідно до винаходу зв'язуються (наприклад, специфічно зв'язуються) з DLL4, у деяких варіантах винаходу, вони можуть модулювати один або декілька видів DLL4-асоційованих ефектів, включаючи, але не обмежуючись ними, ослаблення або блокування активації рецептора Notch, ослаблення або блокування молекулярного сигналу, який передається після передачі сигналу рецептора Notch, порушення або блокування зв'язування рецептора Notch з DLL4 і/або стимуляцію проліферації ендотеліальних клітин і/або інгібування диференціювання ендотеліальних клітин і/або інгібування артеріальної диференціації і/або інгібування судинної перфузії пухлини, і/або лікування і/або попередження розвитку пухлини, клітинно-проліферативного розладу або раку; і/або лікування або попередження розладу, асоційованого з експресією і/або активністю DLL4 і/або ліку-

вання або попередження розладу, асоційованого з експресією і/або активністю рецептора Notch. У деяких варіантах винаходу, антитіло відповідно до винаходу специфічно зв'язується з DLL4. У деяких варіантах винаходу, антитіло специфічно зв'язується з позаклітинним доменом DLL4 (ECD). У деяких варіантах винаходу, антитіло специфічно зв'язується з поліпептидом, що складається, або, в основному, що складається з позаклітинного домена DLL4. У деяких варіантах винаходу, антитіло специфічно зв'язується з DLL4 з KD приблизно 1 нМ або більше, або приблизно 500 пМ або більше. У деяких варіантах винаходу, антитіло специфічно зв'язується з людським DLL4 з  $K_{on}$  приблизно  $2 \times 10^5$  або більше, або приблизно  $1 \times 10^5$  або більше. У деяких варіантах винаходу, антитіло відповідно до винаходу послаблює, інгібує і/або блокує активність DLL4 *in vivo* і/або *in vitro*. У деяких варіантах винаходу, антитіло конкурує з DLL4-лігандом за зв'язування з DLL4 (послаблює і/або блокує зв'язування рецептора Notch з DLL4).

В одному зі своїх аспектів даний винахід належить до композицій, що містять одне або декілька антитіл відповідно до винаходу й носій. В одному з варіантів винаходу, вказаний носій є фармацевтично прийнятним.

В одному зі своїх аспектів даний винахід належить до нуклеїнових кислот, що кодують анти-DLL4-антитіло відповідно до винаходу.

В одному зі своїх аспектів даний винахід належить до векторів, що містять нуклеїнову кислоту відповідно до винаходу.

В одному зі своїх аспектів даний винахід належить до композицій, що містять одну або декілька нуклеїнових кислот відповідно до винаходу й носій. В одному з варіантів винаходу, вказаний носій є фармацевтично прийнятним.

В одному зі своїх аспектів даний винахід належить до клітин-хазяїв, що містять нуклеїнову кислоту або вектор відповідно до винаходу. Вказаним вектором може бути вектор будь-якого типу, наприклад, рекомбінантний вектор, такий як експресійний вектор. При цьому можуть бути використані будь-які клітини-хазяї. В одному з варіантів винаходу, клітиною-хазяєм є прокаріотична клітина, наприклад, *E. coli*. В одному з варіантів винаходу, клітиною-хазяєм є еукаріотична клітина, наприклад, клітина ссавця, така як клітина яєчника китайського хом'ячка (CHO).

В одному зі своїх аспектів даний винахід належить до способів одержання антитіла відповідно до винаходу. Так, наприклад, даний винахід належить до способів одержання анти-DLL4-антитіла (яке, як визначено в даній заявці, є повнорозмірним антитілом або фрагментом антитіла) або імунокон'югата, де вказаний спосіб включає експресію в прийнятній клітині-хазяїні рекомбінантного вектора відповідно до винаходу, що кодує вказане антитіло (або його фрагмент), і виділення вказаного антитіла.

В одному зі своїх аспектів даний винахід належить до промислового виробу, що включає контейнер і композицію, яка міститься в цьому контейнері, де вказана композиція включає одне або декілька анти-DLL4-антитіл відповідно до винаходу.

ду. В одному з варіантів винаходу, вказана композиція також містить антиангіогенний агент. В одному з варіантів винаходу, вказаним антиангіогенним агентом є анти-VEGF-антитіло, наприклад, бевацизумаб. В одному з варіантів винаходу, вказана композиція містить нуклеїнову кислоту відповідно до винаходу. В одному з варіантів винаходу, вказана композиція, що містить антитіло, також містить носій, що, у деяких варіантах винаходу, є фармацевтично прийнятним. В одному з варіантів винаходу, у вказаному контейнері присутня друга композиція, де вказана друга композиція містить антиангіогенний агент. В одному з варіантів винаходу, вказаним антиангіогенним агентом є анти-DLL4-антитіло, наприклад, бевацизумаб. В одному з варіантів винаходу, промисловий виріб відповідно до винаходу також включає інструкції із введення вказаної(их) композиції(й) (наприклад, антитіла) індивідууму (наприклад, інструкції із застосування будь-якого з описаних тут способів).

В одному зі своїх аспектів даний винахід належить до набору, який містить перший контейнер, що включає композицію, яка містить одне або декілька анти-DLL4-антитіл відповідно до винаходу, і другий контейнер, що включає буфер. В одному з варіантів винаходу, вказаний буфер є фармацевтично прийнятним. В одному з варіантів винаходу, композиція, що містить антитіло, також містить носій, що, у деяких варіантах винаходу, є фармацевтично прийнятним. В одному з варіантів винаходу, вказаний набір також включає інструкції із введення вказаної композиції (наприклад, антитіла) індивідууму.

В одному зі своїх аспектів даний винахід належить до застосування анти-ОКб4-антитіла відповідно до винаходу з метою одержання лікарського засобу для терапевтичного і/або профілактичного лікування захворювання, такого як рак, пухліну і/або клітинно-проліферативний розлад. У деяких варіантах винаходу, вказаним розладом є патологічний стан, асоційований з ангіогенезом.

В одному зі своїх аспектів даний винахід належить до застосування нуклеїнової кислоти відповідно до винаходу з метою одержання лікарського засобу для терапевтичного і/або профілактичного лікування захворювання, такого як рак, пухліну і/або клітинно-проліферативний розлад. У деяких варіантах винаходу, вказаним розладом є патологічний стан, асоційований з ангіогенезом.

В одному зі своїх аспектів даний винахід належить до застосування експресійного вектора відповідно до винаходу з метою одержання лікарського засобу для терапевтичного і/або профілактичного лікування захворювання, такого як рак, пухліну і/або клітинно-проліферативний розлад. У деяких варіантах винаходу, вказаним розладом є патологічний стан, асоційований з ангіогенезом.

В одному зі своїх аспектів даний винахід належить до застосування клітини-хазяя відповідно до винаходу з метою одержання лікарського засобу для терапевтичного і/або профілактичного лікування захворювання, такого як рак, пухліну і/або клітинно-проліферативний розлад. У деяких варіан-

нтах винаходу, вказаним розладом є патологічний стан, асоційований з ангіогенезом.

В одному зі своїх аспектів даний винахід належить до застосування промислового виробу відповідно до винаходу з метою одержання лікарського засобу для терапевтичного і/або профілактичного лікування захворювання, такого як рак, пухліну і/або клітинно-проліферативний розлад. У деяких варіантах винаходу, вказаним розладом є патологічний стан, асоційований з ангіогенезом.

В одному зі своїх аспектів даний винахід належить до застосування набору відповідно до винаходу з метою одержання лікарського засобу для терапевтичного і/або профілактичного лікування захворювання, такого як рак, пухліну і/або клітинно-проліферативний розлад. У деяких варіантах винаходу, вказаним розладом є патологічний стан, асоційований з ангіогенезом.

Даний винахід належить до способів і композицій, які можуть бути застосовані для лікування патологічних станів, асоційованих з експресією і/або активністю DLL4, наприклад, з підвищеною або зниженою експресією і/або активністю, або небажаною експресією і/або активністю DLL4.

В одному зі своїх аспектів даний винахід належить до способів лікування або попередження пухлини, раку і/або клітинно-проліферативного розладу, асоційованих з підвищеною експресією і/або активністю DLL4, де вказані способи включають введення ефективної кількості анти-DLL4-антитіла індивідууму, який потребує такого лікування.

В одному зі своїх аспектів даний винахід належить до способів ослаблення, інгібування, блокування або попередження росту пухлини або ракової пухлини, де вказані способи включають введення ефективної кількості анти-DLL4-антитіла індивідууму, який потребує такого лікування.

В одному зі своїх аспектів даний винахід належить до способів лікування пухлини, раку і/або клітинно-проліферативного розладу, де вказані способи включають введення ефективної кількості анти-DLL4-антитіла індивідууму, який потребує такого лікування.

В одному зі своїх аспектів даний винахід належить до способів інгібування ангіогенезу, де вказані способи включають введення ефективної кількості анти-DLL4-антитіла індивідууму, який потребує такого лікування.

В одному зі своїх аспектів даний винахід належить до способів лікування патологічного стану, асоційованого з порушенням ангіогенезу, де вказані способи включають введення ефективної кількості анти-DLL4-антитіла індивідууму, який потребує такого лікування. У деяких варіантах винаходу, вказаним патологічним станом, асоційованим з ангіогенезом, є пухлина, рак і/або клітинно-проліферативний розлад. У деяких варіантах винаходу, вказаним патологічним станом, асоційованим з ангіогенезом, є внутрішньоочне неоваскулярне захворювання.

Способи відповідно до винаходу можуть бути застосовані для лікування будь-якого релевантного патологічного стану. Репрезентативні розлади описані в даній заявці, і такими розладами є ракові

захворювання, вибрані із групи, яка складається із дрібноклітинного раку легенів, нейробластоми, меланоми, карциноми молочної залози, раку шлунка, раку прямої і ободової кишки (CRC) і гепатоцелюлярної карциноми, включаючи метастази вказаних ракових захворювань.

Способи відповідно до винаходу можуть також включати додаткові стадії лікування. Так, наприклад, в одному з варіантів винаходу, вказаний спосіб додатково включає стадію, у якій клітину- і/або тканину-мішень (наприклад, ракову клітину) піддають променевій терапії або хіміотерапії, або обробляють антиангіогенним агентом.

В іншому своєму аспекті, даний винахід належить до способів детектування DLL4, де вказані способи включають детектування комплексу «DLL4-анти-DLL4-антитіло» у зразку. Використовуваний тут термін «детектування» включає якісне і/або кількісне детектування (на вимірних рівнях) у присутності або за відсутності контролю.

В іншому своєму аспекті, даний винахід належить до способів діагностики розладу, асоційованого з експресією і/або активністю DLL4, де вказані способи включають детектування комплексу «DLL4-анти-DLL4-антитіло» у біологічному зразку, узятому в пацієнта, що страждає на вказаний розлад або з підозрою на вказаний розлад. У деяких варіантах винаходу, експресія DLL4 є підвищеною або аномальною. У деяких варіантах винаходу, вказаним розладом є пухлина, рак і/або клітинно-проліферативний розлад.

В іншому своєму аспекті, даний винахід належить до будь-якого з описаних тут анти-DLL4-антитіл, де вказане анти-DLL4-антитіло містить детектовану мітку.

В іншому своєму аспекті, даний винахід належить до комплексу, який складається з будь-яких описаних тут анти-DLL4-антитіл і DLL4. У деяких варіантах винаходу, вказаний комплекс присутній *in vivo* або *in vitro*. У деяких варіантах винаходу, вказаний комплекс включає ракові клітини. У деяких варіантах винаходу, анти-DLL4-антитіло є детектовано міченим.

Фігура 1a, b: Послідовності петлі HVR важкого ланцюга й легкого ланцюга анти-DLL4-антитіл. На цих фігурах представлені послідовності HVR важкого ланцюга, H1, H2 і H3, і послідовності HVR легкого ланцюга, L1, L2 і L3. Послідовності пронумеровані наступним чином: клон 152.26 (HVR-H1 являє собою SEQ ID NO:1; HVR-H2 являє собою SEQ ID NO:3; HVR-H3 являє собою SEQ ID NO:9; HVR-L1 являє собою SEQ ID NO:10; HVR-L2 являє собою SEQ ID NO:11; HVR-L3 являє собою SEQ ID NO:12); клон 152.26.6 (HVR-H1 являє собою SEQ ID NO:1; HVR-H2 являє собою SEQ ID NO:4; HVR-H3 являє собою SEQ ID NO:9; HVR-L1 являє собою SEQ ID NO:10; HVR-L2 являє собою SEQ ID NO:11; HVR-L3 являє собою SEQ ID NO:13); клон 152.26.14 (HVR-H1 являє собою SEQ ID NO:2; HVR-H2 являє собою SEQ ID NO:3; HVR-H3 являє собою SEQ ID NO:9; HVR-L1 являє собою SEQ ID NO:10; HVR-L2 являє собою SEQ ID NO:11; HVR-L3 являє собою SEQ ID NO:14); клон 152.26.20 (HVR-H1 являє собою SEQ ID NO:1; HVR-H2 являє собою SEQ ID NO:5; HVR-H3 являє собою SEQ ID

NO:9; HVR-L1 являє собою SEQ ID NO:10; HVR-L2 являє собою SEQ ID NO:11; HVR-L3 являє собою SEQ ID NO:15); клон 152.26.34 (HVR-H1 являє собою SEQ ID NO:1; HVR-H2 являє собою SEQ ID NO:6; HVR-H3 являє собою SEQ ID NO:9; HVR-L1 являє собою SEQ ID NO:10; HVR-L2 являє собою SEQ ID NO:11; HVR-L3 являє собою SEQ ID NO:16); клон 152.26.40 (HVR-H1 являє собою SEQ ID NO:1; HVR-H2 являє собою SEQ ID NO:7; HVR-H3 являє собою SEQ ID NO:9; HVR-L1 являє собою SEQ ID NO:10; HVR-L2 являє собою SEQ ID NO:11; HVR-L3 являє собою SEQ ID NO:17); і клон 152.26.82 (HVR-H1 являє собою SEQ ID NO:1; HVR-H2 являє собою SEQ ID NO:8; HVR-H3 являє собою SEQ ID NO:9; HVR-L1 являє собою SEQ ID NO:10; HVR-L2 являє собою SEQ ID NO:11; HVR-L3 являє собою SEQ ID NO:18).

Положення амінокислот пронумеровані відповідно до системи нумерації Кебата, як описано нижче.

Фігури 2 і 3: репрезентативні акцепторні людські консенсусні послідовності каркасної області, які використовуються для здійснення даного винаходу із застосуванням нижченаведених ідентифікаторів послідовності:

Консенсусні каркасні послідовності варіабельної області важкого ланцюга (УКГ) (фіг. 2a, b)

Консенсусна послідовність людської каркасної області VH підгрупи I мінус CDR по Кебату (SEQ ID NO:19)

Консенсусна послідовність людської каркасної області VH підгрупи I мінус подовжені гіперваріабельні області (SEQ ID NO:20-22)

Консенсусна послідовність людської каркасної області VH підгрупи II мінус CDR по Кебату (SEQ ID NO:23)

Консенсусна послідовність людської каркасної області VH підгрупи I мінус подовжені гіперваріабельні області (SEQ ID NO:24-26)

Консенсусна послідовність людської каркасної області VH підгрупи II мінус подовжені

Консенсусна послідовність людської каркасної області VH підгрупи III мінус CDR по Кебату (SEQ ID NO:27)

Консенсусна послідовність людської каркасної області VH підгрупи III мінус подовжені гіперваріабельні області (SEQ ID NO:28-30)

Акцепторна послідовність людської каркасної області VH мінус CDR по Кебату (SEQ ID NO:31)

Акцепторна послідовність людської каркасної області VH мінус подовжені гіперваріабельні області (SEQ ID NO:32-33)

Акцепторна послідовність 2 людські каркасні області VH мінус CDR по Кебату (SEQ ID NO:34)

Акцепторна послідовність 2 людські каркасні області VH мінус подовжені гіперваріабельні області (SEQ ID NO:35-37)

Консенсусні послідовності каркасної області варіабельної області легкого ланцюга (VL) (фіг. 3)

Консенсусна послідовність людської каркасної області ланцюга каппа VL підгрупи I (SEQ ID NO:38)

Консенсусна послідовність людської каркасної області ланцюга каппа VL підгрупи II (SEQ ID NO:39)

Консенсусна послідовність людської каркасної області ланцюга каппа VL підгрупи III (SEQ ID NO:40)

Консенсусна послідовність людської каркасної області ланцюга каппа VL підгрупи IV (SEQ ID NO:41)

Фігура 4: Послідовності каркасної області легкого й важкого ланцюгів huMAb4D5-8. Числа у верхньому індексі/виділені жирним шрифтом, указують на положення амінокислот, пронумеровані по Кебату.

Фігура 5: Модифіковані/змінені послідовності каркасної області легкого й важкого ланцюгів huMAb4D5-8. Числа у верхньому індексі/виділені жирним шрифтом указують на положення амінокислот, пронумеровані по Кебату.

Фігура 6: Варіабельні області важкого ланцюга й вентиляції областей легкого ланцюга клонів антитіл 26.20, 26.14 і 26.82.

Фігура 7: DLL4-опосередковувана передача сигналу Notch регулює проліферацію ЕК. а-с, f: аналізи на розростання HUVEC в тривимірних фібринових гелях. Анти-DLL4-антитіло (YW26.82) або DBZ стимулюють розростання HUVECs (а). Кі67-забарвлювання показало, що анти-DLL4-антитіло або DBZ викликають гіперпроліферацію HUVEC (b). Анти-DLL4-антитіло або DBZ підвищують рівень розростання HUVEC у присутності SF-кондиціонованого середовища (с). d, h: Системна доставка анти-DLL4-антитіла викликає масивну акумуляцію ЕК у сітківці немовлят. Зображення судинної системи сітківки, отримані на конфокальному мікроскопі з невеликим збільшенням (угорі) і з більшим збільшенням (унизу) (забарвлювання ізолектином). (d): Кі67-забарвлювання вказувало на збільшення рівня проліферації ЕК у сітківці немовлят, обробленої анти-DLL4-антитілом (h). e: активація Notch під дією іммобілізованого DLL4 приводила до інгібування проліферації HUVEC. f: Анти-VEGF-антитіло інгібувало розростання HUVEC у присутності або за відсутності DBZ. g: Регуляція VEGFR2 під дією Notch. Кількісний ПЛР-аналіз на експресію VEGFR2 у відповідь на блокаду Notch у культурі клітин HUVEC в тривимірному фібриновому гелі (7 днів) під дією анти-DLL4-антитіла або DBZ (ліворуч) або активація Notch у культурі клітин HUVEC в двовимірному гелі (36 годин) під дією іммобілізованого DLL4 (праворуч). Анти-DLL4-антитіло й DBZ використовували при 5 мкг/мл і 0,08 мкМ, відповідно (а-с, e-g).

Фігура 8: DLL4-опосередковувана передача сигналу Notch регулює диференціювання ЕК. а: Порожнина-подібні структури (білі стрілки), утворені клітинами HUVEC, що ростуть у фібринових гелях, елімінувалися в присутності анти-DLL4-антитіла або DBZ. Замість цього, ці розростання були щільно впаковані клітинами (чорні стрілки). b: Регуляція TGFβ2 під дією Notch. Кількісний ПЛР-аналіз експресії TGFβ2 у відповідь на блокаду Notch у культурі клітин HUVEC в тривимірному фібриновому гелі (7 днів) під дією анти-DLL4-антитіла або DBZ (ліворуч) або активація Notch у культурі клітин HUVEC в двовимірному гелі (36 годин) під дією іммобілізованого DLL4 (праворуч), c: Анти-DLL4-антитіло блокує розвиток артерій.

Зображення сітківки, забарвленої альфа-актином гладкого м'яза (ASMA) і ізолектином, отримані для новонародженої миші на конфокальному мікроскопі. Новонароджених мишей обробляли як показані на Фіг. 1d. d: Зображення забарвленої ASMA і ізолектином сітківки, отримані на конфокальному мікроскопі для дорослої миші. 8-тижневих мишей обробляли PBS або aHra-DLL4-антитілом (10 мг/кг, два рази на тиждень) протягом двох тижнів.

Фігура 9: Селективне блокування DLL4 і/або VEGF порушує ангиогенез пухлини й інгібує ріст пухлини, а-f: Результати, отримані для пухлинних моделей: HM7 (a), Colo205 (b), Calu6 (c), MDA-MB-435 (d), MV-522 (e) і WEN13 (f). Представлений середній об'єм пухлини із середньоквадратичною помилкою, g-h: Гістологічний аналіз судин пухлин. Імуногістохімічний аналіз на анти-CD31-антитіла, проведений на зрізах пухлин EL4, узятих у контрольних мишей і в мишей, оброблених анти-DLL4-антитілом і анти-VEGF-антитілом (g): Перфузія лектину й забарвлювання анти-CD31-антитілом у зрізах пухлини EL4 (h). i-p: Результати, отримані для пухлинних моделей: SK-OV-3X1 (i), LL2 (j), EL4 (k), H1299 (l), SKMES-1(m), MX-I(n), SW620(o) і LS174T(p).

Фігура 10: DLL4/Notch не відіграє важливої ролі в гомеостазі мишачої тонкої кишки. Були проведені імуногістохімічні дослідження тонкого кишечника, узятим у контрольних мишей (a, d, g, j), у мишей, оброблених анти-DLL4-антитілом (10 мг/кг, два рази на тиждень протягом 6 тижнів) (b, e, h, k), і в мишей, оброблених DBZ (30 мкмоль/кг щодня протягом 5 днів) (c, f, i, l). Як показало забарвлювання H&E (a, b, c) і альціановим синім (d, e, f), DBZ викликає заміну популяції клітин ТА бокаловидними клітинами. Така зміна повністю була відсутня після обробки анти-DLL4-антитілом. Забарвлювання Кі67 (g, h, i) і HES-1 (j, k, l) додатково підтвердило, що анти-DLL4-антитіло нездатне імітувати дію DBZ.

Фігура 11: Характеризація анти-DLL4-антитіла. а: Картування епітопа моноклонального анти-DLL4-антитіла (Mab) YW26.82. Схематичне представлення набору мутантів DLL4, експресованих у вигляді С-кінцевих гібридних білків лужної фосфатази (ЛФ) у людській плаценті. Середовище, яке кондиціоноване клітинами 293T і містить гібридні білки, тестували на 96-ямкових мікротитраційних планшетах, сенсibilізованих очищеним анти-DLL4-антитілом (YW26.82, 0,5 мкг/мл). Зв'язаний DLL4.AP детектували з використанням 1-Step PNPP (Pierce) як субстрату і вимірювали оптичну густину (OD) на 405 нм. b-d: Селективне зв'язування YW26.82 з DLL4. 96-ямкові планшети Nunc MaxiSorp™ покривали очищеними рекомбінантними білками, як вказано вище (1 мкг/мл). Зв'язування YW26.82 у вказаних концентраціях вимірювали за допомогою ELISA-аналізу. Зв'язані антитіла детектували за допомогою кон'югату «антилюдське антитіло - ПХ» з використанням TMB як субстрату і вимірювали оптичну густину (OD) на 405 нм. Як аналітичний контроль використовували анти-HER 2-антитіло й рекомбінантний ErbB2-ECD (b). FACS-аналіз клітин 293, тимчасово трансфікованих вектором, повнорозмірним DLL4, Jag1 або



DLL1. Значний рівень зв'язування YW26.82 детектувався тільки на DLL4-трансфектованих клітинах (верхня панель). Експресію Jag1 і DLL1 підтверджували шляхом зв'язування рекомбінантного щурячого Notch 1-Fc (rrNotch1-Fc, середня панель) і рекомбінантного щурячого Notch2-Fc (rrNotch2-Fc, нижня панель), відповідно. YW26.82, rrNotch1-Fc або rrNotch2-Fc (систему R & D) використовували в концентрації 2 мкг/мл, потім використовували козяче антитіло проти людського IgG, кон'юговане з ФЕ (1:500, Jackson ImmunoResearch) (с). Анти-DLL4-антитіло блокувало зв'язування DLL4-AP, але не DLL1-AP, з нанесеним rNotch1, при обчисленій IC50 ~12 нМ (ліва панель). Анти-DLL4-антитіло блокувало зв'язування DLL4-His, але не Jag1-His, з нанесеним rNotch1, при обчисленій IC50 ~8 нМ (права панель) (d). e: Специфічне зв'язування YW26.82 з ендогенно експресованим DLL4. FACS-аналіз HUVEC, трансфектованим контрольною або DLL4-специфічно кiПНК. YW26.82 використовували при 2 мкг/мл, потім використовували козяче антитіло проти людського IgG, кон'юговане з ФЕ (1:500, Jackson ImmunoResearch) (e).

Фігура 12: Позитивна регуляція DLL4 за допомогою активації Notch. HUVEC стимулювали іммобілізованим С-кінцевим His-міченим людським DLL4 (амінокислоти 1-404) за відсутності або в присутності DBZ (0,08 мкМ). Через 36 годин після стимуляції, ендогенну експресію DLL4 оцінювали за допомогою FACS-аналізу, проведеного з використанням анти-DLL4-антитіла.

Даний винахід належить до анти-DLL4-антитіл, які можуть бути використані, наприклад, для лікування або попередження патологічних станів, асоційованих з експресією і/або активністю DLL4, наприклад, з підвищеною експресією і/або активністю або з небажаною і/або активністю DLL4. У деяких варіантах винаходу, антитіла відповідно до винаходу використовуються для лікування пухлини, раку і/або клітинно-проліферативного розладу. У деяких варіантах винаходу, антитіла відповідно до винаходу використовуються для лікування патологічного стану, асоційованого з ангиогенезом.

В іншому аспекті винаходу, анти-DLL4-антитіла відповідно до винаходу можуть бути використані як реагенти для детектування і/або виділення DLL4, наприклад, для детектування DLL4 у тканинах і клітинах різних типів.

Даний винахід також належить до способів одержання анти-DLL4-антитіл і поліпептидів, які кодуєть анти-DLL4-антитіла.

#### Загальні методи

Описані або цитовані тут методи й процедури, по суті, добре відомі фахівцям і звичайно застосовуються відповідно до стандартної методики, відомої фахівцям, наприклад, із широко застосовуваною методикою, описаної в керівництвах Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3rd. edition (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. *CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY* (F. M. Ausubel, et al. eds., (2003)); the series *METHODS IN ENZYMOLOGY* (Academic Press, Inc.): *PCR 2: A PRACTICAL APPROACH* (M.

J. MacPherson, B. D. Hames і G. R. Taylor eds. (1995)), Harlow and Lane, eds. (1988) *ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL*, and *ANIMAL CELL CULTURE* (R. I. Freshney, ed. (1987)).

#### Визначення

"Виділене" антитіло являє собою антитіло, яке було ідентифіковане й відділене від компонентів його природного оточення і/або виділене з таких компонентів. Домішковими компонентами його природного оточення є речовини, які можуть негативно впливати на діагностичне або терапевтичне застосування вказаного антитіла, і такими речовинами можуть бути ферменти, гормони й інші білкові або не-білкові розчинені речовини. У переважних варіантах винаходу, вказане антитіло може бути очищене (1) більш ніж на 95% по масі антитіла, як може бути визначено методом Лаурі, найбільш переважно, більш ніж на 99% по масі антитіла, (2) до рівня, достатнього для продукування N-кінцевої або внутрішньої амінокислотної послідовності, що складається щонайменше з 15 залишків, з використанням секвенатора із центрифугальними чашками, або (3) до гомогенності, оцінюваної за допомогою електрофорезу в ПААГ-ДСН у відновлювальних або в невідновлювальних умовах, з використанням кумасі синього, або, переважно, срібного барвника. Виділеним антитілом є антитіло *in situ* у рекомбінантних клітинах, оскільки в них відсутній щонайменше один компонент природного оточення цього антитіла. Аналогічним чином, виділеним антитілом є антитіло в середовищі, що оточує рекомбінантні клітини. Однак, звичайно, виділене антитіло може бути отримане щонайменше в одну стадію очищення.

«Виділена» молекула нуклеїнової кислоти являє собою молекулу нуклеїнової кислоти, яка була ідентифікована й відділена щонайменше від однієї домішкової молекули нуклеїнової кислоти, з якою вона звичайно асоціюється в природному джерелі нуклеїнової кислоти, яка кодує антитіло. Виділена молекула нуклеїнової кислоти має форму або структуру, що відрізняється від форми або структури природної молекули. Отже, виділені молекули нуклеїнової кислоти відрізняються від молекул нуклеїнової кислоти, які присутні у природних клітинах. Однак, виділена молекула нуклеїнової кислоти включає молекулу нуклеїнової кислоти, яка міститься в клітинах, які звичайно експресують антитіло, де, наприклад, молекула нуклеїнової кислоти присутня в хромосомі в положенні, що відрізняється від положення цієї нуклеїнової кислоти в природних клітинах.

Використовуваний тут термін "залишок варіабельного домену, пронумерований по Кебату" або "амінокислотне положення, пронумероване по Кебату" і їхні варіанти означає систему, використовувану для нумерації варіабельних доменів важкого ланцюга або варіабельних доменів легкого ланцюга антитіл, описаної в довіднику по антитілах Кебата (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Відповідно до цієї системи нумерації, фактична первинна амінокислотна послідовність може містити менше число або додаткове число аміно-

кислот, що відповідає вкороченій або подовженій FR- або CDR-області варіабельного домену. Так, наприклад, варіабельний домен важкого ланцюга може включати інсерцію однієї амінокислоти (залишку 52a відповідно до нумерації Кебата) після залишку 52 H2, і залишки (наприклад, залишки 82a, 82b і 82c і т.п., відповідно до нумерації Кебата), вбудовані після залишку 82 FR важкого ланцюга. Нумерація залишків даного антитіла по Кебату може бути здійснена після вирівнювання його послідовності в областях гомології зі "стандартною" послідовністю, пронумерованою по Кебату.

Використовувані тут терміни "по суті, аналогічний" або "по суті, той же самий" означають достатньо високий ступінь подібності між двома чисельними величинами (звичайно, між одною величиною, що відповідає антитілу відповідно до винаходу, і іншою величиною, що відповідає еталонному/порівнюваному антитілу), саме, такий ступінь подібності, що дозволяв би фахівцеві в даній галузі вважати розходження між цими двома величинами несуттєвим або біологічно і/або статистично незначними відносно їх біологічних властивостей, зумовлених вказаними величинами (наприклад, величинами Kd). Розходження між вказаними двома величинами становить, переважно, менше ніж приблизно 50%, більш переважно, менше ніж приблизно 40%, ще більш переважно, менше ніж приблизно 30%, ще більш переважно, менше ніж приблизно 20%, найбільш переважно, менше ніж приблизно 10% у порівнянні з величинами еталонного/порівнюваного антитіла.

Термін "афінність зв'язування", по суті, означає силу сумарних нековалентних взаємодій одного сайту зв'язування молекули (наприклад, антитіла) з його партнером по зв'язуванню (наприклад, з антигеном). Якщо це не обговорено особливо, то використовуваний тут термін "афінність зв'язування" означає природну афінність зв'язування, при якій відбувається взаємодія 1:1 між членами пар зв'язування (наприклад, антитіла з антигеном). Афінність зв'язування молекули X з її партнером Y, в загальних рисах, може називатися константою дисоціації (Kd). Афінність може бути визначена стандартними методами, відомими фахівцям, включаючи описані тут методи. Низькоафінні антитіла звичайно зв'язуються з антигеном з меншою швидкістю й мають тенденцію легко дисоціюватися, тоді як високоафінні антитіла звичайно зв'язуються з антигеном з більшою швидкістю й мають тенденцію залишатися зв'язаними протягом більш тривалого періоду часу. Фахівцям у даній галузі відомі різні методи вимірювання афінності зв'язування, і для здійснення даного винаходу може бути застосований будь-який із цих методів. Конкретні репрезентативні варіанти здійснення винаходи описані нижче.

В одному з варіантів винаходу, "Kd" або "величину Kd" відповідно до винаходу визначають за допомогою аналізу на зв'язування з радіоактивно міченим антигеном (PIA), здійснюваного з використанням Fab-варіанта антитіла, що представляє інтерес, і його антигену, описаного нижче, де вказаний аналіз дозволяє вимірювати афінність зв'язування Fab з антигеном у розчині шляхом врівно-

важування Fab мінімальною концентрацією  $^{125}\text{I}$ -міченого антигену в присутності титраційного набору немічених антигенів, з наступною іммобілізацією зв'язаного антигену на планшеті, сенсibilізованому антитілом проти Fab-фрагмента (Chen et al. (1999) J. Mol. Biol. 293:865-881). З метою створення відповідних умов для аналізу, мікротитраційні планшети (Dyplex) сенсibilізують протягом ночі 5 мкг/мл зв'язувального анти-Fab-антитіла (Cappel Labs) в 50 mM карбонаті натрію (pH 9,6), потім блокують 2%-ним (мас/об.) альбумін бичачої сироватки в PBS протягом 2-5 годин при кімнатній температурі (приблизно при 23 °C). У неадсорбуючому планшеті (Nunc # 269620), 100 pM або 26 pM  $^{125}\text{I}$ -антигену змішують із серійними розведеннями Fab, що представляє інтерес (наприклад, відповідно до оцінки анти-VEGF-антитіла, Fab-12, Presta et al. (1997) Cancer Res. 57:4593-4599). Потім Fab, що представляє інтерес, інкубують протягом ночі, однак, для гарантії досягнення рівноваги, інкубування може бути проведене протягом більше тривалого періоду часу (наприклад, 65 годин). Після цього суміші переносять у планшет для іммобілізації й інкубують при кімнатній температурі (наприклад, протягом однієї години). Потім розчин видаляють і планшет вісім разів промивають 0,1% Твіном-20 в PBS. Після сушіння планшетів додають 150 мкл/ямку сцинтиляційної рідини (MicroScint™-20; Packard), і планшети підраховують на гамма-лічильнику Topcount (Packard) протягом десяти хвилин. Концентрації кожного Fab, які становлять 20% або менше від максимального зв'язування, відбирають для їхнього використання в аналізах на конкурентне зв'язування. Відповідно до іншого варіанта винаходу, Kd або величину Kd вимірюють в аналізі методом поверхневого плазмонного резонансу з використанням Biacore™-2000 або Biacore™-3000 (Biacore, Inc., Piscataway, NJ) при 25°C з використанням чіпів CM5 з іммобілізованим на них антигеном при величині одиниць відгуку (RU), що становить ~10. Коротко, біосенсорні чіпи з карбоксиметильованим декстраном (CM5, Biacore Inc.) активують гідрохлоридом N-етил-N'-(3-диметиламінопропіл)карбодііміду (EDC) і N-гідроксисукцинімідом (NHS) відповідно до інструкцій постачальників. Антиген розводять 10 mM ацетатом натрію, pH 4,8, до 5 мкг/мл (~0,2 мкМ), потім ін'єктують при швидкості потоку 5 мкл/хвилину до досягнення величини одиниць відгуку (RU) зв'язаного білка, що становить ~10. Після ін'єкції антигену, для блокування непрореагувавших груп вводять 1M етаноламін. Для вимірювання кінетики реакції вводять ін'єкції дворазових серійних розведень Fab (0,78 nM-500 nM) в PBS, що містить 0,05% твіну® 20 (PBST) при 25°C і при швидкості потоку приблизно 25 мкл/хв. Швидкість асоціації ( $k_{on}$ ) і швидкість дисоціації ( $k_{off}$ ) обчислюють із використанням простої лангмюрівської моделі зв'язування 1:1 (Biacore Evaluation Software version 3.2) при одночасній побудові сенсорних асоціації й дисоціації. Константу рівноважної дисоціації (Kd) обчислюють як відношення  $k_{off}/k_{on}$ . Див., наприклад, Chen, Y., et al. (1999) J. Mol. Biol. 293:865-881. Якщо швидкість асоціації перевищує  $10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ .

$s^{-1}$ , як було визначено вище методом поверхневого плазмонного резонансу, то така швидкість асоціації може бути визначена методом гасіння флуоресценції, що дозволяє вимірювати збільшення або зменшення інтенсивності флуоресцентного випромінювання (збудження = 295 нм; випромінювання = 340 нм, смуга пропускання 16 нм) при 25°C для 20 нМ антитіла проти антигену (в Fab-формі) в PBS, pH 7,2, у присутності зростаючих концентрацій антигену, як було виміряно на спектрометрі, такому як спектрофотометр, оснащений обмежником потоку (Aviv Instrument), або на спектрофотометрі SLM-Aminco серії 8000 (ThermoSpectronic), оснащеному кюветою для перемішування, що містить червоний барвник.

"Швидкість асоціації" або " $k_{on}$ " відповідно до винаходу може бути також визначена описаним вище методом поверхневого плазмонного резонансу з використанням Biacore™-2000 або Biacore™-3000 (Biacore, Inc., Piscataway, NJ) при 25°C і з використанням чипів CM5 з іммобілізованим на них антигеном при величині одиниць відгуку (R.U), що становить ~10. Коротко, біосенсорні чіпи з карбоксиметильованим декстраном (CM5, Biacore Inc.) активують гідрохлоридом N-етил-N'-(3-диметиламінопропіл)карбодііміду (EDC) і N-гідроксисукцинімідом (NHS) відповідно до інструкцій постачальників. Антиген розводять 10 мМ - ацетатом натрію, pH 4;8, до 5 мкг/мл (~0,2 мкМ) потім ін'єктують при швидкості потоку 5 мкл/хвилину до досягнення величини одиниць відгуку (RU) зв'язаного білка, що становить ~10. Після ін'єкції антигену, для блокування непрореагувавших груп вводять 1М етаноламін. Для вимірювання кінетики реакції ін'єктують дворазові серійні розведення Fab (0,78 нМ-500 нМ) в PBS, що містить 0,05% твіну® 20 (PBST) при 25°C і при швидкості потоку приблизно 25 мкл/хв. Швидкість асоціації ( $k_{on}$ ) і швидкості дисоціації ( $k_{off}$ ) обчислюють із використанням простої лангмюрівської моделі зв'язування 1:1 (Biacore Evaluation Software version 3.2) при одночасній побудові сенсорграм асоціації й дисоціації. Константу рівноважної дисоціації ( $K_d$ ) обчислюють як відношення  $k_{off}/k_{on}$ . Див., наприклад, Chen, Y., et al. (1999) J. Mol. Biol. 293:865-881. Однак, якщо швидкість асоціації перевищує  $10^6 M^{-1} \cdot s^{-1}$ , як було визначено вище за допомогою аналізу методом поверхневого плазмонного резонансу, то таку швидкість асоціації переважно визначають методом гасіння флуоресценції, що дозволяє вимірювати збільшення або зменшення інтенсивності флуоресцентного випромінювання (збудження = 295 нм; випромінювання = 340 нм, смуга пропускання 16 нм) при 25°C для 20 нМ антитіла проти антигену (в Fab-формі) в PBS, pH 7,2, у присутності зростаючих концентрацій антигену, які вимірюються на спектрометрі, такому як спектрофотометр, оснащений обмежником потоку (Aviv Instrument), або на спектрофотометрі SLM-Aminco серії 8000 (ThermoSpectronic), оснащеному кюветою для перемішування.

Використовуваний тут термін "вектор" означає молекулу нуклеїнової кислоти, здатну переносити іншу нуклеїнову кислоту, до якої вона приєднана. Одним типом векторів є "плазмід", що представ-

ляє собою кільцеву дволанцюжкову ДНК-петлю, з якої можуть бути ліговані додаткові ДНК-сегменти. Іншим типом вектора є фаговий вектор. Ще одним типом вектора є вірусний вектор, у якому додаткові ДНК-сегменти можуть бути ліговані з вірусним геномом. Деякі вектори здатні автономно реплікуватися в клітині-хазяїні, у яку вони були введені (наприклад, бактеріальні вектори, що мають бактеріальний оріджин реплікації, і епісомні вектори ссавців). Інші вектори (наприклад, не-епісомні вектори ссавців) можуть інтегруватися в геном клітини-хазяя після їхнього введення в вказану клітину-хазяя, у результаті чого вони можуть реплікуватися разом з геномом хазяя. Крім того, деякі вектори здатні регулювати експресію - генів, до яких вони були функціонально приєднані. Такі вектори називаються тут "рекомбінантними експресійними векторами" (або просто "рекомбінантними векторами"). В загальних рисах, експресійні вектори, звичайно застосовувані в методах рекомбінантних ДНК, часто мають форму плазмід. У даному описі, терміни "плазмід" і "вектор" можуть бути взаємозамінними, оскільки плазмід є найпоширенішою формою вектора.

Використовувані тут терміни "полінуклеотид" або "нуклеїнова кислота" є взаємозамінними й означають полімери будь-якої довжини, що складаються з нуклеотидів, і такими полімерами є ДНК і РНК. Нуклеотидами можуть бути дезоксирибонуклеотиди, рибонуклеотиди, модифіковані нуклеотиди або основи і/або їхні аналоги, або будь-який субстрат, що може бути включений у полімер за допомогою ДНК- або РНК-полімерази, або за допомогою реакції синтезу. Полінуклеотид може містити модифіковані нуклеотиди, такі як метильовані нуклеотиди і їхні аналоги. Якщо це необхідно, то модифікація нуклеотидної структури може бути здійснена до або після збирання полімеру. Нуклеотидні послідовності можуть перериватися не-нуклеотидними компонентами. Полінуклеотид може бути додатково модифікований після синтезу, наприклад, шляхом його кон'югування з міткою. Модифікаціями інших типів є, наприклад, "кепи"; заміна одного або декількох природних нуклеотидів їхніми аналогами; міжнуклеотидні модифікації, такі як, наприклад, модифікації шляхом введення незаряджених зв'язків (наприклад, метилфосфонатів, фосфотриєфірів, фосфоамідатів, карбаматів і т.п.) і заряджених зв'язків (наприклад, фосфортіоатів, фосфордитіоатів і т.п.); модифікації, що містять бічні групи, такі як, наприклад, білки (наприклад, нуклеази, токсини, антитіла, сигнальні пептиди, полі-L-лізин, і т.п.); модифікації, що містять інтеркалюючі агенти (наприклад, акридин, псорален і т.п.); модифікації, що містять хелатоутворювальні агенти (наприклад, метали, радіоактивні метали, бор, метали-окислювачі й т.п.); модифікації, що містять алкілюючі агенти; модифікації, що містять модифіковані зв'язки (наприклад, альфа-аномерні нуклеїнові кислоти й т.п.), також немодифіковані форми полінуклеотиду(ів). Крім того, будь-які гідроксильні групи, звичайно присутні в цукрах, можуть бути замінені, наприклад, фосфонатними групами й фосфатними групами; захищені стандартними захисними групами; або активо-

вані з утворенням додаткових зв'язків з додатковими нуклеотидами; або вони можуть бути кон'юговані із твердими або напівтвердими носіями. 5'- і 3'-кінцві ОН можуть бути фосфорильовані або заміщені амінами або органічними "кепуючими" групами, які складаються з 1-20 атомів вуглецю. Інші гідроксили можуть бути також дериватизировані стандартними захисними групами. Полінуклеотиди можуть також містити аналогічні форми цукрів, таких як рибоза або дезоксирибоза, відомих фахівцям, включаючи, наприклад, 2'-метилрибозу-2'-О-алілрибозу; 2'-фтор- або 2'-азидорибозу; карбоциклічні аналоги цукрів; альфа-аномерні цукри; епімерні цукри, такі як арабіноза, ксилоза або ліксоза; цукор піранозу, цукор фуранозу; седогептулозу; ациклічні аналоги й основні нуклеозилні аналоги, такі як метилрибозид. Один або декілька фосфодієфірних зв'язків можуть бути замінені альтернативними лінкерними групами. Такими альтернативними лінкерними групами є, але не обмежуються ними, варіанти, у яких фосфат замінений P(O)S ("тіоат"), P(S)S ("дитіоат"), (O)NR<sub>2</sub> ("амідат"), P(O)R, P(O)OR', C або CH<sub>2</sub> ("формацеталь"), де кожний з R або R' незалежно являє собою H або заміщений або незаміщений алкіл (C<sub>1-20</sub>), який необов'язково містить ефірний зв'язок (-O-), арил, алкеніл, циклоалкіл, циклоалкеніл або аралділ. Не всі зв'язки в полінуклеотиді повинні бути ідентичними. Вищенаведений опис належить до всіх використовуваних тут полінуклеотидів, включаючи РНК і ДНК.

Використовуваний тут термін "олігонуклеотид", в загальних рисах, означає короткі, в основному, одноланцюжкові, звичайно синтетичні полінуклеотиди, довжина яких становить, головним чином, але необов'язково, менше ніж приблизно 200 нуклеотидів. Терміни "олігонуклеотид" і "полінуклеотид" не є взаємовиключними. Вищенаведений опис полінуклеотидів може однаково й повністю належати до олігонуклеотидів.

"Відсоток (%) ідентичності амінокислотних послідовностей" пептидів або поліпептидів визначають як відсоток амінокислотних залишків у послідовності-кандидаті, які ідентичні амінокислотним залишкам у конкретній пептидній або поліпептидній послідовності, після вирівнювання цих послідовностей і введення в них "пробілів", якщо це необхідно, для досягнення максимального відсотка ідентичності послідовностей, причому які-небудь консервативні заміни не розглядаються як частина ідентичних послідовностей. Вирівнювання, здійснюване з метою визначення відсотка ідентичності амінокислотних послідовностей, може бути проведене різними методами, відомими фахівцям, наприклад, з використанням загальнодоступних комп'ютерних програм, таких як програми BLAST, BLAST-2, ALIGN або MegAlign (DNASTAR). Фахівець у даній галузі може самостійно визначити відповідні параметри вирівнювання, включаючи використання будь-яких алгоритмів, необхідних для досягнення оптимального вирівнювання по всій довжині порівнюваних послідовностей. Однак, в цілях даного винаходу, % ідентичності амінокислотних послідовностей обчислюють із застосуванням комп'ютерних програм ALIGN-2, використаної

для порівняння послідовностей. Комп'ютерна програма ALIGN-2, призначена для порівняння послідовностей, була розроблена фірмою Genentech, Inc. і вказаний вихідний код був зареєстрований у документації для користувачів у Відомстві по копірайту США, Вашингтон, D.C., 20559, під реєстраційним номером U.S. Copyright Registration № TXU510087. Програма ALIGN-2 є загальнодоступною програмою, що поставляється фірмою Genentech, Inc., South San Francisco, California. Програма ALIGN-2 повинна бути складена для застосування в операційній системі UNIX, переважно, у цифровій системі UNIX V4.0D. Всі параметри порівняння послідовностей були встановлені в програмі ALIGN-2 і не змінювалися.

У випадку, якщо для порівняння амінокислотних послідовностей використовується програма ALIGN-2, то % ідентичності даної амінокислотної послідовності A з даною амінокислотною послідовністю B (яка альтернативно може бути названа даною амінокислотною послідовністю A, що має або становить певний % ідентичності з даною амінокислотною послідовністю B) обчислюють наступним чином:

$$100 \cdot X/Y,$$

де X являє собою число амінокислотних залишків, які були оцінені як повністю відповідні при вирівнюванні послідовностей з використанням програми ALIGN-2, за допомогою якої проводили порівняння послідовностей A і B, і де Y являє собою повне число амінокислотних залишків у послідовності B. При цьому, слід зазначити, що якщо довжина амінокислотної послідовності A не дорівнює довжині амінокислотної послідовності B, то % ідентичності амінокислотної послідовності A амінокислотної послідовності B не дорівнює % ідентичності амінокислотної послідовності B амінокислотної послідовності A.

Якщо це не обговорено особливо, то загальний % ідентичності використовуваних тут амінокислотних послідовностей обчислювали як описані в попередньому параграфі з використанням комп'ютерної програми ALIGN-2.

Використовуваний тут термін «DLL4» (який є синонімом терміну «дельта-подібний 4»), означає, якщо це не обговорено особливо або не виходить з контексту винаходу, будь-який нативний або модифікований (природний або синтетичний) поліпептид DLL4. Термін «нативна послідовність», зокрема, охоплює природні зрізані або секретовані форми (наприклад, послідовність позаклітинного домена), природні варіанти (наприклад, альтернативно сплайсовані форми) і природні алельні варіанти. Термін «DLL4 дикого типу», в основному, означає поліпептид, що містить амінокислотну послідовність природного білка DLL4. Термін «послідовність DLL4 дикого типу», в основному, означає амінокислотну послідовність, яка присутня у природному DLL4.

Використовуваний тут термін «рецептор Notch» (який є синонімом терміну «Notch»), означає, якщо це не обговорено особливо або не виходить з контексту винаходу, будь-який нативний або модифікований (природний або синтетичний) поліпептид рецептора Notch. У людини присутній

чотири рецептори Notch (Notch 1, Notch2, Notch3 і Notch4). Використовуваний тут термін «рецептор Notch» включає будь-який один або всі чотири людських рецептори Notch. Термін «нативна послідовність», зокрема, охоплює природні зрізані або секретовані форми (наприклад, послідовність позаклітинного домена), природні варіанти (наприклад, альтернативно сплайсовані форми) і природні алельні варіанти. Термін «рецептор Notch дикого типу», в основному, означає поліпептид, що містить амінокислотну послідовність природного білка рецептора Notch. Термін «послідовність рецептора Notch дикого типу», в основному, означає амінокислотну послідовність, яка присутня у природному рецепторі Notch.

Використовувані тут терміни «антитіло» і «імуноглобулін» є синонімами, вживаними в найширшому змісті, і включають моноклональні антитіла (наприклад, повнорозмірні або інтактні моноклональні антитіла), поліклональні антитіла, полівалентні антитіла, мультиспецифічні антитіла (наприклад, біспецифічні антитіла, за умови, що вони мають потрібну біологічну активність), також можуть включати деякі фрагменти антитіла (більш докладно описані нижче). Антитіло може бути людським, гуманізованим і/або афінно зрілим.

Термін «варіабельний» належить до деяких частин варіабельних доменів, які мають значні відмінності в послідовностях різних антитіл і беруть участь у зв'язуванні кожного конкретного антитіла з його конкретним антигеном, також визначають специфічність кожного конкретного антитіла стосовно його конкретного антигену. Однак, варіабельність нерівномірно розподіляється по всіх варіабельних доменах антитіла. Вона концентрується в трьох сегментах, які називаються комплементарність-визначаючими областями (CDR) або гіперваріабельними областями (HVR), присутніми у варіабельних доменах як легкого, так і важкого ланцюга. Найбільш висококонсервативні частини варіабельних доменів називаються каркасними областями (FR). Кожний варіабельний домен нативного важкого й легкого ланцюгів містить чотири FR, що мають, головним чином,  $\beta$ -складчасту конфігурацію й з'єднані трьома CDR, які утворюють петлі, що з'єднують, у деяких випадках, що утворюють частину  $\beta$ -складчастої структури. Гіперваріабельні області (CDR) у кожному ланцюзі втримуються в безпосередній близькості одна від одної за допомогою FR, і, разом CDR іншого ланцюга, беруть участь в утворенні антигензв'язувального сайту антитіла (див. Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Константні домени не беруть особистої участі у зв'язуванні антитіла з антигеном, але мають різні ефекторні функції, такі як участь антитіла в антитіло-залежній клітинній цитотоксичності.

Гідроліз антитіла папаїном приводить до продукування двох ідентичних антиген-зв'язувальних фрагментів, які називаються "Fab"-фрагментами, кожний з яких має один антигензв'язувальний сайт, і іншого Fc-фрагмента, позначення якого вказує на його здатність до швидкої кристалізації. Обробка пепсином приводить до утворення

P(ab')<sub>2</sub>-фрагменту, що має два антигензв'язувальних сайти й має здатність перехресно зв'язуватися з антигеном.

«Ev» являє собою мінімальний фрагмент антитіла, що містить повнорозмірний сайт розпізнавання антигену й антигензв'язувальний сайт антитіла. У дволанцюжковому Fv, ця область складається з димера, що включає один варіабельний домен важкого ланцюга й один варіабельний домен легкого ланцюга, жорстко зв'язані нековалентним зв'язком. В одностанцюжковому Fv, один варіабельний домен важкого ланцюга й один варіабельний домен легкого ланцюга може бути ковалентно зв'язаний гнучким пептидним лінкером, у результаті чого, легкий й важкий ланцюги можуть асоціюватися один з одним з утворенням «димерної» структури, аналогічної структурі дволанцюжкового Fv. Він має таку конфігурацію, при якій три CDR кожного варіабельного домену взаємодіють один з одним і визначають антигензв'язувальний сайт на поверхні димера VH-VL. У цілому, шість CDR надають даному антитілу антигензв'язувальності специфічності. Однак, навіть один варіабельний домен (або половина Fv, що містить тільки три CDR, специфічних до антигену) може мати здатність розпізнавати антиген і зв'язуватися із цим антигеном, хоча, можливо, з більш низькою афінністю, ніж повний сайт зв'язування.

Fab-фрагмент також містить константний домен легкого ланцюга й перший константний домен (CH1) важкого ланцюга. Fab'-фрагменти відрізняються від Fab-фрагментів декількома залишками, приєднаними в карбокси-кінця домена CH1 важкого ланцюга, включаючи один або декілька цистеїнів від шарнірної області антитіла. Fab'-SH являє собою Fab', у якому цистеїновий(і) залишок(шки) константних доменів мають вільну тіолову групу. По своїй природі, F(ab')<sub>2</sub>-фрагменти антитіла продукуються як пари Fab'-фрагментів, які зв'язані між собою шарнірними цистеїновими залишками. Відомі також і інші хімічні зв'язки фрагментів антитіла.

«Легкі ланцюги» антитіла (імуноглобулінів), що походять від хребетних будь-якого виду, можуть бути віднесені до одного із двох абсолютно різних типів ланцюгів, які називаються каппа ( $\kappa$ ) і лямбда ( $\lambda$ ), виходячи з амінокислотних послідовностей їх константних доменів.

Імуноглобуліни, залежно від амінокислотної послідовності константного домена їхніх важких ланцюгів, можуть бути віднесені до різних класів. Існує п'ять основних класів імуноглобулінів: IgA, IgD, IgE, IgG і IgM, і деякі з них можуть бути також розділені на підкласи (ізотипи), наприклад, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub> і IgA<sub>2</sub>. Константні домени важкого ланцюга, які відповідають імуноглобулінам різних класів, позначаються  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  і  $\mu$ , відповідно. Субодиничні структури й тривимірні конфігурації імуноглобулінів різних класів добре відомі фахівцям.

«Фрагменти антитіла» містять тільки частину інтактного антитіла, де вказана частина, якщо вона присутня в інтактному антитілі, переважно, зберігає щонайменше одну функцію, переважно, більшість функцій або всі функції, звичайно властиві такій частині природного інтактного антитіла. При-

кладами фрагментів антитіл є Fab-, Fab'-, F(ab')<sub>2</sub>- і Fv-фрагменти; діантитіла; лінійні антитіла; молекули одноланцюжкових антитіл; і мультиспецифічні антитіла, утворені із фрагментів антитіл. В одному з варіантів винаходу, фрагмент антитіла містить антигензв'язувальний сайт інтактного антитіла, тому він зберігає свою здатність зв'язуватися з антигеном. В іншому варіанті винаходу, фрагмент антитіла, наприклад, фрагмент, що містить Fc-область, якщо він присутній в інтактному антитілі, зберігає щонайменше одну з біологічних функцій, звичайно властивих Fc-області інтактного антитіла, таких як зв'язування з FcRn, здатність модулювати час напівжиття антитіла, ADCC-функція й зв'язування з комплементом. В одному з варіантів винаходу, фрагментом антитіла є одновалентне антитіло, що має час напівжиття *in vivo*, в основному, аналогічний часу напівжиття інтактного антитіла. Так, наприклад, такий фрагмент антитіла може містити антигензв'язувальну область, приєднану до послідовності Fc і здатну надавати вказаному фрагменту стабільності *in vivo*.

Використовувані тут терміни "гіперваріабельна область", "HVR" або "HV" означають області варіабельного домену антитіла, які є в даній послідовності гіперваріабельними і/або утворюють петлі

певної структури. В загальних рисах, вказані антитіла містять шість гіперваріабельних областей; три області в VH (H1, H2, H3) і три області в VL (L1, L2, L3). У даній заявці використовується ряд гіперваріабельних областей, що входить в об'єм даного винаходу. Гіперваріабельні області (комплементарність-визначаючі області (CDR)) по Кебату мають високий ступінь варіабельності послідовності й знаходять найбільш часте застосування (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Замість визначення гіперваріабельних областей по Кебату, Чотія запропонував визначати гіперваріабельні області по локалізації структурних петель (Chothia & Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). Визначення гіперваріабельних областей AbM являє собою компроміс між "CDR" по Кебату й "структурними петлями" по Чотія, і такі визначення використовуються в комп'ютерній програмі по моделюванню антитіл Oxford Molecular's AbM. "Контактні" гіперваріабельні області визначають виходячи з аналізу наявних складних кристалічних структур. Залишки кожної із цих гіперваріабельних областей приводяться нижче.

Петля	По Кебату	AbM	По Чотія	Контактні області
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H 26-H32	H30-H35B
(Нумерація по Кебату)				
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
(Нумерація по Чотія)				
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

Термін "гіперваріабельні області" може включати "подовжені гіперваріабельні області", а саме: 24-36 або 24-34 (L1), 46-56 або 50-56 (L2) і 89-97 (L3) в VL; і 26-35 (H1), 50-65 або 49-65 (H2) і 93-102, 94-102 або 95-102 (H3) в VH. Залишки варіабельних доменів для кожного із вказаних визначень пронумеровані по Кебату й ін., див. вище.

"Каркасами" або "FR" залишками є залишки варіабельних доменів, за винятком залишків гіперваріабельних областей, визначених вище.

Використовуваний тут термін «моноклональне антитіло» означає антитіло, яке походить від популяції, в основному, гомогенних антитіл, тобто окремі антитіла, що входять у таку популяцію, є ідентичними і/або зв'язуються з тим самим (тими самими) епітопом(ами), за винятком можливих варіантів, які можуть утворюватися в процесі продукування моноклонального антитіла, де вказані варіанти, в основному, присутні в незначних кількостях. Таким моноклональним антитілом звичайно є антитіло, що містить поліпептидну послідовність, яка зв'язується з мішенню, де вказану поліпептидну послідовність, що зв'язується з мішенню, одержують способом, що включає відбір однієї поліпептидної послідовності, що зв'язується з мішенню, з множини поліпептидних послідовностей. Так, наприклад, такий спосіб відбору може

являти собою відбір унікального клону з множини клонів, таких як пул гібридомних клонів, фагових клонів або рекомбінантних ДНК-клонів. При цьому, слід зазначити, що вибрана послідовність, що зв'язується з мішенню, може бути також модифікована, наприклад, для підвищення афінності до мішені, для гуманізації послідовності, що зв'язується з мішенню, для поліпшення її продукування в клітинній культурі, для зниження її імуногенності *in vivo*, для створення мультиспецифічного антитіла й т.п., і що вказане антитіло, яке містить модифіковану мішень-зв'язувальну послідовність, також являє собою моноклональне антитіло відповідно до винаходу. На відміну від препаратів поліклональних антитіл, якими звичайно є різні антитіла, спрямовані проти різних детермінант (епітопів), кожне моноклональне антитіло в препараті моноклональних антитіл спрямоване проти однієї детермінанти на антигені. Препарати моноклональних антитіл, крім їхньої специфічності, мають і інші переваги, тобто вони звичайно не містять інших домішкових імуноглобулінів. Термін «моноклональний» визначає характер антитіла, отриманого, в основному, з гомогенної популяції антитіл, але не означає, що це антитіло повинне бути продукowane яким-небудь конкретним методом. Так, наприклад, моноклональні антитіла, використовувани

відповідно до даного винаходу, можуть бути отримані різними методами, включаючи, наприклад, гібридомний метод (наприклад, Kohler et al., *Nature*, 256:495 (1975); Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling et al., in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681, (Elsevier, N.Y., 1981)), методи рекомбінантних ДНК (див., наприклад, патент США № 4816567), технології фагового представлення (див., наприклад, Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2):299-310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 101 (34): 12467-12472 (2004); i Lee et al. *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132 (2004), і методи продукування людських або гуманізованих антитіл у тварин, які мають частини або всі локуси людського імуноглобуліну або гени, що кодують послідовності людського імуноглобуліну (див., наприклад, WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggemann et al., *Year in Immunol.*, 7:33 (1993); патенти США № 5545806; .5569.825; 5591669 „(усе від. GenPharm)і 5545807j WO 1997/17852; патента США № 5545807; 5545806; 5569825; 5625126; 5633425 і 5661016; Marks et al., *Bio/Technology*, 10: 779-783 (1992); Lonberg et al., *Nature*, 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature*, 368: 812-813 (1994); Fishwild et al. *Nature Biotechnology*, 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology*, 14: 826 (1996); and Lonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol*, 13: 65-93 (1995).

«Гуманізовані» форми не-людських антитіл (наприклад, мишачих антитіл) являють собою химерні антитіла, які містять мінімальну послідовність, що походить від не-людського імуноглобуліну. Здебільшого, гуманізовані антитіла являють собою людські імуноглобуліни (антитіло реципієнта), у яких залишки, що походять від гіперваріабельної області даного антитіла-реципієнта, замінені залишками, що походять від гіперваріабельної області не-людського антитіла (донорного антитіла), такого як мишаче антитіло, щуряче антитіло, кроляче антитіло або антитіло приматів, що не є людиною, де вказані антитіла мають потрібну специфічність, афінність і зв'язувальну здатність. У деяких випадках, залишки каркасної області (FR) людського імуноглобуліну замінені відповідними не-людськими залишками. Крім того, гуманізовані антитіла можуть містити залишки, не виявлені в антитілі реципієнта або в антитілі донора. Ці модифікації вводять для поліпшення властивостей антитіла. В загальних рисах, гуманізоване антитіло може містити, в основному, всі або щонайменше один, звичайно два варіабельних домени, у яких всі або майже всі гіперваріабельні петлі відповідають гіперваріабельним петлям не-людського імуноглобуліну, і всі або майже всі FR являють собою FR з послідовністю людського імуноглобуліну. Гуманізоване антитіло також містить, але необов'язково, щонайменше частину константної області імуноглобуліну (Fc), звичайно, області

людського імуноглобуліну. Більш докладний опис див. в Jones et al. *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al. *Nature* 332:323-329 (1998) і в Presta Curr. Op. Struct. Biol, 2:593-596 (1992). Див. також нижченаведені оглядові статті й цитовані там роботи: Vaswani and Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurlle and Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994).

«Химерні антитіла» (імуноглобуліни) мають частину важкого і/або легкого ланцюга, ідентичного або гомологічного відповідним послідовностям антитіл, що походять від конкретного виду або належать до конкретного класу або підкласу, інший(і) ланцюг(и) ідентичний(и) або гомологічний(и) відповідним послідовностям антитіл, що походять від іншого виду або належать до іншого класу або підкласу антитіл, також від фрагментів таких антитіл, за умови, що вони мають потрібну біологічну активність (патент США № 4816567; i Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984)). Використовуване тут гуманізоване антитіло являє собою підпослідовність химерних антитіл.

«Одноланцюжковий Fv-фрагмент» або « scFv-фрагмент» антитіл включає домени VH і VL антитіла, де вказані домени присутні в одному поліпептидному ланцюзі. Звичайно, поліпептид scFv також містить між домонами VH і VL поліпептидний лінкер, який забезпечує утворення scFv зі структурою, необхідною для зв'язування з антигеном. Опис scFv можна знайти в роботі Pluckthun «The Pharmacology of Monoclonal Antibodies», vol. 113, Rosenberg & Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp.269-315 (1994).

Термін «антиген» означає попередньо визначений антиген, з яким може селективно зв'язуватися антитіло. Антигеном-мішенню може бути поліпептид, вуглевод, нуклеїнова кислота, ліпід, гаптен або інша природна або синтетична сполука. Переважним антигеном-мішенню є поліпептид.

Термін "діантитіла" означає невеликі фрагменти антитіл із двома антигензв'язувальними сайтами, де вказані фрагменти включають варіабельний домен важкого ланцюга (VH), з'єднаний з варіабельним доменом легкого ланцюга (VL) в одному і тому ж поліпептидному ланцюзі (VH-VL). Якщо лінкер є занадто коротким для утворення пари між двома домонами на одному і тому ж ланцюзі, то домени змушені спарюватися з комплементарними домонами іншого ланцюга й утворювати два антигензв'язувальних сайти. Діантитіла більш докладно описані, наприклад, в EP 404097; в WO 93/11161 і в Hollinger et al. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 90:6444-6448 (1993).

«Людське антитіло» являє собою антитіло, що має амінокислотну послідовність, яка відповідає амінокислотній послідовності антитіла, продукowanego в людини і/або отриманого будь-якими описаними тут методами конструювання людських антитіл. Таке визначення людського антитіла, зокрема, виключає гуманізоване антитіло, що містить не-людські антигензв'язувальні залишки.

«Афінно зріле» антитіло являє собою антитіло, що має одну або кілька модифікацій в одній

або декількох CDR, що дозволяє підвищувати афінність даного антитіла до антигену, у порівнянні з батьківським антитілом, що не має такої(их) модифікації(ій). Переважні афінно зрілі антитіла мають наномольні або навіть пікомольні афінності по відношенню до антигену-мішені. Афінно зрілі антитіла одержують відомими методами. У публікації Marks і ін. (Bio/Technology 10:779-783 (1992) описане дозрівання афінності в результаті перестановки доменів VH і VL. Неспецифічний мутагенез CDR і/або каркасних залишків описаний у публікаціях Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:3809-3813 (1994); Schier et al., Gene 169:147-155 (1995); Yelton et al., J. Immunol. 155:1994-2004 (1995); Jackson et al., J. Immunol. 154(7):3310-9 (1995) і Hawkins et al., J. Mol. Biol. 226:889-896 (1992).

Термін «ефекторні функції» антитіл означає біологічні активності, властиві Fc-області (Fc-області нативної послідовності або Fc-області варіанта амінокислотної послідовності) антитіла й варіюються в залежності від ізотипу антитіла. Прикладами ефекторних функцій антитіла є зв'язування із Clq і комплемент-залежна цитотоксичність; зв'язування з Fc-рецептором; антитіло-залежна клітинно-опосередкована цитотоксичність (ADCC); фагоцитоз; негативна регуляція рецепторів клітинної поверхні (наприклад, B-клітинного рецептора); і активація B-клітин.

"Антитіло-залежна клітинно-опосередкована цитотоксичність" або "ADCC" означає форму цитотоксичності, при якій секретований Ig, пов'язаний з Fc-рецепторами (FcR), присутніми на деяких цитотоксичних клітинах (наприклад, природних клітинах-кілерах (NK), нейтрофілах і макрофагах), дозволяє цим цитотоксичним ефекторним клітинам специфічно зв'язуватися з антигенвмісними клітинами-мішенями й викликати загибель клітин-мішеней під дією цитотоксинів. Ці антитіла «озброюють» цитотоксичні клітини і є абсолютно необхідними для такого цитолізу. Первинні клітини, які опосередковують ADCC, тобто NK-клітини, експресують тільки FcγRIII, тоді як моноцити експресують FcγRI, FcγRII і FcγRIII. Дані, отримані для експресії FcR на гемопоетичних клітинах, систематизовані в таблиці 3 на сторінці 464 Ravetch & Kinet Annu. Rev. Immunol. (1991) 9:457-92. Для оцінки ADCC-активності молекули, яка представляє, інтерес, може бути проведений аналіз на ADCC in vitro, такий як аналіз, описаний у патентах США №№ 5500362 або 5821337, або Presta, у патенті США № 6737056. Ефекторними клітинами, що підходять для таких аналізів, є моноклеарні клітини периферичної крові (МКПК) і природні клітини-кілери (NK). Альтернативно або додатково, ADCC-активність молекули, яка представляє інтерес, може бути оцінена in vivo, наприклад, на моделі тварини, такий як модель, описана Clynes et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 95:652-656 (1998).

«Людські ефекторні клітини» являють собою лейкоцити, які експресують один або декілька FcR і здійснюють ефекторні функції. Переважно, такі клітини експресують щонайменше FcγRIII і здійснюють ефекторну ADCC-функцію. Прикладами людських лейкоцитів, які опосередковують ADCC,

є моноклеарні клітини периферичної крові (МКПК), природні клітини-кілери (NK), моноцити, цитотоксичні T-клітини й нейтрофіли, при цьому, переважними є МКПК і NK. Ефекторні клітини можуть бути виділені із природного джерела, наприклад, із крові.

Терміни «Fc-рецептор» або «FcR» використовуються для опису рецептора, який зв'язується з Fc-областю антитіла. Переважним FcR є людський FcR з нативною послідовністю. Крім того, переважним FcR є FcR, що зв'язується з антитілом IgG (гамма-рецептор), і рецептори підкласів FcγRI, FcγRII і FcγRIII, включаючи алельні варіанти й альтернативно сплайсовані форми цих рецепторів. Рецепторами FcγRII є FcγRIIA ("активуючий рецептор") і FcγRIIB ("інгібуючий рецептор"), які мають аналогічні амінокислотні послідовності, що відрізняються, головним чином, своїми цитоплазматичними доменами. Активуючий рецептор FcγRIIA містить у своєму цитоплазматичному домені активуючий мотив імунорецептора на основі тирозину (ITAM). Інгібуючий рецептор FcγRIIB містить у своєму цитоплазматичному домені інгібуючий мотив імунорецептора на основі тирозину (ITIM). (див. огляд M. Daeron, Annu. Rev. Immunol., 15:203-234 (1997)). FcR описані в публікаціях Ravetch & Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991); Capel et al., Immunomethods, 4:25-34 (1994) і de Haas et al., J. Lab. Clin. Med., 126:330-41 (1995). Використовуваний тут термін "FcR" також охоплює й інші FcR, включаючи FcR, які будуть ідентифіковані в майбутньому. Цей термін також включає рецептор, наявний у немовлят, FcRn, що є відповідальним за передачу материнських IgG плоду (Guyer et al., J. Immunol., 117:587 (1976) і Kim et al., J. Immunol., 24:249 (1994)) і регулює гомеостаз імуноглобулінів. В WO 00/42072 (Presta) описані варіанти антитіл з підвищеним або зниженим рівнем зв'язування з FcR. Зміст даної патентної публікації конкретно вводиться в даний опис за допомогою посилання. Див., також, Shields et al. J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001).

Методи вимірювання рівня зв'язування з FcRn відомі фахівцям (див., наприклад, Ghetie 1997, Hinton 2004). Зв'язування з людським FcRn in vivo і час напівжиття поліпептидів, які мають високу афінність зв'язування з людським FcRn, у сироватці, можуть бути оцінені, наприклад, у транспгенних мишей або в трансфікованих людських клітинних лініях, експресуючий людський FcRn, або в приматів, яким були уведені варіанти поліпептидів Fc.

"Комплемент-залежна цитотоксичність" або "CDC" означає лізис клітин-мішеней у присутності комплементу. Класичний шлях активації комплементу ініціюється зв'язуванням першого компонента системи комплементу (Clq) з антитілами (відповідного підкласу), які зв'язуються з їх когнатним антигеном. Для оцінки активації комплементу може бути проведений аналіз на CDC, наприклад, як описано Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods, 202:163 (1996).

Поліпептидні варіанти, які мають модифіковані амінокислотні послідовності Fc-області й мають підвищену або знижену здатність зв'язуватися з Clq, описані в патенті США № 6194551B1 і в WO



99/51642. Зміст цих патентних публікацій конкретно вводиться в даний опис за допомогою посилання. Див. також Idusogie et al. J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000).

Термін «поліпептид, що містить Fc-область» означає поліпептид, такий як антитіло або імуноадгезин (визначення див. нижче), які містять Fc-область. С-кінцевий лізін (залишок 447 відповідно до Європейської системи нумерації EU) Fc-області може бути видалений, наприклад, у процесі очищення поліпептиду або шляхом рекомбінантного конструювання нуклеїнової кислоти, що кодує даний поліпептид. Відповідно до цього, композиція, що містить поліпептид, що має Fc-область відповідно до винаходу, може містити поліпептиди із залишком K447; поліпептиди, де всі K447 були видалені; або суміш поліпептидів, які містять і не містять залишок K447.

"Блокуюче" антитіло або "антитіло-антагоніст" являє собою антитіло, яке інгібує або знижує біологічну активність антигену, з яким воно зв'язується. Переважні блокуючі антитіла або антитіла-антагоністи, в основному, або повністю інгібують біологічну активність антигену.

Використовуваний тут термін "антитіло-агоніст" означає антитіло, що імітує щонайменше одну з функціональних активностей поліпептиду, що представляє інтерес.

«Акцепторна людська каркасна область», використовувана з метою даного винаходу, являє собою каркасну область, що містить амінокислотну послідовність каркасної області VL або VH, яка походить від каркасної області людського імуноглобуліну або від консенсусної каркасної області людського імуноглобуліну. Акцепторна людська каркасна область, яка «походить від» каркасної області людського імуноглобуліну або від консенсусної каркасної області людського імуноглобуліну, може включати ту ж саму амінокислотну послідовність, або вона може містити амінокислотну послідовність із уже наявними модифікаціями. У випадку якщо амінокислотні модифікації вже присутні, то переважно, щоб їхнє число становило не більш ніж 5, переважно 4 або менше або 3 або менше. У випадку якщо амінокислотні модифікації вже присутні в VH, то переважно, щоб такі модифікації були присутні тільки в трьох, двох або в одному з положень 71H, 73H і 78H; так, наприклад, амінокислотними залишками в таких положеннях можуть бути 71A, 73T і/або 78A. В одному з варіантів винаходу, послідовність акцепторної людської каркасної області VL ідентична послідовності каркасної області VL людського імуноглобуліну або консенсусній послідовності каркасної області людського імуноглобуліну.

«Консensusна послідовність людської каркасної області» являє собою каркасну область, що має амінокислотний залишок, що найбільше часто зустрічається у наборі з каркасних послідовностей VL або VH людського імуноглобуліну. Загалом кажучи, послідовності VL або VH людського імуноглобуліну вибирають із підгрупи послідовностей варіабельного домену. Звичайно, підгрупа таких послідовностей являє собою підгрупу, описану Кебатом і ін. В одному з варіантів винаходу, під-

групою для VL є підгрупа каппа I, описана Кебатом і ін. В одному з варіантів винаходу, підгрупою для VH є підгрупа III, описана Кебатом і ін.

«Консensusна послідовність каркасної області VH підгрупи III» включає консensusну послідовність, що походить від амінокислотних послідовностей у варіабельній області важкого ланцюга підгрупи III, описаної Кебатом і ін. В одному з варіантів винаходу, консensusна амінокислотна послідовність каркасної області VH підгрупи III містить щонайменше частину або всі нижченаведені послідовності: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO:42)-H1-WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO:43)-H2-RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC (SEQ ID NO:44)-H3-WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:45).

«Консensusна послідовність каркасної області VL підгрупи I» включає консensusну послідовність, що походить від амінокислотних послідовностей у варіабельній області легкого ланцюга каппа підгрупи I, описаної Кебатом і ін. В одному з варіантів винаходу, консensusна амінокислотна послідовність каркасної області VL підгрупи I містить щонайменше частину або всі нижченаведені послідовності:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO:46)-L1-WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO:47)-L2-GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:48)-L3-FGQGTKEVEIK (SEQ ID NO:49).

Термін «розлад» або «захворювання» означає будь-який стан, який сприйнятливий до лікування речовиною/молекулою або способом відповідно до винаходу. Такими розладами є хронічні й гострі розлади або захворювання, включаючи патологічні стани, які створюють у даного ссавця схильність до розглянутого розладу. Необмежуваними прикладами описаних тут розладів, що піддаються лікуванню, є злоякісні й доброякісні пухлини; карцинома, бластома й саркома.

Терміни "клітинно-проліферативний розлад" і "проліферативний розлад" означають розлади, асоційовані з певним ступенем аномальної проліферації клітин. В одному з варіантів винаходу, вказаним клітинно-проліферативним розладом є рак.

Використовуваний тут термін "пухлина" означає всі неопластичні клітини, що піддаються росту й проліферації, незалежно від того, чи є вони доброякісними або злоякісними, і всі предракові й ракові клітини й тканини. Використовувані тут терміни "рак", "раковий", "клітинно-проліферативний розлад", "проліферативний розлад" і "пухлина" не є взаємовиключними.

Використовувані тут терміни "рак" і "раковий" належать до фізіологічного стану ссавців, що звичайно характеризується нерегульованим ростом/проліферацією клітин. Прикладами ракових захворювань є, але не обмежуються ними, карцинома, лімфома, бластома, саркома й лейкоз. Більш конкретними прикладами таких ракових захворювань є плоскоклітинний рак, дрібноклітинний рак легенів, не-дрібноклітинний рак легенів, аденокарцинома легенів, плоскоклітинна карцинома легенів, рак черевної порожнини, гепатоцелюлярний рак, рак шлунково-кишкового тракту, рак підш-

лункової залози, гліобластома, рак шийки матки, рак яєчника, рак печінки, рак сечового міхура, гепатома, рак молочної залози, рак товстої кишки, рак прямої і ободової кишки, карцинома ендометрію або матки, карцинома слинної залози, рак нирок, рак печінки, рак передміхурової залози, рак вульви, рак щитовидної залози, карцинома печінки, рак шлунка, меланома й різні типи раку голови й шиї. Порушення ангиогенезу може приводити до розвитку багатьох розладів, які можуть бути піддані лікуванню композиціями й способами відповідно до винаходу. Такими розладами є не-неопластичні й неопластичні стани. Неопластичними розладами є, але не обмежуються ними, стани, описані вище. Не-неопластичними станами є, але не обмежуються ними, небажана або аберантна гіпертрофія, артрит, ревматоїдний артрит (РА), псоріаз, псоріазні бляшки, саркоїдоз, атеросклероз, атеросклеротичні бляшки, діабетична і інші проліферативні ретинопатії, включаючи ретинопатію недоношених або ретролентальну фіброплазію, неоваскулярну глаукому, старечу дегенерацію жовтої плями, діабетичний набряк жовтої плями, неоваскуляризацію рогівки ока, неоваскуляризацію трансплантата рогівки ока, відторгнення трансплантата рогівки ока, неоваскуляризацію сітківки/судинної оболонки ока, неоваскуляризацію кута очного яблука (печероніння ока), неоваскулярне захворювання очей, рестеноз судин, артеріовенозні мальформації (АВМ), менінгіому, гемангіому ангиофіброму, гіперплазію щитовидної залози (включаючи хворобу Грейвса), захворювання, асоційовані із трансплантацією рогівки очі й інші тканини; хронічне запалення, запалення легень, гостре ураження легень/респіраторний дистрес-синдром дорослих (РДСВ), сепсис, первинну легенеvu гіпертензія, зловиякісні ексудати в області легень, набряк головного мозку (наприклад, асоційований із інсультом/закритим ушкодженням/травмою голови), синовіт, утворення паннуса при РА, осифікуючий міозит, гіпертрофію кісток, остеоартрит (ОА), що не піддається лікуванню асцит, полікістоз яєчника, ендометріоз, захворювання, асоційовані із секвестрацією рідини в третьому просторі (порожнини порожнистих органів) (панкреатит, тунельний синдром, опіки, захворювання кишечника), фіброму матки, передчасні пологи, хронічне запалення, таке як ВЗК (хвороба Крона й виразковий коліт), відторгнення ниркового аллотрансплантату, запальне захворювання кишечника, нефротичний синдром, небажаний або аберантний ріст тканинної маси (не-ракових тканин), гемофілічну артропатію, гіпертрофовані рубці, придушення росту волосся, синдром Ослера-Вебера, піогенну гранульому, ретролентальну фіброплазію, склеродермію, трахоми, васкулярну адгезію (зрощення судин), синовіт, дерматит, прееклампсію, асцити, випоти в області перикарду (наприклад, асоційовані з перикардитом) і плевральні випоти.

Використовуваний тут термін "лікування" означає клінічне втручання з метою зміни природних процесів, що відбуваються в організмі індивідуума й у клітинах, що піддаються лікуванню, і таке лікування може бути профілактичним, або воно може бути здійснене в процесі розвитку клінічної патоло-

гії. Бажаними ефектами лікування є запобігання рецидиву або зниження частоти рецидивів, ослаблення симптомів, зменшення будь-яких прямих або опосередкованих патологічних наслідків захворювання, попередження метастазів, зниження ступеню прогресування захворювання, ослаблення або зниження ступеню патологічного стану, також ремісія або поліпшення прогнозу. У деяких варіантах винаходу, антитіла відповідно до винаходу використовуються для вповільнення розвитку захворювання або розладу.

Термін «індивідуум» означає хребетне, переважно, ссавця, найбільш переважно, людину. Термін «ссавці» включає, але не обмежується ними, сільськогосподарських тварин (таких як корови), тварин, що беруть участь у спортивних змаганнях, домашніх вихованців (таких як кішки, собаки й коні), приматів, мишей і щурів.

«Ссавцями», що піддаються лікуванню, є будь-які тварини, класифіковані як ссавці, включаючи людину, домашніх і сільськогосподарських тварин, також тварин, що втримуються в зоопарках, тварин, що беруть участь у спортивних змаганнях або домашніх вихованнях, таких як собаки, коня, кішки, корови й т.п. Переважним ссавцем є людина.

Термін "ефективна кількість" означає кількість, що є ефективною у визначених дозах і протягом визначеного періоду часу, необхідних для досягнення потрібного терапевтичного або профілактичного результату.

"Терапевтично ефективна кількість" речовини/молекули відповідно до винаходу, агоніста або антагоніста може варіюватися залежно від таких факторів, як патологічний стан, вік, стать й маса індивідуума, також здатність даної речовини/молекули, агоніста або антагоніста виробляти потрібну відповідь в індивідуума. Терапевтично ефективною кількістю також є кількість, при введенні якої терапевтично сприятливі ефекти вказаної речовини/молекули, агоніста або антагоніста переважають над будь-якими їх токсичними або побічними ефектами. Термін "профілактично ефективна кількість" означає кількість, яка є ефективною у визначених дозах і протягом визначеного періоду часу, необхідних для досягнення потрібного профілактичного результату. Оскільки профілактичну дозу вводять індивідуумам перед початком розвитку захворювання або на ранній стадії розвитку захворювання, то звичайно, але необов'язково, така профілактично ефективна кількість повинна бути меншою терапевтично ефективною кількістю.

Використовуваний тут термін "цитотоксичний засіб" означає речовину, яка інгібує або запобігає функції клітин і/або викликає деструкцію клітин. Цей термін включає радіоактивні ізотопи (наприклад,  $At^{211}$ ,  $I^{131}$ ,  $I^{125}$ ,  $Y^{90}$ ,  $Re^{186}$ ,  $Re^{188}$ ,  $Sm^{153}$ ,  $B^{212}$ ,  $P^{32}$  і радіоактивні ізотопи Lu), хіміотерапевтичні засоби, наприклад, метотрексат, адриаміцин, вінкаалкалоїди (вінкристин, вінбластин, етопозид), доксорубіцин, мелфалан, мітоміцин С, хлорамбуцил, даунорубіцин або інші інтеркалюючі агенти, ферменти і їхні фрагменти, такі як нуклеолітичні ферменти, антибіотики й токсини, такі як токсини у вигляді невеликих молекул, або ферментативно

активні токсини бактеріального, грибового, рослинного або тваринного походження, включаючи їхні фрагменти і/або варіанти, і різні протипухлинні або протиракові засоби, описані нижче. Нижче описані й інші цитотоксичні засоби. Протипухлинний засіб викликає деструкцію пухлинних клітин.

"Хіміотерапевтичний засіб" являє собою хімічну сполуку, яка використовується для лікування раку. Прикладами хіміотерапевтичних засобів є алкілюючі агенти, такі як тіотеп і циклофосфамід цитоксан®; алкілсульфонати, такі як бусульфан, імпросульфан і піпосульфан; азириди, такі як бензодопа, карбоквон, метуредопа й уредопа; етиленіміни й метиламеламіни, включаючи альтретамін, триетиленмеламін, триетиленфосфорамід, триетилентіофосфорамід і триметилполмеламін; ацетогеніни (а зокрема, буллатацин і буллатацінон); дельта-9-тетрагідроканабінол (дронабінол, марінол®); бета-лапахон; лапахол; колхіцини; бетулінова кислота; камптотецин (включаючи синтетичний аналог топотекан (гікамтин®), СРТ-11 (іринотекан, камптозар®), ацетилкамптотецин, скополектин і 9-аміокамптотецин); бріостатин; калістатин; СС-1065 (включаючи його синтетичні аналоги, такі як адозелезин, карзелезин і бізелезин); подофілотоксин; подофілінова кислота; теніпозид; криптофіцини (зокрема, криптофіцин 1 і криптофіцин 8); доластатин; дуокарміцин (включаючи синтетичні аналоги, КВ-2189 і СВ 1-ТМ1); елеутеробін; панкратистатин; саркодиктиїн; спонгістатин; азотні аналоги гірчичного газу, такі як хлорамбуцил, хлорнафазин, холофосфамід, естрамустин, іфосфамід, мехлоретамін, гідрохлорид оксиду мехлоретаміну, мелфалан, новембіхін, фенестерин, преднімустин, трофосфамід, урациловий аналог гірчичного газу; нітрозосечовини, такі як кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, німустин і ранімустин; антибіотики, такі як енедіїнові антибіотики (наприклад, каліхеаміцин, зокрема, каліхеаміцин гама II і каліхеаміцин омега II (див., наприклад, Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl., 33:183-186 (1994)); динеміцин, включаючи динеміцин А; еспераміцин, також неокарзиностатиновий хромофор і споріднені хромофори, такі як хромопротейнові енедіїнові антибіотики), аклациноміцини, актиноміцин, аутраміцин, азасерин, блеоміцини, кактиноміцин, карабіцин, карміноміцин, карзинофілін, хромоміцини, дактиноміцин, даунорубіцин, деторубіцин, L-норлейцин, доксирубіцин, адріаміцин® (включаючи морфолінодоксорубіцин, ціаноморфолінодоксорубіцин, 2-піролінодоксорубіцин і дезоксидоксорубіцин), епірубіцин, езорубіцин, ідарубіцин, марцеломіцин, мітоміцини, такі як мітоміцин С, мікофенолова кислота, ногаламіцин, оливоміцини, пепломіцин, потфіроміцин, пуроміцин, квеламіцин, родорубіцин, стрептонігрин, стрептозоцин, туберцидин, убенімекс, зиностатин, зорубіцин; антиметаболіти, такі як метотрексат і 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолієвої кислоти, такі як деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметотрексат; пуринові аналоги, такі як флударабін, 6-меркаптопурин, тіаміприн, тіогуанін; піримідинові аналоги, такі як анцитабін, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабін, дидеоксіуридин, доксифлуридин, еноцитабін,

флоксуридин; андрогени, такі як калустерон, пропіонат дромостанолону, епітіостанол, мепітіостан, тестостерон; антиадренергічні засоби, такі як аміноглютетимід, мітотан, трилостан; замінник фолієвої кислоти, такий як фролінова кислота; ацеглатон; альдофосфамідний глікозид; амінолевулінова кислота; еніпурацил; амсакрин; бестрабуцил; бізантрин; едатраксат; дефофамін; демеколцин; діазиквон; елфорнітин; ацетат еліптінію; епотилон; етоглуцид; нітрат галію; гідроксисечовина; лентинан; лонідаїнін; майтанзиноїди, такі як майтазин і анзамітоцини; мітогуазон; мітоксантрон; мопідамон; нітраерин; пентостатин; фенамет; пірарубіцин; лозоксантон; 2-етилгідазид; прокарбіазцин; полісахаридний комплекс PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); разоксан; ризоксин; сизофіран; спірогерманій; теназонова кислота; триазиквон; 2,2',2''-трихлортриетиламін; трихотецини (а зокрема, токсин Т-2, веракурин А, рорідин А і ангуїдин); уретан; віндезин (елдизин®, філдезин®); дакарбазин; маномустин; мітобронітол; мітолактол; піпоброман; гацитозин; арабінозид ("Ara-C"); тіотеп; таксоїди, наприклад, паклітаксел Таксол® (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.); Абраксан™, який не містить кремофору, сконструйована на основі альбуміну композиція з наночастинок паклітакселу (American Pharmaceuticals Partners, Schaumburg, Illinois) і доцетаксел Таксотер® (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France); хлоранбуцил; гемцитабін (Гемзар®); 6-тіогуанін; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платини, такі як цисплатин і карбоплатин; вінбластин (Велбан®); платина; етопозид (VP-16); іфосфамід; мітоксантрон; вінкрисдин (Онковін®); оксалиплатин; лейковорин; вінорелбін (Навелбін®); новантрон; едатрексат; дауноміцин; аміноптерин; ібандронат; інгібітор топоізомерази RFS 2000; дифторметилорнітин (ДМФО); ретиноїди, такі як ретиноева кислота; капецитабін (Кселода®); фармацевтично прийнятні солі, оксиди або похідні всіх вищевказаних сполук, також комбінації із двох або більше вищевказаних сполук, такі як CHOP, де вказана аббревіатура використовується в комбінованій терапії й означає циклофосфамід, доксорубіцин, вінкрисдин і преднізолон, і FOLFOX, де вказана аббревіатура використовується в комбінованій терапії й означає оксалиплатин (Елоксатин®), 5-FU і лейковорин.

У це визначення також входять протигормональні засоби, які регулюють, знижують, блокують або інгібують дію гормонів, які можуть стимулювати ріст ракової пухлини, і ці засоби часто застосовуються для системного або загального лікування. Такими засобами можуть бути самі гормони. Прикладами таких засобів є антиестрогени й селективні модулятори рецептора естрогену (SERM), включаючи, наприклад, тамоксифен (включаючи тамоксифен Нолвадекс®), ралоксифен Евіста®, дролоксифен, 4-гідрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон і тореміфен Фарестон®; антипрогестерони; інгібітори рецептора естрогену (ERD); засоби, що придушують або блокують функції яєчників, наприклад, агоністи релізинг-фактора лютеїнізуючого гормону (LHRH), такі як Лупрон® і ацетат лейпроліду Елігард®,

ацетат гозереліну, ацетат бузереліну й триптерелін; інші антиандрогени, такі як флутамід, нілутамід і бікалутамід; і інгібітори ароматази, які інгібують фермент ароматазу й регулюють продукування естрогенів у корі надниркової залози, такі як, наприклад, 4(5)-імідазоли, аміноглутетимід, ацетат мегестролу Мегаза®, екземестан Аромазин®, форместан, фадрозол, ворозол Рівизор®, летрозол Фемара® і анастрозол Аримідекс®. Крім того, у таке визначення хіміотерапевтичних засобів входять біфосфонати, такі як клодронат (наприклад, Бонепос® або Остак®), етидронат Дидрокал®, NE-58095, золедроновна кислота/золедронат Зомета®, алендронат Фозамакс®, памідронат Аредия®, тилудронат Скелід® або ризедронат Актонел®, також троксацитабін (нуклеозидний аналог 1, 3-діоксоланцитозину); антисмислові олігонуклеотиди, зокрема, олігонуклеотиди, які інгібують експресію генів шляху передачі сигналу, які беруть участь у небажаній проліферації клітин, такі як, наприклад, PKC-Альфа, Raf, H-Ras і рецептор епідермального фактора росту (EGF-R); вакцини, такі як вакцина Тератопа® і вакцини, застосовувані в генотерапії, наприклад, вакцина Алловектин®, вакцина Лейвектин® і вакцина Ваксид®; інгібітор топоізомерази 1 Луртотекан®; gmRH Абарелікс®; дитозилат лапатинібу (інгібітор тирозинкінази, що складається із двох невеликих молекул Erb-2 і EGFR, також відомий як GW572016) і фармацевтично прийнятні солі, оксиди або похідні всіх вищевказаних сполук.

Використовуваний тут термін "ріст-інгібуючий засіб" означає сполуку або композицію, що інгібує ріст клітин (таких як клітини, які експресують DLL4), або *in vitro*, або *in vivo*. Таким чином, засобом, який інгібує ріст клітин, може бути засіб, що значно знижує відсоток клітин (таких як клітини, які експресують DLL4) у фазі S. Прикладами засобів, які інгібують ріст клітин, є засоби, що блокують проходження клітинного циклу (в іншій фазі, крім фази S), такі як засоби, які індують блокування фази G1 і фази M. Класичними засобами, що блокують фазу M, є вінкаалкалоїди (вінкрисдин і вінбластин), таксани й інгібітори топоізомерази II, такі як доксорубіцин, епірубіцин, даунорубіцин, етопозид і блеоміцин. Засобами, які блокують фазу G1, що також блокують перехід у фазу S, є, наприклад, ДНК-алкілюючі агенти, такі як тамоксифен, преднізон, дакарбазин, мехлоретамін, цисплатин, метотрексат, 5-фторурацил і ага-С. Додаткову інформацію можна знайти в публікації The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn & Israel, eds., Chapter 1, entitled "Cell cycle regulation, oncogenes and antineoplastic drugs", Murakami et al. (WB Saunders: Philadelphia, 1995), зокрема, на стор. 13. Таксани (паклітаксел і доцетаксел) являють собою протиракові лікарські засоби, які одержуються з дерева тис. Доцетаксел (Таксотер®, Rhone-Poulenc Rorer), який одержується з Європейського тиса, являє собою напівсинтетичний аналог паклітакселу (Таксола®, Bristol-Myers Squibb). Паклітаксел і доцетаксел індують збортку мікротрубочок з тубулінових димерів і стабілізують мікротрубочки шляхом попередження деполімеризації, що приводить до інгібування мітозу клітин.

"Доксорубіцин" являє собою антрацикліновий антибіотик. Доксорубіцин має повну хімічну назву (8S-цис)-10-[(3-аміно-2,3,6-тридезоксис- $\alpha$ -L-ліскогексапіранозил)окси]-7,8,9,10-тетрагідро-6,8,11-тригідрокси-8-(гідроксiacетил)-1-метокси-5,12-нафтацендіон.

Термін "протиухлинна композиція" означає композицію, що може бути використана для лікування раку й містить щонайменше один активний терапевтичний засіб, наприклад, «протираковий засіб». Прикладами терапевтичних засобів (протиракових засобів, які також називаються тут «протиухлинним засобом») є, але не обмежуються ними, наприклад, хіміотерапевтичні засоби, ріст-інгібуючі засоби, цитотоксичні засоби, засоби, використовувані в променевій терапії, антиангіогенні засоби, апоптотичні засоби, антитубулінові засоби, токсини й інші засоби для лікування раку, наприклад, нейтралізуючі анти-VEGF-антитіло, антагоніст VEGF, анти-HER-2-антитіло, анти-CD20-антитіло, антагоніст рецептора епідермального фактора росту (EGFR) (наприклад, інгібітор тирозинкінази), інгібітор HER1/EGFR, ерлотиніб, інгібітор COX-2 (наприклад, целекоксиб), інтерферони, цитокіни, антагоністи (наприклад, нейтралізуючі антитіла), які зв'язуються з одним або декількома рецепторами ErbB2, ErbB3, ErbB4 або VEGF, інгібітори тирозинкіназних рецепторів тромбоцитарного фактора росту (PDGF) і/або фактор стовбурових клітин (SCF) (наприклад, мезилат іматинібу (Gleevec® Novartis)), TRAIL/Apo2L, і інші біологічно активні засоби й органічні хімічні сполуки й т.п.

Використовуваний у даній заявці термін "проліки" означає попередник або похідне фармацевтично активної речовини, які, у порівнянні з батьківським лікарським засобом, є менш цитотоксичними по відношенню до пухлинних клітин і здатні ферментативно активуватися або перетворюватися в більш активну зрілу форму. Див., наприклад, Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" Biochemical Society Transactions, 14, pp.375-382, 615th Meeting Belfast (1986) і Stella et al. "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery", Directed Drug Delivery, Borchardt et al., (ed.), pp.247-267, Humana Press (1985). Проліки відповідно до винаходу є, але не обмежуються ними, фосфатвмісні проліки; тіофосфатвмісні проліки; сульфатвмісні проліки; пептидвмісні проліки; лікарські засоби, модифіковані D-амінокислотою; глікозильовані проліки;  $\beta$ -лактамвмісні проліки; проліки, що містять необов'язково заміщений феноксіацетамід; або проліки, що містять, але необов'язково, заміщений фенілацетамід; 5-фторцитозинові й інші 5-фторуридинові проліки, які можуть бути перетворені в більш активний цитотоксичний вільний лікарський засіб. Прикладами цитотоксичних лікарських засобів, які можуть бути дериватизовані з одержанням пролікарської форми для її використання даному винаході, є але не обмежуються ними, хіміотерапевтичні засоби, описані вище.

Термін «антиангіогенний засіб» або «інгібітор ангіогенезу» означає речовину з невеликою молекулярною масою, полінуклеотид (включаючи, наприклад, інгібуючу РНК (РНКі або кіРНК)), поліпеп-

тид, виділений білок, рекомбінантний білок, анти-тіло або його кон'югати або гібридні білки, які прямо або опосередковано інгібують ангиогенез, васкулогенез або небажану проникність судин. Так, наприклад, антиангіогенним засобом є антитіло або інший антагоніст, спрямований проти ангиогенного агента, визначені вище, наприклад, антитіла проти VEGF, антитіла проти рецепторів VEGF, фрагменти розчинних рецепторів VEGF або невеликі молекули, що блокують передачу сигналу рецептора VEGF (наприклад, PTK787/ZK2284, SU6668, SUTENT®/SU11248 (малат сунитинібу), AMG706 або молекули, описані, наприклад, у Міжнародній патентній заявці WO 2004/113304). Антиангіогенними засобами також є природні інгібітори ангиогенезу, наприклад, антиостатин, ендостатин і т.п. Див., наприклад, Klagsbrun and D'Amore, *Annu. Rev. Physiol.* 53:217-39 (1991); Streit and Detmar, *Oncogene*, 22:3172-3179 (2003) (наприклад, таблицю 3, у якій перераховані антиангіогенні засоби для лікування злоякісної меланоми); Ferrara & Alitalo, *Nature Medicine* 5(12):1359-1364 (1999); Tonini et al., *Oncogene*, 22:6549-6556 (2003) (наприклад, таблиця 2, у якій перераховані антиангіогенні фактори); і Sato *Int. J. Clin. Oncol.* 8:200-206 (2003) (наприклад, таблицю 1, у якій перераховані антиангіогенні засоби, використовувані в клінічних випробуваннях).

Композиції відповідно до винаходу й способи їхнього одержання

Даний винахід належить до композицій, включаючи фармацевтичні композиції, що містять анти-DLL4-антитіло, і до полінуклеотидів, які містять послідовності, що кодують анти-DLL4-антитіло. Використовувані тут композиції містять одне або декілька антитіл, що зв'язуються з DLL4, і/або один або декілька полінуклеотидів, які містять послідовності, що кодують одне або декілька антитіл, що зв'язуються з DLL4. Такі композиції можуть також містити прийнятні носії, такі як фармацевтично прийнятні наповнювачі, включаючи буфери, добре відомі фахівцям.

Даний винахід також охоплює варіанти виділених антитіл і полінуклеотидів. Даний винахід також охоплює варіанти в основному, чистих антитіл і полінуклеотидів.

Анти-DLL4-антитілами відповідно до винаходу є, переважно, моноклональні антитіла. В об'єм даного винаходу також входять Fab, Fab'-, Fab'-SH- і F(ab')<sub>2</sub>-фрагменти анти-DLL4-антитіл, які тут розглядаються. Вказані фрагменти антитіл можуть бути отримані традиційними способами, такими як ферментативний гідроліз, або вони можуть бути продуковані методами рекомбінантних ДНК. Вказані фрагменти антитіл можуть бути химерними або гуманізованими. Ці фрагменти можуть бути використані в діагностичних або терапевтичних цілях, описаних нижче.

Моноклональні антитіла одержують із популяції, в основному, гомогенних антитіл, тобто окремі антитіла, що входять до складу такої популяції, є ідентичними за винятком можливих природних мутацій, які можуть бути присутніми у невеликих кількостях. Таким чином, термін «моноклональ-

ний» визначає характер антитіла, що не є сумішшю дискретних антитіл.

Моноклональні анти-DLL4-антитіла відповідно до винаходу можуть бути отримані гібридомним методом, уперше описаним Kohler et al., *Nature*, 256:495 (1975), або вони можуть бути отримані методами рекомбінантних ДНК (патент США №4816567).

У гібридомному методі, миша або іншу прийнятну тварину-хазяїн, таку як хом'ячок, імунізують для винаходу в нього лімфоцитів, продукуючих або здатних продукувати антитіла, що специфічно зв'язуються з білком, використовуваним для імунізації. Антитіла проти DLL4 звичайно виробляються у тварин після багаторазових підшкірних (sc) або внутріочеревинних (ip) ін'єкцій DLL4 і ад'юванта. DLL4 може бути отриманий добре відомими методами, деякі з яких більш докладно описані нижче. Так, наприклад, рекомбінантне продукування DLL4 описане нижче. В одному з варіантів винаходу, тварин імунізують похідним DLL4, що містить позаклітинний домен (ECD) DLL4, приєднаний до Fc-частини важкого ланцюга імуноглобуліну. У переважному варіанті винаходу, тварин імунізують гібридним білком «DLL4-IgG1». Тварин звичайно імунізують монофосфорилипідом А (MPL)/дикириноміколятом трегалози (TDM) для вироблення відповіді проти імуногенних кон'югатів або похідних DLL4 (Ribi Immunochem. Research, Inc., Hamilton, MT), і отриманий розчин ін'єктують черезшкірно в множину ділянок. Через два тижні, тваринам вводять ударну дозу. Ще через 7-14 днів, у тварин беруть кров, і сироватку аналізують на титри анти-DLL4-антитіл. Тваринам вводять ударну дозу доти, поки титр не буде досягати «плато» (тобто постійного рівня).

Альтернативно, лімфоцити можуть бути імунізовані *in vitro*. Потім лімфоцити піддають зливанню з мієломними клітинами з використанням прийнятного агента для злиття, такого як поліетилеогліколь, у результаті чого утворюються гібридомні клітини (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986)).

Отримані наступним чином гібридомні клітини висівають і культивують в прийнятному культуральному середовищі, що, переважно, містить одну або декілька речовин, інгібуючих ріст або виживання не-злитих батьківських мієломних клітин. Так, наприклад, якщо батьківські мієломні клітини не містять ферменту гіпоксантин-гуанін-фосфорибозилтрансферази (HGPRT або HPRT), то культуральне середовище, використовуване для одержання гібридом, звичайно включає гіпоксантин, аміноптерин і тимідин (середовище HAT), тобто речовини, що попереджають ріст HGPRT-дефіцитних клітин.

Переважними мієломними клітинами є клітини, які здатні піддаватися ефективному зливанню, підтримувати стабільне продукування високих рівнів антитіл вибраними антитіло-продукуючими клітинами і є чутливими до середовища, такого як середовище HAT. Із цих клітин, переважними мієломними клітинними лініями є мишачі мієломні лінії, такі як клітинні лінії, що походять від клітин мишачих пухлин MOPC-21 і MPC-11, наявних в

інституті Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA, і клітин SP-2 або X63-Ag8-653, наявних в Американській колекції типових культур, Rockville, Maryland USA. Для продукування людських моноклональних антитіл також використовуються людські мієломні клітинні лінії й гетеромієломні клітинні лінії "миша-людина" (Kozbor J. Immunol, 133:3001 (1984) & Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp.51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

Культуральне середовище для росту гібридомних клітин аналізують на продукування моноклональних антитіл проти DLL4. Специфічність зв'язування моноклональних антитіл, продукованих гібридомними клітинами, визначають, переважно, шляхом імунопреципітації або шляхом проведення *in vitro* аналізу на зв'язування, такого як радіоімуноаналіз (RIA) або твердофазний імуноферментний аналіз (ELISA).

Афінність зв'язування моноклонального антитіла може бути, наприклад, визначена за допомогою аналізу Скетчарда, описаного Munson et al., Anal. Biochem., 107:220 (1980).

Після ідентифікації гібридомних клітин, які продукують антитіла з потрібною специфічністю, афінністю і/або активністю, клони можуть бути субклоновані шляхом проведення процедур лімітуючого розведення і культивовані стандартними методами (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986)). Прийнятними культуральними середовищами, призначеними для досягнення даної мети, є, наприклад, середовище D-MEM або RPMI-1640. Крім того, гібридомні клітини можуть бути вирощені *in vivo* як асцитні пухлини у тварин.

Моноклональні антитіла, секретовані субклонами, відповідним чином виділяють із культурального середовища, асцитної рідини або сироватки шляхом проведення стандартних процедур очищення імуноглобулінів, таких як, наприклад, хроматографія на білку А-сефарозі, хроматографія на гідроксіапатитах, гель-електрофорез, діаліз або афінна хроматографія.

Анти-DLL4-антитіла відповідно до винаходу можуть бути отримані з використанням комбінованих бібліотек для скринінгу на клони синтетичних антитіл з потрібною активністю або активностями. У принципі, клони синтетичних антитіл відбирають шляхом скринінгу фагових бібліотек, що містять фаг, який представляє різні фрагменти варіабельної області антитіла (Fv), приєднані до білка оболонки фага. Такі фагові бібліотеки піддають пеннінгу за допомогою афінної хроматографії проти потрібного антигену. Клони, які експресують Fv-фрагменти, здатні зв'язуватися з потрібним антигеном, піддають адсорбції на антигені й, тим самим, їхньому відділенню від клонів, що не зв'язуються, у бібліотеці. Потім клони, що зв'язуються, елюють з антигену, після чого число цих клонів може бути збільшене шляхом проведення додаткових циклів адсорбції/елювання антигену. Будь-яке з анти-DLL4-антитіл відповідно до винаходу може бути отримане із застосуванням прийнятної процедури скринінгу антигену для відбору на клон

фага, що представляє інтерес, з наступним конструюванням повнорозмірного клону анти-DLL4-антитіла з використанням послідовностей Fv, що походять від клону фага, що представляє інтерес, і прийнятних послідовностей константної області (Fc), описаних Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3.

Антигензв'язувальний домен антитіла утворюється із двох варіабельних (V) областей, що складаються приблизно з 110 амінокислот, одна з яких знаходиться в легкому ланцюзі (VL), інша - у важкому ланцюзі (VH), і в цих варіабельних областях присутні три гіперваріабельні петлі або комплементарність-визначаючі області (CDR). Варіабельні домени можуть бути функціонально представлені на фагу або як одноланцюжкові Fv(scFv)-фрагменти, у яких VH і VL ковалентно зв'язані один з одним за допомогою короткого гнучкого пептиду, або як Fab-фрагменти, у яких кожний їх цих варіабельних доменів приєднаний до константного домену й піддається нековалентній взаємодії, як описано Winter et al., Ann. Rev. Immunol, 12: 433-455 (1994). Використовувані тут scFv-кодуючі фагові клони й Fab-кодуючі фагові клони, у цілому, називаються «фаговими Fv-клонами» або «Fv-клонами».

Набори генів VH і VL можуть бути окремо клоновані за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) і піддані неспецифічній рекомбінації у фагових бібліотеках, потім вони можуть бути проаналізовані на антигензв'язувальні клони, як описано в публікації Winter et al., Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455 (1994). Бібліотеки від імунізованих джерел дозволяють одержати антитіла, що мають високу афінність до імуногену, і при цьому, не вимагають проведення процедури конструювання гібридом. Альтернативно, може бути клонований набір людських антитіл дикого типу з одержанням одного джерела людських антитіл проти неаутоантигенів, також аутоантигенів широкого ряду, не застосовуючи, при цьому, яку-небудь імунізацію, як описано Griffiths et al., EMBO J, 12: 725-734 (1993). І нарешті, вихідні бібліотеки можуть бути також синтезовані шляхом клонування неаранжованих сегментів V-гена зі стовбурових клітин і з використанням ПЛР-праймерів, що містять рандомізовану послідовність, яка кодує у високому ступені варіабельні CDR3-області, з метою досягнення реаранжування *in vitro*, як описано Hoogenboom & Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388(1992).

Для представлення фрагментів антитіл шляхом їхнього приєднання до мінорного оболонкового білку pIII використовують нитчатий фаг. Фрагменти антитіл можуть бути представлені у вигляді одноланцюжкових Fv-фрагментів, у яких домени VH і VL приєднані на одному і тому ж поліпептидному ланцюзі за допомогою гнучкого поліпептидного спейсера, наприклад, як описано Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991), або у вигляді Fab-фрагментів, у яких один ланцюг приєднаний до pIII, інший секретується в периплазму бактеріальної клітини-хазяя, де відбувається сборка структури оболонкового білка Fab, що відображається на

поверхні фага за допомогою заміни деяких з оболонкових білків дикого типу, наприклад, як описано в публікації Hoogenboom et al., *Nucl. Acids Res.*, 19: 4133-4137(1991).

Звичайно, нуклеїнові кислоти, які містять гени, що кодують фрагменти антитіл, одержують із імунних клітин, узятих у людини або тварин. Якщо необхідно одержати бібліотеку, що складається переважно із клонів анти-DLL4-антитіл, то індивідуума імунізують DLL4 для вироблення в нього гуморальної відповіді, потім, для конструювання бібліотеки, виділяють клітини селезінки і/або циркулюючі В-клітини, що не належать до популяції лімфоцитів периферичної крові (ЛПК). У переважному варіанті винаходу, бібліотеку генів фрагментів людського антитіла, що містить переважно клони анти-DLL4-антитіла, одержують за допомогою вироблення відповіді у вигляді продукування анти-DLL4-антитіл у трансгенних мишей, що несуть масив функціональних генів людського імунoglobulinу (і не містять функціональної системи продукування ендогенного антитіла), де така DLL4-імунізація буде приводити до утворення В-клітин, продукуючих людські антитіла проти DLL4. Генерування трансгенних мишей, продукуючих людське антитіло, описано нижче.

Додаткове збагачення клітинної популяції реактивними анти-DLL4-антитілами може бути досягнуте за допомогою прийнятної процедури скринінгу для виділення В-клітин, експресуючих DLL4-специфічне мембрано-зв'язане антитіло, наприклад, шляхом поділу клітин за допомогою DLL4-афінної хроматографії або адсорбції клітин на DLL4, міченому флуорохромом, і наступного клітинного сортиру з активацією флуоресценції (FACS).

Альтернативно, використання клітин селезінки і/або В-клітин або інших ЛПК, узятих від неімунізованого донора, забезпечує переважне представлення можливого репертуару антитіл, також дозволяє конструювати бібліотеку антитіл у тварин будь-якого виду (у людини або в інших тварин), у яких DLL4 не є антигеном. Для створення бібліотек, що включають конструкцію генів антитіл *in vitro*, в індивідуума беруть стовбурові клітини й виділяють нуклеїнові кислоти, що кодують неаранжовані сегменти генів антитіл. Імунні клітини, що представляють інтерес, можуть бути виділені у тваринних різних видів, таких як людина, миші, щура, зайцеподібні, вовки, собаки, кішки, свині, корови, коні, птахи й т.п.

Нуклеїнову кислоту, що кодує сегменти генів варіабельних областей антитіла (включаючи VH- і VL-сегменти), виділяють із клітин, що представляють інтерес, і ампліфікують. У випадку використання бібліотек реаранжованих генів VH і VL, потрібна ДНК може бути отримана шляхом виділення геномної ДНК або мРНК із лімфоцитів з наступним проведенням полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з використанням праймерів, що відповідають 5'- і 3'-кінцям реаранжованих генів VH і VL, описаних у публікації Orlandi et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 86: 3833-3837 (1989), і тим самим одержання різних наборів V-генів для експресії. V-гени можуть бути ампліфіковані із кДНК і геномної ДНК

із використанням зворотних праймерів біля 5'-кінця екзону, що кодує зрілий V-домен, і прямих праймерів, отриманих на основі J-сегмента як описано в публікаціях Orlandi et al. (1989) і Ward et al., *Nature*, 341: 544-546 (1989). Однак для ампліфікації із кДНК, зворотні праймери можуть бути також отримані на основі лідерного екзону, як описано в публікації Jones et al., *Biotechnol.*, 9: 88-89 (1991), прямі праймери можуть бути введені в константну область, як описано в публікації Sastry et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 86: 5728-5732 (1989). Для максимізації комплементарності можуть бути отримані виведені праймери, описані в публікації Orlandi et al. (1989) або Sastry et al. (1989). Переважно, різноманіття бібліотек максимізують із використання ЛПР-праймерів, націлених на кожне сімейство V-генів, з метою ампліфікації всіх наявних аранжувань VH і VL, присутніх у зразку нуклеїнової кислоти імунної клітини, наприклад, методом, описаним у публікації Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), або методом, описаним у публікації (Drum et al., *Nucleic Acids Res.*, 21: 4491-4498 (1993)). Для клонування ампліфікованої ДНК в експресійні вектори, у ЛПР-праймер можуть бути введені рідкі рестрикційні сайти як мітка біля одного кінця, як описано Orlandi et al. (1989), або таке введення може бути здійснене за допомогою ЛПР-ампліфікації з використанням міченого праймера, як описано Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991).

Набори синтетично реаранжованих генів V можуть бути отримані *in vitro* з V-генних сегментів. Більшість сегментів людських генів VH були клоновані й секвеновані (як повідомлялося в публікації Tomlinson et al., *J. Mol. Biol.*, 227: 776-798 (1992)), потім картовані (як повідомлялося в публікації Matsuda et al., *Nature Genet.*, 3: 88-94 (1993)); і ці клоновані сегменти (включаючи всі основні конформації петлі H1 і H2) можуть бути використані для одержання різних наборів генів VH з використанням ЛПР-праймерів, кодуючих петлі H3, що мають різні послідовності й різні довжини, як описано в публікації Hoogenboom і Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992). Можуть бути також отримані набори VH, що мають все різноманіття послідовностей, зосереджене в довгій петлі H3 однієї довжини, як описано в публікації Barbas et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4457-4461 (1992). Були клоновані й секвеновані людські сегменти V<sub>κ</sub> і V<sub>λ</sub> (як повідомлялося в публікації Williams & Winter, *Eur. J. Immunol.*, 23: 1456-1461 (1993)) і такі сегменти можуть бути використані для одержання синтетичних наборів легких ланцюгів. Набори синтезованих генів V, отриманих на основі складчастої структури ряду VH і VL, і L3 і H3 різної довжини, будуть кодувати антитіла зі структурою, яка значно варіюється. Після ампліфікації кодуючої ДНК гена V, сегменти гена V зародкової лінії можуть бути реаранжовані *in vitro* методами, описаними в публікації Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992).

Набори фрагментів антитіл можуть бути сконструйовані шляхом об'єднання наборів генів VH і VL декількома шляхами. Кожний набір може бути створений у різних векторах, і ці вектори піддають

рекомбінації *in vitro*, наприклад, як описано в публікації Hogrefe et al., *Gene*, 128: 119-126 (1993), або *in vivo* шляхом комбінаторного інфікування, наприклад, системою loxP, описаною в публікації Waterhouse et al., *Nucl. Acids Res.*, 21: 2265-2266 (1993). У методі рекомбінації *in vivo* використовується дволанцюжкова природа Fab-фрагментів для усунення обмеження, що накладається на розмір бібліотеки й пов'язаного з ефективністю трансформації *E. coli*. Вихідні набори VH і VL клонують окремо, один у фагмід, інший - у фаговий вектор. Потім дві бібліотеки об'єднують шляхом інфікування бактерії, що містить фагмід, фагом, так, щоб кожна клітина містила різні комбінації, розмір бібліотеки був обмежений тільки числом присутніх клітин (приблизно  $10^{12}$  клонів). Обидва вектори містять сигнали рекомбінації *in vivo*, у результаті чого гени VH і VL піддаються рекомбінації з утворенням одного реплікону й спільно впаковуються у фагові віріони. Ці величезні бібліотеки представляють велику кількість різних антитіл з високою афінністю ( $K_d^{-1}$  приблизно  $10^8$  М).

Альтернативно, такі набори можуть бути послідовно клоновані в той самий вектор, наприклад, як описано в публікації Barbas et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 7978-7982 (1991), або вони можуть бути зібрані разом за допомогою ПЛР, потім клоновані, наприклад, як описано в публікації Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991). ПЛР-зборка може бути також здійснена для приєднання ДНК VH і VL до ДНК, що кодує гнучкий пептидний спейсер, з утворенням наборів одноланцюжкових Fv (scFv). У ще одному методі, «ПЛР-Зборка в клітинах» застосовується для об'єднання генів VH і VL у лімфоцитах за допомогою ПЛР із наступним клонуванням наборів зчеплених генів, як описано в публікації Embleton et al., *Nucl. Acids Res.*, 20: 3831-3837 (1992).

Антитіла, продуковані вихідними бібліотеками (природними або синтетичними), можуть мати невисоку афінність ( $K_d^{-1}$  приблизно від  $10^6$  до  $10^7$  М<sup>-1</sup>), однак дозрівання афінності може бути також змодельоване *in vitro* шляхом конструювання й повторного відбору із вторинних бібліотек, як описано в публікації Winter et al. (1994), див. вище. Так, наприклад, мутація може бути уведена випадково *in vitro* з використанням полімеразної реакції з імовірністю помилки (reported in Leung et al., *Technique*, 1: 11-15 (1989)) у методі, описаному Hawkins et al., *J. Mol. Biol.*, 226: 889-896 (1992) або методі, описаному Gram et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 3576-3580 (1992). Крім того, дозрівання афінності може бути здійснене за допомогою випадкової мутації однієї або декількох CDR, наприклад, за допомогою ПЛР, проведеної з використанням праймерів, що несуть рандомізовану послідовність, що охоплює представляючу інтерес CDR в окремо вибраних Fv-клонів, і за допомогою скринінгу клонів з більш високою афінністю. У заявці WO 9607754 (опублікованій 14 березня 1996) описаний метод індукування мутагенезу в гіперваріабельні області легкого ланцюга імуноглобуліну з одержанням бібліотеки генів легкого ланцюга. Іншим ефективним методом є рекомбінація доменів VH або VL, відібраних за допомогою фагового

представлення, з наборами природних варіантів V-домену, виділених у неімунізованих донорів, і скринінг на більш високу афінність, проведений у декілька раундів перестановки ланцюгів, як описано в публікації Marks et al., *Biotechnol.*, 10: 779-783 (1992). Цей метод дозволяє продукувати антитіла й фрагменти антитіл з афінностями в межах  $10^{-9}$  М.

Послідовності нуклеїнової кислоти й амінокислотні послідовності DLL4 відомі фахівцям. Послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує DLL4, може бути сконструйована з використанням амінокислотної послідовності потрібної області DLL4. Альтернативно, послідовність кДНК (або її фрагменти) депонована в GenBank під рег. № NM\_019074. DLL4 являє собою трансмембранний білок. Позаклітинна область містить 8 EGF-подібних повторів, також домен DSL, який є консервативним для всіх лігандів Notch і необхідним для зв'язування з рецептором. Передбачений білок також містить трансмембранну область і цитоплазматичний «хвіст», який не містить яких-небудь каталітичних мотивів. Людський білок DLL4 являє собою білок з 685 амінокислот і містить наступні області: сигнальний пептид (амінокислоти 1-25); MNLL (амінокислоти 26-92); DSL (амінокислоти 155-217); EGF-подібну область (амінокислоти 221-251); EGF-подібну область (амінокислоти 252-282); EGF-подібну область (амінокислоти 284-322); EGF-подібну область (амінокислоти 324-360); EGF-подібну область (амінокислоти 366-400); EGF-подібну область (амінокислоти 402-438); EGF-подібну область (амінокислоти 440-476); EGF-подібну область (амінокислоти 480-518); трансмембранну область (амінокислоти 529-551); цитоплазматичний домен (амінокислоти 552-685). Людський DLL4 має реєстраційний номер NM\_019074, мишачий DLL4 має реєстраційний номер NM\_019074.

ДНК, що кодують DLL4, можуть бути отримані різними методами, відомими фахівцям. Такими методами є, але не обмежується ними, хімічний синтез, проведений будь-якими методами, описаними в публікації Engels et al., *Agnew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 28: 716-734 (1989), такими як методи з використанням триєфіру, фосфіту, фосфорамідиту й Н-фосфонату. В одному з варіантів винаходу, для конструювання DLL4-кодуючої ДНК використовують кодони, що є переважними при експресії в клітинах-хазяях. Альтернативно, ДНК, що кодує DLL4, може бути виділена з геномної бібліотеки або бібліотеки кДНК.

Після конструювання молекули ДНК, що кодує DLL4, цю молекулу ДНК функціонально приєднують до послідовності регуляції експресії в експресійному векторі, такому як, плазмід, де вказана регуляторна послідовність розпізнається клітиною-хазяєм, трансформованою даним вектором. В загальних рисах, плазмідні вектори містять послідовності реплікації й регуляторні послідовності, що походять від видів, сумісних із клітиною-хазяєм. Такий вектор звичайно містить сайт реплікації, також послідовності, що кодують білки, що дозволяють здійснювати фенотиповий відбір у трансформованих клітинах. Прийнятні вектори для експресії



пресії в прокаріотичних і в еукаріотичних клітинах-хазях відомі фахівцям, і деякі з них більш докладно описані нижче. При цьому, можуть бути використані еукаріотичні організми, такі як дріжджі, або клітини, що походять від багатоклітинних організмів, таких як ссавці.

ДНК, що кодує DLL4, може бути, але необов'язково, функціонально приєднана до секреторної лідерної послідовності, що може приводити до секреції продукту експресії клітиною-хазею у культуральному середовищі. Прикладами секреторних лідерних послідовностей є *stII*, *екотин*, *lamB*, *ГД* (глутамат-дегідрогеназа) вірусу герпеса, *lpp*, лужна фосфатаза, інвертаза й альфа-фактор. У даному винаході може бути також використана лідерна послідовність білка А, що складається з 36 амінокислот (Abrahmsen et al., EMBO J., 4: 3901 (1985)).

Клітини-хазяї трансфікують, переважно, трансформують вищеописаними експресійними або клонуючими векторами відповідно до винаходу й культивують у прийнятних поживних середовищах, модифікованих, якщо це необхідно, для індукування промоторів, відбору трансформантів або ампліфікації генів, що кодують потрібні послідовності.

Термін «трансфекція» означає поглинання експресійного вектора клітиною-хазею, незалежно від того, чи експресує вона які-небудь кодуючі послідовності чи ні. Різні методи трансфекції відомі середньому фахівцеві в даній галузі, і такими методами є, наприклад,  $\text{CaPO}_4$ -преципітація й електропорація. Успішну трансфекцію звичайно визначають по будь-якій ознаці, що вказує на присутність вказаного вектора в клітині-хазяї. Методи трансфекції добре відомі фахівцям, і деякі з них більш докладно описані в даній заявці.

Термін «трансформація» означає введення ДНК в організм так, щоб вона могла реплікуватися як позахромосомний елемент або як хромосомний компонент. Залежно від використовуваної клітини-хазяя, трансформацію здійснюють із застосуванням стандартних методів, що підходять для таких клітин. Методи трансформації добре відомі фахівцям, і деякі з них більш докладно описані в даній заявці.

Прокаріотичні клітини-хазяї, використовувані для продукування DLL4, можуть бути культивовані, в основному, як описано в керівництві Sambrook et al., див. вище.

Клітини-хазяї ссавців, які використовуються для продукування DLL4, можуть бути культивовані в різних середовищах, які добре відомі фахівцям, і деякі з яких описані в даній заявці.

Клітини-хазяї, описані в даній заявці, включають клітини в культурі *in vitro*, також клітини тварини-хазяя.

Очищення DLL4 може бути здійснене добре відомими методами, деякі з яких описані в даній заявці.

Очищені DLL4 можуть бути зв'язані з відповідною матрицею, такою як сфери з агарозним гелем, акриламідні сфери, скляні кульки, целюлоза, різні акрилові співполімери, гідроксилметакрилатні гелі, співполімери поліакрилової й поліметакрилової кислоти, нейлон, нейтральні й іонні носії й т.п., з

метою їхнього використання в афінній хроматографії для поділу клонів, представлених на фагах. Приєднання білка DLL4 до матриці може бути здійснене будь-якими методами, описаними в *Methods in Enzymology*, vol. 44 (1976). Методи, звичайно застосовувані для приєднання лігандів білків до полісахаридних матриць, наприклад, агарози, декстрану або целюлози, включають активацію носія ціангалогенідами й наступне зв'язування первинних аліфатичних або ароматичних амінів пептидних лігандів з активованою матрицею.

Альтернативно, DLL4 може бути використаний для покриття ямок адсорбційних планшетів і експресований на клітинах-хазях, прикріплених до адсорбційних планшетів, або він може бути використаний у клітинному сортигу або кон'югований з біотином для зв'язування зі сферами, покритими стрептавідином, або він може бути використаний у будь-якому іншому відомому методі для пеннінгу бібліотек фагового представлення.

Зразки фагових бібліотек піддають контактуванню з іммобілізованим DLL4 в умовах, що підходять для зв'язування щонайменше частини фагових частинок з адсорбентом. Звичайно, для імітації фізіологічних умов вибирають відповідні рН, іонну силу, температуру й т.п. Фаги, пов'язані із твердою фазою, промивають, потім елюють кислотою, наприклад, як описано в публікації Barbas et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 7978-7982 (1991), або лугом, наприклад, як описано в публікації Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), або шляхом конкурентного зв'язування з антигеном DLL4, наприклад, відповідно до процедури, аналогічній процедурі, здійснюваній в методі конкурентного зв'язування з антигеном, як описано в публікації Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991). Фаги можуть бути піддані 1000-кратному збагаченню в одному раунді відбору. Крім того, збагачені фаги можуть бути вирощені в бактеріальній культурі й піддані додатковим раундам відбору.

Ефективність відбору залежить від багатьох факторів, включаючи кінетику дисоціації під час промивання, і від здатності множини фрагментів антитіла одночасно зв'язуватися з антигеном на одному фагу. Антитіла зі швидкою кінетикою дисоціації (і слабкою афінністю зв'язування) можуть бути фіксовані завдяки короткочасним промиванням, застосуванню мультівалентного фагового представлення й високої щільності покриття антигену на твердій фазі. Така висока щільність не тільки дозволяє стабілізувати фаг завдяки мультівалентним взаємодіям, але також сприяє повторному зв'язуванню фага, що є дисоційованим. Відбір антитіл зі слабкою кінетикою дисоціацією (і з високою афінністю зв'язування) може бути поліпшений завдяки більш тривалим промиванням і застосуванню моновалентного фагового представлення, описаного в публікації Bass et al., *Proteins*, 8: 309-314 (1990) і в WO 92/09690, також завдяки низькій щільності покриття антигену, як описано в публікації Marks et al., *Biotechnol.*, 10: 779-783 (1992).

Може бути проведений відбір між фаговими антитілами з різними афінностями, навіть із афінністю, яка не дуже відрізняється, по відношенню

до DLL4. Однак випадкова мутація вибраного антитіла (наприклад, внесена при здійсненні деяких з описаних вище методів дозрівання афінності), імовірно, буде приводити до утворення множини мутантів, більшість із яких будуть зв'язуватися з антигеном, деякі з них із ще більшою афінністю. При обмеженому рівні DLL4, не кожен фаг з високою афінністю може витримати таку конкуренцію. Для збереження всіх мутантів з більш високою афінністю, фаги можуть бути інкубовані з надлишком біотинізованого DLL4, але цей біотинізований DLL4 повинен мати більш низьку молярну концентрацію, ніж молярна константа афінності мішені для DLL4. Потім фаги з високою афінністю зв'язування можуть бути захоплені парамагнітними сферами, покритими стрептавідином. Таке «рівноважне захоплення» дає можливість проводити відбір антитіл по їх афінності зв'язування із чутливістю, що дозволяє з великого надлишку фагів з меншою афінністю виділити мутантні клони, що мають лише у два рази більш високу афінність. Умови, використовувані для промивання фагів, пов'язаних із твердою фазою, можуть бути також змінені для виявлення їхніх відмінностей виходячи з кінетики дисоціації.

Клони анти-DLL4-антитіл можуть бути відібрані по їхній активності. В одному зі своїх варіантів, даний винахід належить до анти-DLL4-антитіл, які блокують зв'язування рецептора Notch (такого як Notch1, Notch2, Notch3 і/або Notch4) з DLL4, але не блокують зв'язування рецептора Notch із другим білком. Fv-клони, що відповідають таким анти-DLL4-антитілам, можуть бути відібрані шляхом: (1) виділення клонів анти-DLL4-антитіл з фагової бібліотеки як описано вище, і, але необов'язково, ампліфікації виділеної популяції фагових клонів шляхом культивування такої популяції в прийнятному бактеріальному хазяї; (2) вибору DLL4 і другого білка, проти якого необхідно продукувати блокуючу й не-блокуючу активність, відповідно; (3) адсорбції фагових клонів анти-DLL4-антитіл на іммобілізованому DLL4; (4) використання надлишку другого білка для елюювання будь-яких небажаних клонів, що розпізнають DLL4-зв'язувальні детермінанти, які перекриваються зі зв'язувальними детермінантами другого білка або мають спільні з ним зв'язувальні детермінанти; і (5) елюювання клонів, які залишаються адсорбованими після проведення стадії (4). Клони з потрібними блокуючими/неблокуючими властивостями, можуть бути також, але необов'язково, збагачені шляхом проведення однієї або декількох повторних процедур відбору, описаних у даній заявці.

ДНК, що кодує продуковані гібридомною моноклональні антитіла або Fv-клони фагового представлення відповідно до винаходу, можуть бути легко виділені й секвеновані відповідно до стандартних процедур (наприклад, з використанням олігонуклеотидних праймерів, які здатні специфічно ампліфікувати представляючі інтерес кодуючі області важкого й легкого ланцюгів з гібридомної або фагової Днк-матриці). Після виділення, ця ДНК може бути убудована в експресійні вектори, які потім трансфікують у клітини-хазяї, такі як клітини *E.coli*, мавпячі клітини CO, клітини яєчника китайського

хом'ячка (CHO) або мієломні клітини, які, в інших випадках, не продукують білок імуноглобуліну, у результаті чого в цих рекомбінантних клітинах-хазяях синтезуються потрібні моноклональні антитіла. Обговорення рекомбінантної експресії антитіло-кодуючої ДНК у бактеріях можна знайти в оглядових статтях Skerra et al., *Curr. Opinion in Immunol.*, 5:256-262 (1993) і Pluckthun, *Immunol. Revs.*, 130:151-188 (1992).

ДНК, кодує Fv-клони відповідно до винаходу, може бути об'єднана з відомими послідовностями ДНК, що кодують константні області важкого ланцюга і/або легкого ланцюга (наприклад, відповідає послідовності ДНК можуть бути отримані, як описано в публікації Kabat et al., див. вище) з утворенням клонів, що кодують повнорозмірні важкі і/або легкі ланцюги або їхніх фрагменти. Слід зазначити, що в цих цілях можуть бути використані константні області будь-якого ізотипу, включаючи константні області IgG, IgM, IgA, IgD і IgE, і такі константні області можуть бути отримані від людини або тварин будь-яких видів. У визначення використовуваного тут терміна «химерне» і «гібридне» антитіло входить Fv-клон, що походить від ДНК варіабельного домену тварини одного виду (наприклад, людини), що був потім приєднаний до ДНК константної області тварини іншого виду з утворенням кодуючої(их) послідовності(ей) «гібрида» повнорозмірного важкого ланцюга і/або легкого ланцюга. У переважному варіанті винаходу, Fv-клон, що походить від ДНК людського варіабельного домену, приєднують до ДНК людської константної області з утворенням кодуючої(их) послідовності(ей) для всіх людських повнорозмірних важких і/або легких ланцюгів і/або їхніх фрагментів.

ДЕК, що кодує анти-DLL4-антитіло, що походить від гібридомної відповідно до винаходу, може бути також модифікована, наприклад, шляхом заміни гомологічних мишачих послідовностей, що походять від гібридомного клону, кодуючою послідовністю для людських константних доменів важкого й легкого ланцюгів (наприклад, як у способі, описаному Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851-6855 (1984)). ДНК, що кодує антитіло, що походить від гібридомної або Fv-клону або його фрагмент, може бути також модифікована шляхом ковалентного зв'язування імуноглобулін-кодуючої послідовності з повнорозмірною послідовністю, що кодує не-імуноглобуліновий поліпептид, або з її частиною. Таким чином можуть бути отримані «химерні» або «гібридні» антитіла, що мають специфічність зв'язування з антитілами, що походять від Fv-клону або гібридомного клону.

Фрагменти антитіл

Даний винахід охоплює фрагменти антитіл. У деяких випадках переважніше використовувати фрагменти антитіл, не повнорозмірні антитіла. Чим менший розмір фрагментів, тим швидший їхній кліренс і вища ймовірність поліпшення доставки в солідні пухлини.

Для одержання фрагментів антитіл були розроблені різні методи. Традиційно, ці фрагменти утворюються в результаті протеолітичного розщеплення інтактних антитіл (див., наприклад,

Morimoto et al., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24: 107-117 (1992) і Brernnan et al., *Science*, 229:81 (1985)). Однак, ці фрагменти можуть продукуватися безпосередньо рекомбінантними клітинами-хазяями. Fab-, Fv- і scFv-фрагменти антитіл можуть експресуватися в клітинах *E.coli* і секретуватися із цих клітин, що полегшує продукування цих фрагментів у більших кількостях. Фрагменти антитіл можуть бути виділені з фагових бібліотек антитіл, обговорюваних вище. Альтернативно, Fab'-SH-фрагменти можуть бути безпосередньо виділені з *E.coli* і хімічно зв'язані з утворенням F(ab')<sub>2</sub>-фрагментів (Carter et al., *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). Відповідно до іншого підходу, F(ab')<sub>2</sub>-фрагменти можуть бути виділені безпосередньо з культури рекомбінантної клітини-хазяя. Fab- і F(ab')<sub>2</sub>-фрагменти зі збільшеним часом напівжиття *in vivo*, що містять залишки епітопу, що зв'язується з рецептором «порятунку», описані в патенті США № 5869046. Фахівцям відомі й інші способи одержання фрагментів антитіл. В інших варіантах винаходу, вибраним антитілом є одноклановий Fv-фрагмент (scFv). Див. WO 93/16185, патенти США №№ 5571894 і 5587458. Fv і scFv належать тільки до тих видів, які містять інтактні комбіновані сайти, позбавлені константних областей, тому вони можуть бути прийнятними для зниження рівнів неспецифічного зв'язування при їхньому використанні *in vivo*. Гібридні scFv-білки можуть бути сконструйовані з одержанням гібриду ефекторного білка біля аміно- або карбоксикінця scFv. См. *Antibody Engineering*, ed. Vorrebaeck, див. вище. Фрагментом антитіла може бути також "лінійне антитіло", наприклад, антитіло, описане в патенті США № 5641870. Такі лінійні фрагменти антитіл можуть бути моноспецифічними або біспецифічними.

#### Гуманізовані антитіла

Даний винахід охоплює гуманізовані антитіла. Фахівцям відомі різні методи гуманізації не-людських антитіл. Так, наприклад, гуманізоване антитіло може мати один або декілька уведених у нього амінокислотних залишків, що походять від джерела, яке не є людиною. Ці не-людські амінокислотні залишки часто називають "імпортними" залишками, які звичайно беруть із "імпортного" варіабельного домену. Гуманізація може бути здійснена, в основному, методом Вінтера (Winter) і співробітниками (Jones et al. (1986) *Nature* 321:522-525; Riechmann et al. (1988) *Nature* 332:323-327; Verhoeven et al. (1988) *Science* 239:1534-1536), шляхом заміни послідовностей гіперваріабельної області відповідними послідовностями людського антитіла. Відповідно до цього, такі "гуманізовані" антитіла являють собою химерні антитіла (патент США № 4816567), у яких, в основному, менша частину, у порівнянні з варіабельним доменом інтактного людського антитіла, замінена відповідною послідовністю, що походить від не-людського антитіла. Фактично, гуманізовані антитіла звичайно являють собою людські антитіла, у яких деякі залишки гіперваріабельної області й можливо, деякі залишки каркасної області (FR) замінені залишками, що походять від аналогічних ділянок антитіл гризунів.

Для зниження антигенності при створенні гуманізованих антитіл дуже важливо вибрати варіабельні домени як легкого, так і важкого ланцюга людського антитіла. Відповідно до так званого методу "пригонки", послідовність варіабельного домену антитіла гризуна скринують по всій бібліотеці відомих послідовностей варіабельних доменів людського антитіла. Потім, людську послідовність, що є найбільш схожою з послідовністю гризунів, беруть як людську каркасну область для створення гуманізованого антитіла (Sims et al. (1993) *J. Immunol.* 151:2296; Chothia et al. (1987), *J. Mol. Biol.* 196:901). В іншому методі використовують конкретну каркасну область, що походить від консенсусної послідовності всіх людських антитіл конкретної підгрупи легких або важких ланцюгів. Та ж сама каркасна область може бути використана для декількох різних гуманізованих антитіл (Carter et al. (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 89:4285; Presta et al. (1993), *J. Immunol.*, 151:2623).

Важливо також те, що антитіла можуть бути гуманізовані зі збереженням високої афінності по відношенню до даного антигену й інших сприятливих біологічних властивостей. Відповідно до одного з методів, для досягнення цієї мети, гуманізовані антитіла можуть бути отримані шляхом аналізу вихідних послідовностей і різних концептуальних гуманізованих продуктів з використанням тривимірних моделей батьківських і гуманізованих послідовностей. Тривимірні імуноглобулінові моделі є загальнодоступними й добре відомі фахівцям. Існують комп'ютерні програми, які ілюструють і представляють імовірні тривимірні конформаційні структури відібраних послідовностей-кандидатів імуноглобулінів. Дослідження цих представлень дозволяє проаналізувати ймовірну роль даних залишків у функціонуванні послідовностей імуноглобуліну-кандидата, тобто залишків, які впливають на здатність імуноглобуліну-кандидата зв'язуватися з його антигеном. Таким чином, залишки FR можуть бути вибрані з реціпієнтних і "імпортних" послідовностей і об'єднані, у результаті чого може бути отримане бажане антитіло з потрібними властивостями, такими як підвищена афінність по відношенню до антигену(ів)-мішені(ей). В загальних рисах, залишки гіперваріабельної області безпосередньо впливають на зв'язування з антигеном, в основному беруть участь у такому зв'язуванні.

#### Людські антитіла

Людські анти-DLL4-антитіла відповідно до винаходу можуть бути сконструйовані шляхом об'єднання послідовності(ей) варіабельного домену Fv-клону, вибраної(их) з бібліотек фагового представлення, що походять від людини, з відомою(ими) послідовністю(ями) людського константного домена, як описано вище. Альтернативно, людські моноклональні анти-DLL4-антитіла відповідно до винаходу можуть бути отримані гібридомним методом. Людські мієломні клітинні лінії й гетеромієломні клітинні лінії «миша-людина», використовувані для продукування людських моноклональних антитіл, описані, наприклад, у публікаціях Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and*

Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); i Boerner et al., J. Immunol, 147: 86 (1991).

У цей час можуть бути отримані трансгенні тварини (наприклад, миші), які будуть здатні після імунізації продукувати повний репертуар людських антитіл без продукування ендogenous імуноглобуліну. Так, наприклад, повідомлялося, що гомозиготна делеція гена області стику у важкому ланцюзі (J $\kappa$ ) антитіла в химерних і мутантних мишей зародкової лінії приводить до повного інгібування продукування ендogenous антитіла. Перенесення набору генів імуноглобуліну людської зародкової лінії таким мутантним мишам зародкової лінії може приводити до продукування людських антитіл після стимуляції антигеном. Див. наприклад, Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., Nature 362:255-258 (1993); Bruggerman et al., Year in Immunol, 7:33 (1993).

Для одержання людських антитіл від тварин, які не є людиною, наприклад, гризунів, де людське антитіло має таку ж афінність й специфічність по відношенню до вихідного не-людського антитіла, може бути також застосований метод перестановки генів. Відповідно до цього методу, що також називається «імпринтингом епітопу», варіабельну область важкого або легкого ланцюга фрагмента не-людського антитіла, отриману методами фагового представлення, описаними вище, замінюють набором людських генів V-домену з одержанням популяції химер «не-людський ланцюг/людський ланцюг scFv або Fab». Відбір з використанням антигену дозволяє виділяти химери «не-людський ланцюг/людський ланцюг scEv або Fab», антигензв'язувальний сайт, зруйнований після видалення відповідного нелюдського ланцюга в первинному клоні фагового представлення, тобто епітоп визначає (закріплює) вибір партнера для людського ланцюга. Якщо цей процес повторити для заміни не-людського ланцюга, який залишився, то може бути отримане людське антитіло (див. заявку PCT WO 93/06213, опубліковану 1 квітня, 1993). На відміну від традиційного способу гуманізації не-людських антитіл шляхом приєднання CDR, цей спосіб дозволяє одержати повністю людські антитіла, які не мають залишків FR або CDR, які походять не від людини.

#### Біспецифічні антитіла

Біспецифічні антитіла являють собою моноклональні, переважно, людські або гуманізовані антитіла, які мають специфічність зв'язування щонайменше із двома різними антигенами. У цьому випадку, однією зі специфічностей зв'язування є специфічність зв'язування з DLL4, іншою специфічністю є специфічність до будь-якого іншого антигену. Репрезентативні біспецифічні антитіла можуть зв'язуватися із двома різними епітопами білка DLL4. Біспецифічні антитіла можуть бути також використані для визначення локалізації цитотоксичних агентів у клітинах, які експресують DLL4. Такі антитіла мають DLL4-зв'язувальну гілку, і гілку, що зв'язується із цитотоксичним агентом (наприклад, із сапорином, антитілом проти інтерферону- $\alpha$ , вінкакалоїдом, ланцюгом рицину A, метотрексатом

або гаптенем, зв'язаним з радіоактивним ізотопом). Біспецифічні антитіла можуть бути отримані у вигляді повнорозмірних антитіл або фрагментів антитіл (наприклад, біспецифічних F(ab')<sub>2</sub>-антитіл).

Методи одержання біспецифічних антитіл відомі фахівцям. Традиційне рекомбінантне продукування біспецифічних антитіл ґрунтується на коекспресії двох пар важкого ланцюга-легкого ланцюга імуноглобуліну, де два важкі ланцюги мають різну специфічність (Millstein & Cuello, Nature, 305:537 (1983)). Ці гібридоми (квадромі), через рандомізований набір важкого й легкого ланцюгів імуноглобуліну, продукують потенційну суміш із 10 різних молекул антитіл, з яких тільки одна молекула має "правильну" біспецифічну структуру. Очищення такої "правильної" молекули, що звичайно здійснюють шляхом постадійного проведення афінної хроматографії, достатньо утруднене й дає низький вихід продукту.

Аналогічні процедури описані в заявці WO 93/08829, опублікованій 13 травня 1993 року, і в роботі Traunecker et al., EMBO J., 10:3655 (1991).

Відповідно до іншого і більш переважного підходу, варіабельні домени антитіла з потрібними специфічностями зв'язування (об'єднані сайти "антитіло-антиген") приєднують до послідовностей константного домена імуноглобуліну. Таке злиття, переважно, здійснюють із константним доменом важкого ланцюга імуноглобуліну, що містить щонайменше частину шарнірної області, CH2 і CH3. При цьому, переважно, щоб щонайменше в одному з гібридів була присутня перша константна область важкого ланцюга (CH1), що містить сайт, необхідний для зв'язування з легким ланцюгом. ДНК, що кодує гібриди важкого ланцюга імуноглобуліну й, якщо це необхідно, легкого ланцюга імуноглобуліну, вбудовують в окремі експресійні вектори, і ко-трансфікують у прийнятний організм-хазяїн. Це забезпечує високий ступінь гнучкості при корекції співвідношень трьох поліпептидних фрагментів у тих варіантах винаходу, у яких неоднакові вмісти трьох поліпептидних ланцюгів, використаних у даній конструкції, дають оптимальні виходи. Однак, можна вбудовувати кодуєчі послідовності для двох або всіх трьох поліпептидних ланцюгів в один експресійний вектор, якщо експресія щонайменше двох поліпептидних ланцюгів при однакових співвідношеннях дає високі виходи, або якщо такі співвідношення не мають вирішального значення.

У переважному варіанті такого підходу, біспецифічні антитіла складаються з гібридного важкого ланцюга імуноглобуліну, що має першу специфічність зв'язування, в одній гілці, і гібридної пари "важкий ланцюг - легкий ланцюг" імуноглобуліну (що забезпечує другу специфічність зв'язування), в іншій гілці. Було виявлено, що така асиметрична структура полегшує відділення потрібного біспецифічного сполуки від небажаних комбінацій імуноглобулінових ланцюгів, оскільки присутність легкого ланцюга імуноглобуліну тільки в одній половині біспецифічної молекули забезпечує простий спосіб його виділення. Цей спосіб описаний в WO 94/04690. Більш докладний опис одержання біспецифічних антитіл можна знайти, наприклад, у

роботі Sares et al., *Methods in Enzymology*, 121:210(1986).

Відповідно до іншого підходу, межа між парю молекул антитіла може бути сконструйована з метою максимізації відсотка гетеродимерів, виділених з рекомбінантної клітинної культури. Така межа, переважно, містить щонайменше частину домена C<sub>H</sub>3 константного домена антитіла. У цьому методі, невеликі бічні ланцюги однієї або декількох амінокислот у пограничній області першої молекули антитіла замінюють більшими бічними ланцюгами (наприклад, тирозину або триптофану). У пограничній області другої молекули антитіла створюють компенсуючі "порожнини", що мають розмір, ідентичний або аналогічний розміру більшого(их) бічного(их) ланцюга(ів), шляхом заміни великих бічних ланцюгів амінокислот більш дрібними бічними ланцюгами (наприклад, аланіну або треоніну). Це дозволяє збільшити вихід гетеродимерів по відношенню до інших небажаних кінцевих продуктів, таких як гомодимери.

Біспецифічними антитілами є перехресно-зв'язані або «гетерокон'юговані» антитіла. Так, наприклад, одне з антитіл у гетерокон'югаті може бути зв'язане з авідіном, інше - з біотином. Було висловлене припущення, що такі антитіла можуть бути, наприклад, націлювати клітини імунної системи на небажані клітини (патент США № 4676980), тому вони можуть бути використані для лікування ВІЛ-інфекцій (WO 91/00360, WO 92/00373 і EP 03089). Гетерокон'юговані антитіла можуть бути отримані із застосуванням будь-яких стандартних методів перехресного зв'язування. Прийнятні перехресно-зв'язувальні агенти добре відомі фахівцям і описані в патенті США № 4676980 поряд з різними методами перехресного зв'язування.

Методи продукування біспецифічних антитіл із фрагментів антитіл були також описані в літературі. Так, наприклад, біспецифічні антитіла можуть бути отримані шляхом хімічного зв'язування. У роботі Brennan et al., *Science*, 229:81 (1985) описана процедура, у якій інтактні антитіла піддають протеолітичному розщепленню з утворенням F(ab')<sub>2</sub>-фрагментів. Ці фрагменти відновлюють у присутності агента, який утворює дитіоловий комплекс, такого як арсеніт натрію, для стабілізації суміжних дитіолів і запобігання утворенню міжмолекулярного дисульфідного зв'язку. Потім отримані Fab'-фрагменти перетворюють у похідні тіонитробензоату (TNB). Після цього, одне з похідних Fab'-TNB знову перетворюють в Fab'-тіол шляхом відновлення меркаптоетиламіном і змішують із еквімолярною кількістю іншого Fab'-TNB-похідного, у результаті чого одержують біспецифічне антитіло. Такі продуковані біспецифічні антитіла можуть бути використані як агенти для селективної іммобілізації ферментів.

Останні досягнення в даній сфері дозволяють проводити пряме виділення з *E.coli* Fab'-SH-фрагментів, які можуть бути хімічно зв'язані з утворенням біспецифічних антитіл. У роботі Shalaby et al., *J. Exp. Med.* 175:217-225 (1992) описане продукування повністю гуманізованої молекули F(ab')<sub>2</sub> біспецифічного антитіла. Кожний Fab'-

фрагмент був окремо секретований з *E.coli* і підданий прямому хімічному зв'язуванню *in vitro* з утворенням біспецифічного антитіла. Отримане наступним чином біспецифічне антитіло має здатність зв'язуватися із клітинами, надекспресуючими рецептор HE2 і з нормальними людськими Т-клітинами, також запускати літичну активність людських цитотоксичних лімфоцитів, спрямовану проти людських клітин-мішеней пухлини молочної залози.

Були також описані інші методи одержання й виділення фрагментів біспецифічного антитіла безпосередньо з рекомбінантної клітинної культури. Так, наприклад, біспецифічні антитіла були продуковані з використанням "лейцинових блискавок". Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992). Пептиди лейцинової блискавки, що походять від білків Fos і Jun, були приєднані до Fab'-частин двох інших антитіл шляхом лігування генів. Гомодимери антитіла були відновлені в шарнірній області з утворенням мономерів, потім знову окислені з утворенням гетеродимерів антитіла. Цей метод може бути також використаний для продукування гомодимерів антитіла. Технологія "діантиліл", описана Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 90:6444-6448 (1993), забезпечує альтернативний механізм одержання фрагментів біспецифічного антитіла. Ці фрагменти містять варіабельний домен важкого ланцюга (V<sub>H</sub>), з'єднаний з варіабельним доменом легкого ланцюга (V<sub>L</sub>) за допомогою лінкера, що є занадто коротким для створення пари між двома доменами одного й того ж ланцюга. Відповідно до цього, V<sub>H</sub>- і V<sub>L</sub>-домени одного фрагмента змушені спарюватися з комплементарними V<sub>L</sub>- і V<sub>H</sub>-доменами іншого фрагмента, утворюючи тим самим два антигензв'язувальних сайти. Також була описана інша стратегія одержання фрагментів біспецифічного антитіла з використанням одноланцюжкових Fv(sFv)-димерів. Див. Gruber et al., *J. Immunol.*, 152:5368(1994).

Розглядаються також антитіла з більш ніж двома валентностями. Так, наприклад, можуть бути отримані й триспецифічні антитіла. Tutt et al., *J. Immunol.* 147:60 (1991).

#### Полівалентні антитіла

Полівалентне антитіло може бути швидше інтерналізоване (і/або воно може швидше піддаватися катаболізму), ніж двовалентне антитіло завдяки експресії антигену в клітині, з яким зв'язуються антитіла. Антитілами відповідно до винаходу можуть бути полівалентні антитіла (не приналежні до класу IgM) із трьома або більше антигензв'язувальними сайтами (наприклад, чотиривалентні антитіла), які можуть бути легко продуковані за допомогою рекомбінантної експресії нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептидні ланцюги даного антитіла. Полівалентне антитіло може містити домен димеризації й три або більше антигензв'язувальних сайти. Переважний домен димеризації містить (або складається з них) Fc-область або шарнірну область. У цьому випадку, антитіло може містити Fc-область і три або більше антигензв'язувальних сайти, розташованих від аміно-кінця по відношенню до Fc-області. Описане тут переважне полівалентне антитіло містить (або склада-

ється з них) від трьох приблизно до восьми антигензв'язувальних сайтів, переважно, чотири антигензв'язувальних сайти. Полівалентне антитіло містить щонайменше один поліпептидний ланцюг (а переважно, два поліпептидних ланцюги), де вказаний(і) поліпептидний(і) ланцюг(и) містить(ять) два або більше варіабельних доменів. Так, наприклад, поліпептидний(і) ланцюг(и) може (можуть) містити  $VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc$ , де  $VD1$  являє собою перший варіабельний домен,  $VD2$  являє собою другий варіабельний домен,  $Fc$  являє собою один поліпептидний ланцюг  $Fc$ -області,  $X1$  і  $X2$  являють собою амінокислоту або поліпептид, і  $n$  дорівнює 0 або 1. Так, наприклад, поліпептидний(і) ланцюг(и) може (можуть) містити: ланцюг « $VH-CH1$ -гнучкий лінкер- $VH-CH1-Fc$ -область»; або ланцюг « $VH-CH1-VH-CH1-Fc$ -область». Полівалентне антитіло відповідно до винаходу також, переважно, містить щонайменше два (а переважно, чотири) поліпептиди варіабельного домену легкого ланцюга. Описане тут полівалентне антитіло може, наприклад, містити приблизно від двох до восьми поліпептидів варіабельного домену легкого ланцюга. Розглянуті тут поліпептиди варіабельного домену легкого ланцюга містять варіабельний домен легкого ланцюга, також, але необов'язково, домен  $CL$ .

#### Варіанти антитіл

У деяких варіантах винаходу розглядається модифікація(ї) амінокислотної послідовності описаних тут антитіл. Так, наприклад, може виявитися бажаним підвищити афінність зв'язування і/або інші біологічні властивості антитіла. Варіанти амінокислотної послідовності антитіла одержують шляхом введення відповідних нуклеотидних замін у нуклеїнову кислоту, що кодує антитіло, або шляхом пептидного синтезу. Такими модифікаціями, є, наприклад, делеції і/або інсерції і/або заміни залишків в амінокислотних послідовностях антитіла. При цьому, у кінцеву конструкцію можуть бути введені будь-які комбінації делецій, інсерцій і замін, за умови, що така кінцева конструкція буде мати необхідні властивості. Амінокислотні модифікації можуть бути введені в розглянуту амінокислотну послідовність антитіла в процесі одержання такої послідовності.

Метод, застосований для ідентифікації деяких залишків або областей антитіла, які мають переважну локалізацію для мутагенезу, називається "аланін-скануючим мутагенезом" і описаний Cunningham & Wells (1989), Science, 244:1081-1085. У цьому методі, залишок або групу необхідних залишків (наприклад, заряджені залишки, такі як Arg, Asp, His, Lys і Glu) ідентифікують і замінюють нейтральною або негативно зарядженою амінокислотою (найбільш переважно, аланіном або поліаланіном) для впливу на взаємодію цих амінокислот з антигеном. Потім, локалізацію амінокислот, що проявляють функціональну чутливість до таких замін, уточнюють шляхом введення додаткових або інших модифікацій у положення заміни. Так, наприклад, положення для введення заміни в амінокислотну послідовність може бути визначено заздалегідь, тоді як природа мутації *per se* необов'язково повинна бути визначена заздалегідь. Так,

наприклад, для аналізу ефективності мутації в даному сайті, Ala-скануючий або неспецифічний мутагенез здійснюють у потрібному кодоні або в потрібній області, і експресовані імуноглобуліни скринують на потрібну активність.

Вставками в амінокислотні послідовності є вставки в аміно- і/або карбокси-кінців, які утворюють гібриди, що мають довжину від одного залишку до поліпептидів, що містять сто або більше залишків, також вставки усередині послідовності, що складаються з одного або множини амінокислотних залишків. Прикладами кінцевих інсерцій є антитіло з N-кінцевим метіонільним залишком або антитіло, приєднане до цитотоксичного поліпептиду. Іншими інсерційними варіантами молекули антитіла є гібриди, наприклад, N- або C-кінців антитіла з ферментом (наприклад, для ADEPT) або поліпептидом, що збільшує час напівжиття антитіла в сироватці.

Глікозилювання поліпептидів звичайно є або N-зв'язаним, або O-зв'язаним. N-зв'язане глікозилювання означає приєднання вуглеводної групи до бічного ланцюга аспарагінового залишку. Трипептидні послідовності "аспарагін-х-серин" і "аспарагін-х-треонін", де X означає будь-яку амінокислоту, за винятком проліну, являють собою послідовності розпізнавання для ферментативного приєднання вуглеводної частини до бічного ланцюга аспарагіну. Таким чином, присутність будь-якої із цих трипептидних послідовностей у поліпептиді сприяє створенню потенційного сайту глікозилювання. O-зв'язане глікозилювання означає приєднання одного із цукрів, таких як N-ацетилгалактозамін, галактоза або ксилоза до гідроксиамінокислоти, головним чином, до серину або треоніну, хоча ними можуть бути також 5-гідроксипролін або 5-гідроксилізін.

Приєднання сайтів глікозилювання до антитіла звичайно здійснюють шляхом такої модифікації амінокислотної послідовності, у результаті якої ця амінокислотна послідовність буде містити одну або декілька вищеописаних трипептидних послідовностей (для сайтів N-зв'язаного глікозилювання). Така модифікація може бути також здійснена шляхом додавання до послідовності одного або декількох серинових або треонінових залишків або їхньої заміни в послідовності вихідного антитіла (для сайтів O-зв'язаного глікозилювання).

Якщо антитіло містить  $Fc$ -область, то може бути модифікований вуглевод, приєднаний до цієї області. Так, наприклад, антитіла, що мають вуглевод зі зрілою структурою, у якому відсутня фукоза, і який приєднаний до  $Fc$ -області антитіла, описані в заявці на патент США № 2003/0157108, (Presta, L.). Див. також US 2004/0093621 AI (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Антитіла, які містять у своєму вуглеводі N-ацетилглюкозамін ( $GlcNAc$ ), що розділяє молекулу антитіла навпіл, де вказаний вуглевод приєднаний до  $Fc$ -області антитіла, описані в WO 03/011878, Jean-Mairet et al., і в патенті США № 6602684, Umana et al. Антитіла, що мають щонайменше один галактозний залишок в олігосахариді, приєднаному до  $Fc$ -області антитіла, описані в WO 1997/30087, Patel et al. Див. також заявки WO 98/58964 (Raju, S.) і WO 99/22764--(Raju,

S.), які належать до антитіл з модифікованим вуглеводом, приєднаним до Fc-області антитіла. Див. також заявку США 2005/0123546 (Umana et al.), у якій описані антигензв'язувальні молекули з модифікованим глікозплуванням.

Переважає з погляду даного винаходу варіант глікозилування включає Fc-область, де вуглеводна структура, приєднана до Fc-області, не містить фукозу. Такі варіанти мають поліпшену ADCC-функцію. Fc-область також містить, але необов'язково, одну або декілька амінокислотних заміни, які також поліпшують ADCC-функцію, наприклад, заміни в положеннях 298, 333 і/або 334 Fc-області (нумерація залишків дана по Європейській системі нумерації). Публікаціями, у яких описані "дефукозилізовані" або "дефіцитні по фукозі" антитіла, є, наприклад, заявки на патент США №№ 2003/0157108; WO 2001/61739; WO2001/29246; US2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035778; WO 2005/053742; Okazaki et al. J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004). Прикладами клітинних ліній, які продукують дефукозилізовані антитіла, є клітини Lee13 CHO, дефіцитні по фукозилуванню білка (Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986); заявка на патент США № 2003/0157108 A1, Presta, L; і WO 2004/056312 A1, Adams et al., зокрема, приклад 11), і дефіцитні клітинні лінії, такі як клітини CHO, дефіцитні по гену альфа-1, 6-фукозилтрансферази, FUT8, (Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)).

Варіантом іншого типу є варіант амінокислотної заміни. Такі варіанти антитіл мають у своїй молекулі щонайменше один амінокислотний залишок, замінений іншим залишком. Сайтами, які становлять найбільший інтерес для мутагенезу шляхом заміни, є гіперваріабельні області, однак можуть також розглядатися FR-модифікації. Консервативні заміни представлені в таблиці 1 під заголовком «Переважає заміни». Якщо такі заміни приводять до зміни біологічної активності, то можуть бути введені більш значні заміни, які називаються в таблиці 1 «репрезентативними замінами», або також описані нижче в розділі, що належить до класу амінокислот, потім отримані продукти можуть бути скриніновані.

Таблиця 1

Вихідні залишки	Репрезентативні заміни	Переважає заміни
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg(R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; норлейцин	Leu

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

Значні зміни біологічних властивостей антитіла можуть бути досягнуті шляхом вибору заміни, які значно відрізняються за своїм впливом на (а) структуру поліпептидного кістяка в області заміни, наприклад, складчасту або спіральну конформацію, (b) заряд або гідрофобність молекули в потрібному сайті, або (c) об'єм бічного ланцюга. Природні залишки підрозділяються на нижченаведені групи по загальних властивостях бічних ланцюгів:

(1) гідрофобні залишки: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

(2) нейтральні гідрофільні залишки: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

(3) кислотні залишки: Asp, Glu;

(4) основні залишки: His, Lys, Arg;

(5) залишки, які впливають на орієнтацію ланцюга: Gly, Pro; і

(6) ароматичні залишки: Trp, Tyr, Phe.

Не-консервативні заміни приводять до заміни члена одного із цих класів членом іншого класу.

Одним з репрезентативних варіантів заміни є заміна одного або декількох залишків гіперваріабельної області батьківського антитіла (наприклад, гуманізованого або людського антитіла). Загалом, отриманий(і) варіант(и), вибраний(ні) для подальшої розробки, будуть сприяти поліпшенню біологічних властивостей у порівнянні із властивостями батьківського антитіла, від якого вони походять. Стандартний спосіб генерування таких варіантів із замінами передбачає дозрівання афінності із застосуванням методу фагового представлення. Для цього, декілька сайтів гіперваріабельної області (наприклад, 6-7 сайтів) піддають мутації для генерування всіх можливих амінокислотних заміни у кожному сайті. Генеровані таким чином антитіла можуть бути представлені на частинках нитчатого фага у вигляді гібридів із продуктом гена III, упакованих у кожній частинці фага M13. Потім, варіанти, представлені на фазі, скринують на їхню біологічну активність (наприклад, афінність зв'язування), як описано в даній заявці. Для ідентифікації сайтів гіперваріабельної області, які є кандидатами на модифікацію, може бути здійснений аланін-скануючий мутагенез, що дозволяє ідентифікувати залишки гіперваріабельної області, що відіграють важливу роль у зв'язуванні з антигеном. Альтернативно або додатково, може виявитися корисним проаналізувати кристалічну структуру комплексу антиген-антитіло для ідентифікації контактних ділянок між антитілом і антигеном. Такі контактні залишки й сусідні залишки є кандидатами на замі-

ну, здійснювану відповідно до розроблених тут способів. Після генерування таких варіантів, панель цих варіантів піддають скринінгу, описаному в даній заявці, і антитіла, що виявляють чудові властивості в одному або декількох релевантних аналізах, можуть бути вибрані для подальшого дослідження.

Молекули нуклеїнової кислоти, що кодують варіанти амінокислотних послідовностей антитіла, одержують різними методами, відомими фахівцям. Такими методами є, але не обмежуються ними, виділення із природного джерела (у випадку природних варіантів амінокислотних послідовностей) або одержання за допомогою опосередкованого олігонуклеотидом (або сайт-направленого) мутагенезу, ПЛР-мутагенезу й кластерного мутагенезу раніше отриманого варіанта або немодифікованого варіанта антитіла.

Може виявитися бажаним введення однієї або декількох модифікацій амінокислот в Fc-області імунoglobulinових поліпептидів відповідно до винаходу з одержанням варіанта Fc-області. Варіант Fc-області може містити послідовність людської Fc-області (наприклад, людської Fc-області IgG1, IgG2, IgG3 або IgG4), що включає амінокислотну модифікацію (наприклад, заміну) в одному або декількох положеннях амінокислот, включаючи положення шарнірного цистеїну. Відповідно до даного опису й відомого рівня техніки, слід зазначити, що в деяких варіантах винаходу, антитіло, використовуване в способах відповідно до винаходу, може містити одну або декілька модифікацій, у порівнянні з аналогом антитіла дикого типу, наприклад, в Fc-області. Проте такі антитіла повинні, по суті, зберігати властивості його аналога дикого типу, необхідні для його терапевтичного застосування. Так, наприклад, вважається, що деякі модифікації можуть бути введені в Fc-область, що буде приводити до зміни (тобто до поліпшення або ослаблення) зв'язування з C1q і/або комплексно-залежної цитотоксичності (CDC), наприклад, як описано в WO 99/51642. Див., також Duncan & Winter Nature 322:738-40 (1988); патент США № 5648260; патент США № 5624821; і заявку WO 94/29351, у яких розглядаються інші приклади варіантів Fc-області. В WO 00/42072 (Presta) і WO 2004/056312 (Lowman) описані варіанти антитіл з підвищеним або зниженим рівнем зв'язування з FcRs. Зміст цих патентних публікацій конкретно вводиться в даний опис за допомогою посилання. Див., також Shields et al. J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001). Антитіла з більш тривалим часом напівжиття й з підвищеним рівнем зв'язування з Fc-рецептором, наявним у немовлят, (FcRn), що є відповідальним за передачу материнських IgG плоду (Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976) and Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)), описані в US 2005/0014934A1 (Hinton et al.). Такі антитіла включають Fc-область із однією або декількома описаними замінами, які підвищують рівень зв'язування Fc-області з FcRn. Поліпептидні варіанти з модифікованими амінокислотними послідовностями в Fc-області й з підвищеною або зниженою здатністю до зв'язування з C1q описані в патенті США № 6194551B і в WO 99/51642. Зміст цих патентних

публікацій конкретно вводиться в даний опис за допомогою посилання. Див. також Idusogie et al. J. Immunol. 164: 4178-4484-(2000).

#### Похідні антитіла

Антитіла відповідно до винаходу можуть бути додатково модифіковані так, щоб вони містили інші не-білкові молекули, які відомі фахівцям і є легко доступними. Переважними молекулами, що підходять для дериватизації антитіл, є водорозчинні полімери. Необмежуваними прикладами водорозчинних полімерів є поліетиленгліколь (ПЕГ), співполімери етиленгліколю/пропіленгліколю, карбоксиметилцелюлоза, декстран, полівініловий спирт, полівінілпіролідон, полі-1,3-діоксолан, полі-1,3,6-триоксан, співполімер етилену/малеїнового ангідриду, поліамінокислоти (гомополімери або статистичні співполімери) і декстран або полі(н-вінілпіролідон)поліетиленгліколю, гомополімери пропіленгліколю, співполімери поліпропіленоксиду/етиленоксиду, поліоксіетильовані поліолі (наприклад, гліцерин), полівініловий спирт і їх суміші. При промисловому виготовленні варто віддати перевагу пропіональдегіду поліетиленгліколю завдяки його стабільності у воді. Цей полімер може мати будь-яку молекулярну масу й може бути розгалуженим або нерозгалуженим. Число полімерів, що приєднуються до антитіла, може варіюватися, і якщо приєднують більше ніж один полімер, то ці полімери можуть мати однакові або різні молекули. Загалом, число і/або тип полімерів, використовуваних для дериватизації, можуть бути вибрані виходячи з декількох факторів, включаючи, але не обмежуючись ними, конкретні властивості або функції антитіла, які повинні бути поліпшені, незалежно від конкретних умов терапії, при яких буде використовуватися вказане похідне антитіла й т.п.

#### Скринінг антитіл з потрібними властивостями

Антитіла відповідно до винаходу можуть бути охарактеризовані по фізичних/хімічних властивостях і біологічних функціях за допомогою різних аналізів, відомих фахівцям. У деяких варіантах винаходу, антитіла характеризуються по будь-якій одній або декількох властивостях, таких як зв'язування з DLL4; і/або ослаблення або блокування активації рецептора Notch; і/або ослаблення або блокування молекулярного сигналу, переданого після передачі сигналу рецептора Notch, і/або порушення або блокування зв'язування рецептора Notch з DLL4; і/або стимуляція проліферації ендотеліальних клітин; і/або інгібування диференціювання ендотеліальних клітин; і/або інгібування артеріальної диференціації; і/або інгібування судинної перфузії пухлини; і/або лікування і/або попередження розвитку пухлини, клітинно-проліферативного розладу або раку; і/або лікування або попередження розладу, асоційованого з експресією і/або активністю DLL4; і/або лікування або попередження розладу, асоційованого з експресією і/або активністю рецептора Notch.

Очищені антитіла можуть бути також охарактеризовані за допомогою різних аналізів, включаючи, але не обмежуючись ними, N-кінцеве секвенування, аналіз амінокислот, ексклюзійна хроматографія в не-денатуруючих умовах, рідинна хроматографія високого тиску (PXBТ), мас-



спектрометрія, іонообмінна хроматографія й гідроліз папаїном.

У деяких варіантах винаходу, продукуювані тут антитіла аналізують на їхню біологічну активність. У деяких варіантах винаходу, антитіло відповідно до винаходу тестують на їх антигензв'язувальну активність. Аналізами на зв'язування з антигеном, які відомі фахівцям і можуть бути використані в даній заявці, є, але не обмежуються ними, будь-який з аналізів на пряме або конкурентне зв'язування, проведених такими методами, як вестерн-блот-аналізи, радіоімуноаналізи, ELISA (твердо-фазний імуоферментний аналіз), «сендвіч»-імуноаналізи, аналізи із застосуванням імуопреципітації, флуоресцентні імуноаналізи й імуноаналізи з використанням білка А. Репрезентативні аналізи на зв'язування з антигеном описані нижче в розділі «Приклади».

У ще одному своєму варіанті, даний винахід належить до моноклональних анти-DLL4-антитіл, які конкурують із антитілами 26.6, 26.14, 26.20, 26.34 і/або 26.82 за зв'язування з DLL4. Такими антитілами-конкурентами є антитіла, що розпізнають епітоп DLL4, який є аналогічним епітопу або перекривається з епітопом DLL4, який розпізнається антитілами 26.6, 26.14, 26.20, 26.34 і/або 26.82. Такі антитіла-конкуренти можуть бути отримані шляхом скринінгу супернатантів на анти-DLL4 гібридному по конкурентному зв'язуванню іммобілізованого DLL4 з міченими антитілами 26.6, 26.14, 26.20, 26.34 і/або 26.82. Супернатант гібридом, що містить антитіло-конкурент, буде сприяти зниженню кількості зв'язаного міченого антитіла, детектованого в розглянутій суміші для конкурентного зв'язування в порівнянні з кількістю зв'язаного міченого антитіла, детектованого в контрольній суміші для зв'язування, що містить іррелевантне антитіло (або взагалі не містить антитіла). Будь-який з описаних тут аналізів на конкурентне зв'язування є прийнятним для його застосування у вищеописаній процедурі.

В іншому своєму аспекті, даний винахід належить до моноклонального анти-DLL4-антитіла, що містить одну або декілька (наприклад, 2, 3, 4, 5 і/або 6) HVR антитіл 26.6, 26.14, 26.20, 26.34 і/або 26.82. Моноклональне анти-DLL4-антитіло, що містить одну або декілька HVR антитіл 26.6, 26.14, 26.20, 26.34 і/або 26.82, може бути сконструйоване шляхом приєднання однієї або декількох HVR антитіл 26.6, 26.14, 26.20, 26.34 і/або 26.82 до матричної послідовності антитіла, наприклад, до послідовності людського антитіла, що найбільше відповідає мишачій послідовності батьківського антитіла або консенсусній послідовності всіх людських антитіл у конкретній підгрупі легкого ланцюга або важкого ланцюга батьківського антитіла, і експресії отриманої(их) химерної(их) послідовності(ей) варіабельної області легкого і/або важкого ланцюга в присутності або за відсутності супутньої(их) послідовності(ей) константної області в рекомбінантних клітинах-хазяях, описаних у даній заявці.

Анти-DLL4-антитіла відповідно до винаходу, що мають унікальні властивості, описані в даній заявці, можуть бути отримані шляхом скринінгу

клонів анти-DLL4 гібридом на необхідні властивості будь-яким стандартним методом. Так, наприклад, якщо бажано використовувати моноклональне анти-DLL4-антитіло, що блокує або не блокує зв'язування рецепторів Notch з DLL4, то таке антитіло-кандидат може бути протестоване в аналізі на конкурентне зв'язування, такому як ELISA на конкурентне зв'язування, де ямки планшетів покривають DLL4, потім на ці покриті планшети наносять розчин антитіла в надлишковій кількості рецептора Notch, що представляє інтерес, і зв'язане антитіло піддають ферментативному детектуванню, наприклад, контактуванню зв'язаного антитіла із ПХ-кон'югованим анти-Ig-антитілом або біотинільованим анти-Ig-антитілом з розвитком колірної ПХ-реакції, наприклад, шляхом прояву планшетів з використанням стрептавідину-ПХ і/або перексиду водню, і детектування колірної ПХ-реакції за допомогою спектрофотометрії на 490 нм у планшет-рідері для ELISA.

В одному зі своїх варіантів, даний винахід належить до модифікованого антитіла, що має деякі, але не всі ефекторні функції, що робить його бажаним антитілом-кандидатом для застосування в різних цілях, де час напівжиття антитіла *in vivo* є важливим чинником, деякі ефекторні функції (такі як комплемент-залежна цитотоксичність і ADCC) не є необхідними або навіть є небажаними. У деяких варіантах винаходу вимірюють Fc-активності продукуюваного імуноглобуліну для гарантії збереження тільки потрібних властивостей. Аналізи на цитотоксичність *in vitro* і/або *in vivo* можуть бути проведені для підтвердження ослаблення/виснаження CDC- і/або ADCC-активностей. Так, наприклад, можуть бути проведені аналізи на зв'язування з Fc-рецептором (FcR) для гарантії того, що антитіло не буде зв'язуватися з FcγR (а отже, імовірно, не буде мати ADCC-активність), але буде зберігати свою здатність зв'язуватися з FcRn. Первинні клітини, опосередковуючі ADCC, тобто NK-клітини, експресують тільки FcγRIII, тоді як моноцити експресують FcγRI, FcγRII і FcγRIII. Дані, отримані для експресії FcR на гемопоетичних клітинах, систематизовані в таблиці 3 на сторінці 464 публікації Ravetch & Kinet *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991). Приклад *in vitro* аналізу для оцінки ADCC-активності молекули, що представляє інтерес, описаний у патентах США № 5821337 або 5821337. Ефекторними клітинами, що підходять для таких аналізів, є моноклеарні клітини периферичної крові (МКПК) і природні клітини-кілери (NK). Альтернативно або додатково, ADCC-активність молекули, яка представляє інтерес, може бути оцінена *in vivo*, наприклад, на моделі тварини, такій як модель, описана Clynes et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. A* 95:652-656 (1998). Для підтвердження того, що дане антитіло не має здатності зв'язуватися з C1q, отже не має CDC-активності, можуть бути також проведені аналізи на зв'язування з C1q. Для оцінки активації комплементу може бути проведений аналіз на CDC, наприклад, аналіз, описаний у публікації Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996). Визначення рівня зв'язування з FcRn і кліренсу/часу напівжиття *in vivo* може бути також здійснено методами,

відомими фахівцям, наприклад, описаними в розділі «Приклади».

Вектори, клітини-хазяї й рекомбінантні методи

Для рекомбінантного продукування антитіла відповідно до винаходу, нуклеїнову кислоту, що кодує таке антитіло, виділяють і вбудовують у реплікований вектор для наступного клонування (ампліфікації ДНК) або експресії. ДНК, що кодує антитіло, може бути легко виділена й секвенована відповідно до стандартних процедур (наприклад, з використанням олігонуклеотидних зондів, здатних специфічно зв'язуватися з генами, що кодують важкий й легкий ланцюги антитіла). Для цієї мети, прийнятними є багато векторів. Вибір вектора подекуди залежить від використовуваної клітини-хазяя. Звичайно, переважними клітинами-хазяями є або прокаріотичні клітини, або еукаріотичні клітини (звичайно, клітини ссавців). Слід зазначити, що для цієї мети можуть бути використані константні області будь-якого ізотипу, включаючи константні області IgG, IgM, IgA, IgD і IgE, і що такі константні області можуть бути отримані від людини або тварин будь-яких видів.

а. Генерування антитіл з використанням прокаріотичних клітин-хазяїв

i. Конструювання вектора

Полінуклеотидні послідовності, що кодують поліпептидні компоненти антитіла відповідно до винаходу, можуть бути отримані стандартними рекомбінантними методами. Необхідні полінуклеотидні послідовності можуть бути виділені й секвеновані з антитіло-продукуючих клітин, таких як гібридомні клітини. Альтернативно, полінуклеотиди можуть бути синтезовані за допомогою синтезатора нуклеотидів або ПЛР-методами. Після одержання послідовностей, що кодують поліпептиди, ці послідовності вбудовують у рекомбінантний вектор, здатний реплікуватися й експресувати гетерологічні полінуклеотиди в прокаріотичних хазяях. З метою даного винаходу можуть бути використані багато доступних і відомих векторів. Вибір відповідного вектора залежить, головним чином, від розміру нуклеїнових кислот, що вбудовуються в вказаний вектор, і від конкретної клітини-хазяя, що трансформується цим вектором. Кожний вектор містить різні компоненти, залежно від його функції (ампліфікації або експресії гетерологічного полінуклеотиду або того й іншого) і від його сумісності з конкретною клітиною-хазяєм, у якій він знаходиться. Компонентами векторів звичайно є, але не обмежуються ними, оріджин реплікації, селективний маркерний ген, промотор, сайт зв'язування з рибосомою (RBS), сигнальна послідовність, вставка гетерологічної нуклеїнової кислоти й послідовність термінації транскрипції.

В основному, плазмідні вектори, що містять реплікон і регуляторні послідовності, що походять від видів, сумісних із клітиною-хазяєм, використовуються разом із цими ж хазяїнами. Такий вектор звичайно містить сайт реплікації, також послідовності-маркери, що сприяють проведенню фенотипового відбору в трансформованих клітинах. Так, наприклад, *E.coli* звичайно трансформують плазмідною pBR322, що походить від *E.coli* певного виду. pBR322 містить гени, що кодують резистент-

ність до ампіциліну (Amp) і до тетрацикліну (Tet), і дозволяє легко ідентифікувати трансформовані клітини. pBR322 і її похідні або інші мікробні плазмиди або бактеріофаг можуть також містити промотори, які можуть бути використані цим мікробним організмом для експресії ендогенних білків, або вони можуть бути модифіковані так, щоб вони містили такі промотори. Приклади похідних pBR322, використовуваних для експресії конкретних антитіл, докладно описані в патенті США № 5648237, Carter et al.

Крім того, фагові вектори, що містять реплікон і регуляторні послідовності, сумісні з мікроорганізмом-хазяєм, можуть бути використані як трансформуючі вектори в комбінації із цими хазяїнами. Так, наприклад, бактеріофаг, такий як XGEM™-11, може бути використаний для одержання рекомбінантного вектора, що може бути застосований для трансформації сприйнятливих клітин-хазяїв, таких як *E.coli* LE392.

Експресійний вектор відповідно до винаходу може містити дві або більше пари промотор-цистрон, що кодують кожний з поліпептидних компонентів. Промотором є нетрансльована регуляторна послідовність, локалізована вище (з боку 5'-кінця) від цистрону, що модулює її експресію. Прокаріотичні промотори звичайно підрозділяються на два класи, індукцйбельні й конститутивні. Індукцйбельним промотором є промотор, що ініціює підвищення рівнів транскрипції цистрону, який знаходиться під його контролем, у відповідь на зміни умов культивування, наприклад, у присутності або за відсутності поживних елементів або при зміні температури.

Більшість промоторів, які розпізнаються різними потенційними клітинами-хазяями, добре відомі фахівцям. Вибраний промотор може бути функціонально приєднаний до цистронної ДНК, що кодує легкий або важкий ланцюг, шляхом виділення промотору із ДНК-джерела за допомогою її гідролізу рестрикуючими ферментами й вбудовування виділеної промоторної послідовності у вектор відповідно до винаходу. Нативна промоторна послідовність і багато які гетерологічні промотори можуть бути використані для прямої ампліфікації і/або експресії мішеней. У деяких варіантах винаходу використовуються гетерологічні промотори, оскільки, вони, у порівнянні з нативним промотором для потрібних поліпептидів, дозволяють значно підвищувати рівень транскрипції й збільшувати виходи експресованого гену-мішені.

Промоторами, що підходять для використання в прокаріотичних хазяях, є промотор *PhoA*, промоторні системи  $\beta$ -галактамази й лактози, промоторна система триптофану (*trp*) і гібридні промотори, такі як промотор *tac* або *trc*. Однак, можуть бути також використані й інші промотори, які є функціональними в бактеріях (наприклад, інші відомі бактеріальні або фагові промотори). Нуклеотидні послідовності цих промоторів були опубліковані, що полегшує фахівцям у даній галузі проводити їх функціональне лігування із цистронами, що кодують потрібні легкі й важкі ланцюги (Siebenlist et al. (1980) *Cell* 20:269), з використанням лінкерів або

адаптерів для доставки всіх необхідних рестрикційних сайтів.

В одному з аспектів винаходу, кожний цистрон у рекомбінантному векторі містить такий компонент, як секреторна сигнальна послідовність, що регулює транслокацію експресованих поліпептидів через мембрану. В загальних рисах, вказаною сигнальною послідовністю може бути компонент вектора, або такою послідовністю може бути частина потрібного ДНК-поліпептиду, що вбудовується в цей вектор. Сигнальною послідовністю, вибраною з метою здійснення винаходу, повинна бути послідовність, яка розпізнається й процесується (тобто відщеплюється сигнальною пептидазою) клітиною-хазяєм. У випадку використання прокаріотичних клітин-хазяїв, що не розпізнають і не процесують сигнальні послідовності, які є нативними для гетерологічних поліпептидів, цю сигнальну послідовність замінюють прокаріотичною сигнальною послідовністю, вибраною, наприклад, із групи, яка складається з лідерної послідовності лужної фосфатази, пеніцилінази, Ipp або термостабільного ентеротоксину II (STII), LamB, PhoE, PelB, OmpA і MBP. В одному з варіантів винаходу, сигнальними послідовностями, використовуваними в обох цистронах експресійної системи, є сигнальні послідовності STII або їхні варіанти.

В іншому аспекті винаходу, продукування імуноглобулінів відповідно до винаходу може відбуватися в цитоплазмі клітини-хазяя, тому в цьому випадку не потрібно присутності секретуючих сигнальних послідовностей у кожному цистроні. Відповідно до цього, легкі й важкі ланцюги імуноглобуліну експресуються й піддаються укладанню й зборці з утворенням функціональних імуноглобулінів у цитоплазмі. Деякі штами хазяїв (наприклад, trxB<sup>-</sup>-штами *E.coli*) мають відповідні умови в цитоплазмі, які сприяють утворенню дисульфідних зв'язків, і тим самим, сприяють правильному укладанню й зборці субодиниць експресованого білка. Proba & Pluckthun, Gene, 159:203 (1995).

Прокаріотичними клітинами-хазяями, що підходять для експресії антитіл відповідно до винаходу, є архебактерії (*Archaeobacteria*) і еубактерії (*Eubacteria*), такі як грам-негативні або грам-позитивні мікроорганізми. Прикладами прийнятних бактерій є *Escherichia* (наприклад, *E.coli*), *Bacilli* (наприклад, *B.subtilis*), ентеробактерії, бактерії виду *Pseudomonas* (наприклад, *P.aeruginosa*), *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescans*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Shigella*, *Rhizobia*, *Vitreoscilla* або *Paracoccus*. В одному з варіантів винаходу використовуються грам-негативні клітини. В одному з варіантів винаходу, як хазяїв відповідно до винаходу використовуються клітини *E.coli*. Прикладами штамів *E.coli* є штам W3110 (Bachmann, Cellular & Molecular Biology, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), pp.1190-1219; ATCC, номер депозиту № 27325) і їхні похідні, включаючи штам 33D3, що має генотип W3110 ΔfhuA (ΔtonA) ptr3 laq laq lacL8 ΔompTΔ(nmpc-ferE)degP41 kanR (патент США № 5639635). Прийнятними також є й інші штами і їхні похідні, такі як *E.coli* 294 (ATCC 31446), *E.coli* B, *E.coli* 1776 (ATCC 31537) і *E.coli* RV308 (ATCC

31608). Ці приклади є ілюстративними, але не обмежувальними. Методи конструювання похідних будь-якої з вищезгаданих бактерій, що мають певні генотипи, відомі фахівцям і описані, наприклад, у публікації Bass et al., Proteins 8:309-314 (1990). Звичайно, відповідні бактерії необхідно відбирати з врахуванням реплікованості реплікону в клітинах бактерії. Так, наприклад, бактерії *E.coli*, *Serratia* або *Salmonella* можуть бути прийнятними для їхнього використання як хазяя, якщо для доставки реплікону використовуються добре відомі плазміди, такі як pBR322, pBR325, pACYC177 або pKN410. Звичайно клітини-хазяї повинні секретувати мінімальні кількості протеолітичних ферментів, тому в клітинну культуру бажано включати додаткові інгібітори протеази.

#### ii. Продукування антитіл

Клітини-хазяї трансформують вищевказаними експресійними векторами й культивують у стандартному поживному середовищі, модифікованому так, щоб воно було прийнятним для індукування промоторів, відбору трансформантів або ампліфікації генів, що кодують потрібні послідовності.

Термін "трансформація" означає введення ДНК в прокаріотичного хазяя так, щоб ця ДНК або реплікуватися у вигляді позахромосомного елемента, або інтегрувалася в хромосому. Залежно від використовуваної клітини-хазяя, трансформацію здійснюють стандартними методами, що підходять для таких клітин. Бактеріальні клітини, що містять міцні бар'єри, такі клітинні стінки, звичайно обробляють кальцієм, саме хлоридом кальцію. В іншому методі трансформації використовують поліетилеңгліколь/ДМСО. Ще одним методом трансформації є електропорація.

Прокаріотичні клітини, використовувані для продукування поліпептидів відповідно до винаходу, культивують у середовищі, відомому фахівцям і прийнятному для культивування вибраних клітин-хазяїв. Прикладами прийнятного середовища є бульйон Лурія (LB) з необхідними поживними добавками. У деяких варіантах винаходу, таке середовище також містить засіб для відбору, вибраний виходячи з конструювання експресійного вектора, яке сприяє селективному росту прокаріотичних клітин, що містять експресійний вектор. Так, наприклад, у середовищі для культивування клітин, експресуючих ген резистентності до ампіциліну, додають ампіцилін.

Крім джерел вуглецю, азоту й неорганічного фосфату, у середовище можуть бути також включені будь-які необхідні добавки у відповідних концентраціях, що вводяться як окремо, так і в суміші з іншими добавками або середовищем, такими як комплексне джерело азоту. Культуральне середовище може, але необов'язково, містити один або декілька відновників, вибраних із групи, яка складається із глутатіону, цистеїну, цистаміну, тіогліколю, дитіоеритритолу й дитіотреїтолу.

Прокаріотичні клітини-хазяї культивують при відповідних температурах. Для культивування *E.coli*, переважною температурою є, наприклад, температура приблизно від 20°C до 39°C, більш переважно, приблизно від 25°C до 37°C, ще більш переважно, приблизно при 30°C. pH середовища

може варіюватися в межах приблизно від 5 до 9, у залежності, головним чином, від організму хазяя. Для *E.coli*, рН становить, переважно, приблизно від 6,8 до 7,4, більш переважно, приблизно 7,0.

Якщо в експресійному векторі відповідно до винаходу використовується індукцибельний промотор, то експресія білка індукується в умовах, що підходять для активації даного промотору. В одному з аспектів винаходу, для регуляції транскрипції поліпептидів використовуються промотори *PhoA*. Відповідно до цього, трансформовані клітини-хазяї культивують у середовищі для індукування з обмеженим вмістом фосфату. Переважним середовищем з обмеженим вмістом фосфату є середовище *C.R.A.P.* (див, наприклад, Simmons et al., *J. Immunol. Methods* (2002) 263:133-147). У комбінації з використовуваною векторною конструкцією можуть бути використані й різні інші індуктори, відомі фахівцям.

В одному з варіантів винаходу, експресовані поліпептиди відповідно до винаходу секретуються в периплазму клітин-хазяїв і можуть бути виділені із цієї периплазми. Виділення білка, головним чином, здійснюють шляхом дизрупції мікроорганізму, звичайно такими методами, як осмотичний шок, обробка ультразвуком або лізис. Після дизрупції клітин, клітинний дебрис або цілі клітини можуть бути видалені шляхом центрифугування або фільтрації. Ці білки можуть бути додатково очищені, наприклад, за допомогою хроматографії на афінній смолі. Альтернативно, білки можуть транспортуватися в клітинне середовище й відділятися від нього. Клітини можуть бути видалені з культури, супернатант культури може бути підданий фільтрації й концентруванню для додаткового очищення отриманих білків. Експресовані поліпептиди можуть бути потім виділені й ідентифіковані добре відомими методами, такими як електрофорез у поліакриламідному гелі (ПААГ) і Вестерн-блот-аналіз.

В одному з аспектів винаходу, антитіла продукують у великій кількості за допомогою ферментації. Для одержання рекомбінантних білків можуть бути проведені різні великомасштабні процедури ферментації в культурі з підживленням. Великомасштабну ферментацію проводять у ферментері ємністю щонайменше 1000 літрів, переважно, приблизно від 1000 до 100000 літрів. Такі ферментери оснащені лопатевою мішалкою для рівномірного розподілу кисню й мікроелементів, зокрема, глюкози (переважного джерела вуглецю/енергії). Термін "лабораторна ферментація", загалом, означає ферментацію у ферментері об'ємом не більше ніж приблизно 100 літрів, і такий об'єм може варіюватися приблизно від 1 літра до 100 літрів.

У процесі ферментації, індукування експресії білків звичайно ініціюють після того як клітини, культивовані в прийнятних умовах, досягнуть потрібної густини, наприклад,  $OD_{550}$ , що становить приблизно 180-220, тобто ранньої стаціонарної фази. У комбінації з використовуваною векторною конструкцією можуть бути використані й різні інші індуктори, відомі фахівцям і описані вище. Перед індукуванням, клітини можуть бути культивовані протягом меншого періоду часу. Клітини звичайно

індукують протягом приблизно 12-50 годин, хоча час індукування може бути збільшений або зменшений.

Для збільшення виходу продукту й для поліпшення якості поліпептидів відповідно до винаходу можуть бути змінені різні умови ферментації. Так, наприклад, для забезпечення "правильної" зборки й укладання секретованих поліпептидів антитіл можуть бути використані додаткові вектори, у яких відбувається надекспресія білків-шаперонів, таких як білки *Dsb* (*DsbA*, *DsbB*, *DsbC*, *DsbD* і/або *DsbG*) або *FkpA* (пептидилпроліл- цис, транс-ізомераза із шаперонною активністю), і які призначені для ко-трансформації прокаріотичних клітин-хазяїв. Було продемонстровано, що білки-шаперони полегшують правильне укладання й розчинність гетерологічних білків, продукованих у бактеріальних клітинах-хазяях. Chen et al. (1999) *J. Bio. Chem.* 274:19601-19605; Georgiou et al., патент США № 6083715; Georgiou et al., патент США № 6027888; Bothmann & Pluckthun (2000) *J. Biol. Chem.* 275:17100-17105; Ramm & Pluckthun (2000) *J. Biol. Chem.* 275:17106-17113; Arie et al. (2001) *Mol. Microbiol* 39:199-210.

Для мінімізації протеолізу експресованих гетерологічних білків (а зокрема, білків, які є протеолітично чутливими), у даному винаході можуть бути використані деякі штами-хазяї, дефіцитні по протеолітичних ферментах. Так, наприклад, штами клітин-хазяїв можуть бути модифіковані для введення генетичної(их) мутації(й) у гени, що кодуєть відомі бактеріальні протеази, такі як протеаза III, *OmpT*, *DegP*, *Tsp*, протеаза I, протеаза *Mi*, протеаза V, протеаза VI і їх комбінації. Деякі дефіцитні по протеазі штами *E.coli* є доступними й описані, наприклад, у публікації Joly et al. (1998), див. вище; Georgiou et al., патент США № 5264365; Georgiou et al., патент США № 5508192; Hara et al., *Microbial Drug Resistance*, 2:63-72 (1996).

В одному з варіантів винаходу, штами *E.coli*, дефіцитні по протеолітичних ферментах і трансформовані плазмідами, надекспресуючими один або декілька білків-іпаперонів, використовуються як клітини-хазяї в експресійній системі відповідно до винаходу.

### iii. Очищення антитіл

Можуть бути застосовані стандартні методи очищення білків, відомі фахівцям. Прикладами прийнятних методів очищення є наступні процедури очищення: фракціонування на імуноафінних або іонообмінних колонках, преципітація етанолом, зворотно-фазова ВЕРХ, хроматографія на двоокисі кремнію або на катіонообмінній смолі, такий як DEAE, хроматофокусування, електрофорез у ДСН-ПААГ, преципітація сульфатом амонію й гель-фільтрація з використанням, наприклад, сефадексу G-75.

В одному з аспектів винаходу, для імуноафінного очищення повнорозмірних продуктів антитіл відповідно до винаходу використовують білок А, іммобілізований на твердій фазі. Білок А являє собою 41 кД-білок клітинної стінки, яка походить від *Staphylococcus aureus*, який з високою афінністю зв'язується з Fc-областю антитіл. Lindmark et al. (1983), *J. Immunol. Meth.* 62:1-13. Твердою фазою,

на якій іммобілізований білок А, є переважно, колорнка, що має скляну поверхню або кремнієвмісну поверхню, більш переважно, скляна колонка з регульованим розміром пор або колонка з нанесеною на неї кремнієвою кислотою. У деяких варіантах, вказана колонка покрита реагентом, таким як гліцерин, для запобігання неспецифічного приєднання домішок.

У першій стадії очищення, препарат, отриманий із клітинної культури, описаної вище, наносять на тверду фазу з іммобілізованим на ній білком А для специфічного зв'язування антитіла, що представляє інтерес, з білком А. Потім тверду фазу промивають для видалення домішок, неспецифічно пов'язаних із твердою фазою. І нарешті антитіло, що представляє інтерес, відділяють від твердої фази шляхом елюювання.

б. Продуктування антитіл з використанням еукаріотичних клітин-хазяїв

Компонентами векторів звичайно є, але не обмежуються ними, один або декілька з наступних компонентів: сигнальна послідовність, оріджин реплікації, один або декілька маркерних генів, енхансерний елемент, промотор і послідовність термінації транскрипції.

(i) Компонент сигнальна послідовність

Вектор, використовуваний в еукаріотичних клітинах-хазяях, може також містити сигнальну послідовність або інший поліпептид, що має специфічний сайт розщеплення біля N-кінця зрілого білка, або поліпептид, що представляє інтерес. Вибраною гетерологічною сигнальною послідовністю, переважно, є послідовність, що розпізнається й процесується (тобто відщеплюється сигнальною пептидазою) клітиною-хазяєм. Для експресії в клітинах ссавців використовуються сигнальні послідовності ссавців, також вірусні секреторні лідерні послідовності, наприклад, сигнальна послідовність gD вірусу простого герпеса.

ДНК для такої області попередника лігують з антитіло-кодуючої ДНК зі збереженням рамки читання.

(ii) Оріджин реплікації

Звичайно, такий компонент як оріджин реплікації не є необхідним для експресійних векторів ссавців. Так, наприклад, оріджин реплікації SV40 звичайно використовується тільки тому, що він містить ранній промотор.

(iii) Компонент селективний ген

Експресійний і клонууючий вектори можуть містити селективний ген, який також називається селективним маркером. Звичайно, селективні гени кодують білки, які (а) надають резистентності до антибіотиків або до інших токсинів, наприклад, до ампіциліну, неоміцину, метотрексату або тетрацикліну, (б) компенсують дефіцит, зумовлений ауксотрофією, якщо це необхідно, або (с) забезпечують доставку важливих поживних речовин, які не надходять із комплексних середовищ.

Одним із прикладів схеми відбору є використання лікарського засобу, що припиняє ріст клітини-хазяя. Клітини, які були успішно трансформовані гетерологічним геном, продукують білок, який надає резистентності до лікарського засобу, і, тим самим, сприятливого виживання цих клітин у селе-

ктивному середовищі. Для такого домінантного відбору можуть бути використані лікарські засоби, такі як неоміцин, мікофенолова кислота й гігromіцин.

Іншими прикладами прийнятних селективних маркерів для клітин ссавців є маркери, які дозволяють ідентифікувати клітини, здатні вбудовувати у свій геном антитіло-кодуючу нуклеїнову кислоту, наприклад, такі маркери, як ген DHFR, тимідинкінази, металотіонеїну-I і II, переважно, гени, що кодують металотіонеїн приматів, ген аденозиндезамінази, орнітин-декарбоксилази й т.п.

Так, наприклад, клітини, трансформовані селективним геном DHFR, спочатку ідентифікують шляхом культивування всіх трансформантів у культуральному середовищі, що містить метотрексат (Mtx), конкурентний антагоніст DHFR. Якщо використовується DHFR дикого типу, то прийнятною клітиною-хазяєм є клітинна лінія яєчника китайського хом'ячка (CHO), дефіцитна по DHFR-активності (наприклад, ATCC CRL-9069).

Альтернативно, клітини-хазяї (зокрема, хазяї дикого типу, що містять ендogenous DHFR), трансформовані або ко-трансформовані ДНК-послідовностями, що кодують антитіло, білок DHFR дикого типу й інший селективний маркер, такий як аміноглікозид-3'-фосфотрансфераза (APH), можуть бути відібрані шляхом культивування клітин у середовищі, що містить агент для відбору по селективному маркеру, такий як аміноглікозидний антибіотик, наприклад, канаміцин, неоміцин або G418. Див. патент США № 4965199.

(iv) Компонент промотор

Експресійні й клонууючі вектори звичайно містять промотор, розпізнаваний організмом-хазяєм і функціонально приєднаний до нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид антитіла. Промоторні послідовності, що підходять для еукаріотів, відомі фахівцям. Фактично, всі гени еукаріотів мають АТ-багату область, локалізовану приблизно в області, розташованій на 25-30 нуклеотидів вище від сайту ініціації транскрипції. Іншою такою послідовністю, локалізованою приблизно в області, розташованою на 70-80 нуклеотидів вище від сайту ініціації транскрипції багатьох генів, є область CNCAAT, де N може означати будь-який нуклеотид (SEQ ID NO:60). Біля 3'-кінця більшості еукаріотичних генів розташована послідовність AATAAA, що може служити сигналом для приєднання poly A-хвоста до 3'-кінця кодуючої послідовності (SEQ ID NO:61). Всі вказані послідовності можуть бути відповідним чином вбудовані в еукаріотичні експресійні вектори.

Транскрипція поліпептидів антитіл з векторів, які присутні у клітинах-хазяях ссавців, регулюється, наприклад, промоторами, отриманими з геномів таких вірусів, як поліомавірус, вірус віспи домашнього птиці, аденовірус (такий як аденовірус 2), вірус коров'ячої папіломи, вірус саркоми птахів, цитомегаловірус, ретровірус, вірус гепатиту В і мавпячий вірус 40 (SV40); гетерологічними промоторами ссавців, наприклад, промотором актину або промотором імуноглобуліну; і промоторами білків теплового шоку, за умови, що такі промотори є сумісними із системами клітин-хазяїв.

Ранні й пізні промотори вірусу SV40 звичайно одержують у вигляді рестрикційного фрагмента SV40, що також містить оріджин реплікації вірусу SV40. Передранній промотор людського цитомегаловірусу звичайно одержують у вигляді рестрикційного HindIII-фрагмента E. Система експресії ДНК у клітинах-хазяях ссавців, отримана на основі коров'ячого папіломавірусу, використовуваного як вектор, описана в патенті США № 4419446. Модифікація цієї системи описана в патенті США № 4601978. Альтернативно, як промотор може бути використаний вірус саркоми Рауса, що має довгий кінцевий повтор.

(v) Компонент енхансерний елемент

Транскрипція ДНК, що кодує поліпептид антитіла відповідно до винаходу у вищих еукаріотах, часто підсилюється при вбудовуванні у вектор енхансерної послідовності. У цей час відомо багато енхансерних послідовностей, що походять від генів ссавців (генів глобіну, еластази, альбуміну,  $\alpha$ -фетопротеїну й інсуліну). Однак, звичайно використовується енхансер від вірусу еукаріотичної клітини. Прикладами є енхансер вірусу SV40, локалізований у пізній області оріджину реплікації (100-270 п.н.), енхансер раннього промотору цитомегаловірусу, енхансер поліомавірусу, локалізований у пізній області оріджину реплікації, і енхансери адновірусу. Див. також публікацію Yaniv, Nature 297:17-18 (1982), у якій описані енхансерні елементи для активації еукаріотичних промоторів. Енхансер може бути вбудований у вектор в 5'- або 3'-положенні по відношенню до послідовності, що кодує поліпептид антитіла, але, переважно, щоб він був локалізований в 5'-положенні від промотору.

(vi) Компонент сайт термінації транскрипції

Експресійні вектори, використовувані в еукаріотичних клітинах-хазяях, звичайно також містять послідовності, необхідні для термінації транскрипції й для стабілізації мРНК. Такі послідовності звичайно розташовані з боку 5'-кінця, іноді, з боку 3'-кінця від нетрансльованих областей еукаріотичних або вірусних ДНК або кДНК. Ці області містять нуклеотидні сегменти, транскрибовані у вигляді поліаденільованих фрагментів у нетрансльованій частині мРНК, що кодує антитіло. Як такий компонент, як сайт термінації транскрипції може бути використана область поліаденілювання коров'ячого гормону росту. Див. заявку WO 94/11026 і наявний там опис експресійних векторів.

(vii) Відбір і трансформація клітин-хазяїв

Клітинами-хазяями, що підходять для клонування або експресії ДНК у вищеописаних векторах, є описані тут клітини вищих еукаріотів, включаючи клітини-хазяї хребетних. Розмноження клітин хребетних у культурі (у тканинній культурі) уже стало рутинною процедурою. Прикладами прийнятних ліній клітин-хазяїв ссавців є клітинна лінія CV1 нирок мавпи, трансформована SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); клітинна лінія нирок людського ембріона (клітини 293 або клітини 293, субклоновані для росту в суспензійній культурі, Graham et al., J. Gen. Virol. 36:59 (1977)); клітини нирок дитинчати хом'ячка (ВНК, ATCC CCL 10); клітини яєчника китайського хом'ячка/DHFR (CHO,

Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); мишачі клітини Сертолі (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); клітини нирок мавпи (CV1 ATCC CCL 70); клітини нирок африканської зеленої мавпи (VERO-76, ATCC CRL-1587); клітини карциноми шийки матки людини (HELA, ATCC CCL 2); клітини нирок собак (MDCK, ATCC CCL 34); клітини печінки лабораторного щура Buffalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); клітини легенів людини (W138, ATCC CCL 75); клітини печінки людини (HepG2, HB 8065); пухлинні клітини мишачої молочної залози (MMT 060562, ATCC CCL51); клітини TRI (Mather et al., Annal N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)); клітини MRC5; клітини FS4 і клітинна лінія людської гепатоми (Hep G2).

Клітини-хазяї трансформують вищеописаними експресійними або клонуючими векторами для продукування антитіла й культивують у прийнятних поживних середовищах, модифікованих, якщо це необхідно, для індукування промоторів, відбору трансформантів або ампліфікації генів, що кодуєть потрібні послідовності.

(viii) Культивування клітин-хазяїв

Клітини-хазяї, використовувані для продукування антитіла відповідно до винаходу, можуть бути культивовані в різних середовищах. Середовищами, що підходять для культивування клітин-хазяїв, є комерційно доступні середовища, такі як середовище Хемса F10 (Sigma), мінімальне підтримуюче середовище ((MEM)(Sigma), RPMI-1640 (Sigma) і модифіковане по способу Дульбекко середовище Ігла (DMEM), Sigma). Крім того, як культуральне середовище для культивування клітин-хазяїв може бути використане будь-яке середовище, описане в публікації Ham et al., Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes et al., Anal. Biochem. 102:255 (1980), у патентах США №№ 4767704, 4657866, 4927762, 4560655 або 5122469; в WO 90103430; в WO 87/00195 або в патенті США Re. № 30985. У будь-яке із цих середовищ можуть бути додані, якщо це необхідно, гормони і/або інші фактори росту (такі як інсулін, трансферин або епідермальний фактор росту), солі (такі як хлорид натрію, і фосфат кальцію й магнію), буфери (такі як HEPES), нуклеотиди (такі як аднозин і тимідин), антибіотики (такі як лікарський засіб гентаміцин™), мікроелементи (визначені як неорганічні сполуки, звичайно присутні у кінцевих концентраціях у мікромолярних дозах) і глюкоза або еквівалентне джерело енергії. Можуть бути також включені будь-які інші необхідні добавки у відповідних концентраціях, відомих фахівцям у даній галузі. Умови культивування, такі як температура, pH і т.п., аналогічні умовам, раніше використовуваним для експресії вибраних клітин-хазяїв, і відомі середньому фахівцеві в даній галузі.

(ix) Очищення антитіла

З застосуванням техніки рекомбінантних ДНК, антитіло може бути продуковане усередині клітин, або воно може бути безпосередньо секретоване в середовище. Якщо в першій стадії антитіло продукується усередині клітин, то потім, клітинний дебрис або клітини-хазяї або їх лізовані фрагменти видаляють, наприклад, шляхом центрифугування або ультрафільтрації. Якщо антитіло секретується

в середовище, то, звичайно, спочатку концентрують супернатанти, отримані з таких експресійних систем, з використанням комерційно доступного фільтра для концентрування білків, наприклад, пристрою для ультрафільтрації Amicon або Millipore Pellicon®. Для інгібування протеолізу, у будь-якій з попередніх стадій може бути використаний інгібітор протеази, такий як PMSF, для попередження розмноження випадково внесених домішкових мікроорганізмів можуть бути використані антибіотики.

Композиція антитіла, отримана із клітин, може бути очищена, наприклад, за допомогою хроматографії на гідроксіапатитах, гель-електрофорезу, діалізу й афінної хроматографії, при цьому, переважним методом очищення є афінна хроматографія. Придатність білка А як афінного ліганду залежить від виду й ізотипу будь-якого Fc-домена імунoglobуліну, який присутній у даному антитілі. Білок А може бути використаний для очищення антитіла, що містять важкі ланцюги  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$  або  $\gamma 4$  людського імунoglobуліну (Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983)). Для всіх мишачих ізотипів і для людського ланцюга  $\gamma 3$  рекомендується G-білок (Guss et al., EMBO J. 5:1567-1575 (1986)). Як матриця, з якою зв'язується афінний ліганд, найбільш часто використовується агароза, але можуть бути використані й інші матриці. Однак, механічно стабільні матриці, такі як скло з регульованим розміром пор або полі(стиролдивініл)бензол, забезпечують більш високу швидкість потоку й дозволяють скоротити час обробки, чим це може бути досягнуто з використанням агарози. Якщо антитіло містить домен  $C_{H3}$ , то для його очищення може бути використана смола Bakerbond ABX™ (J.T. Baker, Phillipsburg, N.J.). Залежно від антитіла, яке виділяється, можуть бути також застосовані й інші методи очищення білка, такі як фракціонування на іонообмінній колонці, преципітація етанолом, зворотнфазова ВЕРХ, хроматографія на двоокисі кремнію, хроматографія на гепарин-сефарозі™, хроматографія на аніоно- або катіонообмінній смолі (наприклад, на колонці з поліаспарагіновою кислотою), хроматофокусування, електрофорез у ДСН-ПААГ і преципітація сульфатом амонію.

Після проведення будь-якої(их) попередньої(их) стадії(й) очищення, суміш, що містить антитіло, яке представляє інтерес, і домішки, може бути піддана гідрофобній хроматографії при низькому рН із використанням елююючого буфера при рН приблизно 2,5-4,5, переважно, при низькій концентрації солі (наприклад, приблизно 0-0,25M).

#### Імунокон'югати

Даний винахід також належить до імунокон'югатів (які є синонімами термінів «кон'югати антитіло-лікарський засіб» або «ADC»), що включає будь-які з описаних тут анти-DLL4-антитіл, кон'югованих із цитотоксичним агентом, таким як хіміотерапевтичний засіб, лікарський засіб, рістінгібуючий агент, токсин (наприклад, ферментативно активний токсин бактеріального, грибового, рослинного або тваринного походження або його фрагменти) або радіоактивний ізотоп (тобто радіоактивний кон'югат).

Використання кон'югатів "антитіло - лікарський засіб" з метою місцевої доставки цитотоксичних або цитостатичних агентів, тобто лікарських засобів для знищення або придушення пухлинних клітин при лікуванні раку (Syrgos & Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19:605-614; Niculescu-Duvaz & Springer (1997) *Adv. Drg. Del. Rev.* 26:151-172; патент США № 4975278), теоретично дозволяє здійснювати спрямовану доставку лікарського засобу в пухлини й забезпечувати його акумуляцію усередині клітин, тоді як системне введення цих некон'югованих лікарських засобів може приводити до продукування рівнів токсичності, які є неприйнятними для нормальних клітин, також недостатніми для пухлинних клітин, які необхідно знищити (Baldwin et al., 1986, *Lancet* pp. (Mar. 15, 1986):603-05; Thorpe, 1985, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review" in *Monoclonal Antibodies 84:Biological And Clinical Applications*, A. Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506). Таким чином, бажано, щоб максимальна ефективність поєднувалася з мінімальною токсичністю. Повідомлялося, що в цих стратегіях можуть бути використані як поліклональні, так і моноклональні антитіла (Rowland et al., 1986, *Cancer Immunol. Immunother.* 21:183-87). Лікарськими засобами, використовуваними в цих способах, є дауноміцин, доксорубіцин, метотрексат і віндезин (Rowland et al., (1986), див. вище). Токсинами, використовуваними в кон'югатах "антитіло - токсин", є бактеріальні токсини, такі як дифтерійний токсин, рослинні токсини, такі як рицин, і невеликі молекули-токсини, такі як гелданамицин (Mandler et al., (2000) *Jour of the Nat. Cancer Inst.* 92(19): 1573-1581; Mandler et al., (2000) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10:1025-1028; Mandler et al., (2002) *Bioconjugate Chem.* 13:786-791), майтанзиноїди (EP 1391213; Liu et al., (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623) і каліхеаміцин (Lode et al. (1998) *Cancer Res.* 58:2928; Hinman et al. (1993) *Cancer Res.* 53:3336-3342). Токсини можуть робити свою цитотоксичну й цитостатичну дію відповідно до механізмів, що включають зв'язування з тубуліном, зв'язування із ДНК або інгібування топоізомерази. Деякі цитотоксичні лікарські засоби, при їх кон'югуванні з крупними антитілами або лігандами рецепторів білків, мають тенденцію до втрати активності або зменшення активності.

Зезалік (Zevalin®) (ібритумомаб тіуксетан, Biogen/Idec) являє собою кон'югат "антитіло - радіоізотоп", що складається з мишачого моноклонального антитіла IgG1-каппа, спрямованого проти антигену CD20, присутнього на поверхні нормальних і злоякісних В-лімфоцитів, і радіоактивних ізоотопів  $^{111}\text{In}$  або  $^{90}\text{Y}$ , зв'язаних з хелатоутворюючим комплексом "тіосечовина-лінкер" (Wiseman et al. (2000) *Eur. Jour. Nucl. Med.* 27(7):766-77; Wiseman et al. (2002) *Blood* 99(12):4336-42; Witzig et al. (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(10):2453-63; Witzig et al. (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(15):3262-69). Хоча зезалін має активність проти В-клітинної неходжкінської лімфоми (НХЛ), однак, його введення приводить до тяжкої і хронічної цитопенії в більшості пацієнтів. В 2000 році був отриманий дозвіл на застосування препарату мілотарг (Mylotarg™) (гемтузумаб

озогаміцин, Wyeth Pharmaceuticals), тобто кон'югату "антитіло - лікарський засіб", що складається з антитіла проти людського CD33, зв'язаного з каліхеаміцином, для лікування гострого мієлоїдного лейкозу шляхом ін'єкції вказаного препарату (Drugs of the Future (2000) 25(7):686; патенти США №№ 4970198; 5079233; 5585089; 5606040; 5693762; 5739116; 5767285; 5773001). Кантузумаб мертанзин (Immunogen, Inc.), кон'югат "антитіло - лікарський засіб", що складається з антитіла проти людського CD42, зв'язаного за допомогою дисульфідного лінкера SPP із майтанзиноїдним лікарським засобом, DM1, був використаний у випробуваннях фази II для лікування ракових пухлин, експресуючих CanAg, таких як ракові пухлини товстої кишки, підшлункової залози, шлунка й т.п. MLN-2704 (Millenium Pharm., BZL Biologies, Immunogen Inc.), кон'югат "антитіло - лікарський засіб", що складається з моноклонального антитіла проти мембранозв'язаного антигену передміхурової залози (PSMA), приєднаного до майтанзиноїдного лікарського засобу, DM1, знаходиться в стадії дослідження його можливого застосування для лікування пухлин передміхурової залози. Ауристатинові пептиди, ауристатин E (AE) і монометилауристатин (MMAE), синтетичні аналоги доластатину, були кон'юговані з химерними моноклональними антитілами cBR96 (специфічними до антигену Lewis Y на карциномах) і cAC10 (специфічним до CD30 на гематологічних злоякісних пухлинах) (Doronina et al (2003) Nature Biotechnology 21(7):778-784) і знаходяться у стадії розробки терапевтичних засобів.

Хіміотерапевтичні засоби, використовувані для одержання імункон'югатів, описані в даній заявці (наприклад, вище). Ферментативно активними токсинами і їхніми фрагментами, які можуть бути використані для цих цілей, є А-ланцюг дифтерійного токсину, активні фрагменти дифтерійного токсину, які не зв'язуються, А-ланцюг екзотоксину (від *Pseudomonas aeruginosa*), А-ланцюг рицину, А-ланцюг абрину, А-ланцюг модецину, альфа-сарцин, білки *Aleurites fordii*, білка діантину, білки *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII і PAP-S), інгібітор *Momordica charantia*, курцин, кротин, інгібітор *Sapaonaria officinalis*, гелонін, мітогелін, рестриктоцин, феноміцин, еноміцин і трикотецени. Див., наприклад, заявку WO 93/21232, опубліковану 28 жовтня, 1993. Для продукування радіоактивно кон'югованих антитіл можуть бути використані різні радіонукліди. Прикладами таких радіонуклідів є  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{131}\text{In}$ ,  $^{90}\text{Y}$  і  $^{186}\text{Re}$ . Кон'югати антитіла й цитотоксичного лікарського засобу одержують із використанням різних біфункціональних білок-зв'язувальних агентів, таких як N-сукцинімідил-3-(2-піридилтіол)пропіонат (SPDP), імінотіолан (IT), біфункціональні похідні імідоефірів (такі як диметиладипімідат-HCl), активні складні ефіри (такі як дисукцинімідилсуберат), альдегіди (такі як глутаральдегід), біс-азидосполуки (такі як біс(п-азидобензоїл)гександіамін), похідні біс-діазонію (такі як біс-(п-діазонібензоїл)етилендіамін), діізоціанати (такі як толуол-2,6-діізоціанат) і біс-активні сполуки фтору (такі як 1,5-дифтор-2,4-динітробензол). Так, наприклад, імунотоксин ри-

цин може бути отриманий як описано в публікації Vitetta et al. Science, 238:1098 (1987).  $^{14}\text{C}$ -мічена 1-ізотіоціанатобензил-3-метилдіетилентриамінопентаоцтов кислота (MX-DTPA) є репрезентативним хелатоутворювальним агентом для кон'югування радіонукліду з антитілом. Див. WO 94/11026.

У даному винаході також розглядаються кон'югати антитіла й одного або декількох низькомолекулярних токсинів, таких як каліхеаміцин, майтанзиноїди, доластатини, ауристатини, трихотецен і CC1065, і похідні цих токсинів, які мають токсичну активність.

#### і. Майтанзин і майтанзиноїди

В одному з варіантів винаходу, імункон'югат містить антитіло (повнорозмірне антитіло або його фрагменти) відповідно до винаходу, кон'юговане з однієї або декількома молекулами майтанзиноїду.

Майтанзиноїди являють собою мітотичні інгібітори, які діють за допомогою інгібування полімеризації тубуліну. Майтанзин був уперше виділений у східно-африканської землерийки *Maytenus serrata* (патент США № 3896111). Потім було виявлено, що деякі мікроби також продукують майтанзиноїди, такі як майтанзинол і складні ефіри С-3-майтанзинолу (патент США № 4151042). Синтетичний майтанзинол і його похідні й аналоги описані, наприклад, у патентах США №№ 4137230; 4248870; 4256746; 4260608; 4265814; 4294757; 4307016; 4308268; 4308269; 4309428; 4313946; 4315929; 4317821; 4322348; 4331598; 4361650; 4364866; 4424219; 4450254; 4362663 і 4371533.

Молекули майтанзиноїдних лікарських засобів є привабливими молекулами лікарських засобів для використання в кон'югатах «антитіло - лікарський засіб», оскільки вони (i) можуть бути відносно легко отримані шляхом ферментації або хімічної модифікації й дериватизації продуктів ферментації, (ii) є придатними для дериватизації функціональними групами, що підходять для кон'югування за допомогою приєднання не-дисульфідних лінкерів до антитіл, (iii) є стабільними в плазмі й (iv) є ефективними проти різних пухлинних клітинних ліній.

Імункон'югати, що містять майтанзиноїди, способи їхнього одержання і їхнє терапевтичне застосування описані, наприклад, у патентах США №№ 5208020, 5416064 і в Європейському патенті EP 0425235Y1, які у всій своїй повноті вводяться в дану заявку за допомогою посилання. У публікації Liu et al. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 93:8618-8623 (1996) описані імункон'югати, що містять майтанзиноїд, позначений DM1, що був пов'язаний з моноклональним антитілом C242, спрямованим проти раку ободової кишки людини. Було виявлено, що вказаний кон'югат є у високому ступені цитотоксичним для культивованих ракових клітин товстої кишки й має протипухлинну активність в аналізі на ріст пухлини in vivo. У публікації Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992) описані імункон'югати, у яких майтанзиноїд був кон'югований за допомогою дисульфідного лінкера з мишачим антитілом A7, що зв'язується з антигеном, який присутній на клітинних лініях раку товстої кишки людини, або з іншим мишачим моноклональним антитілом TA.1, що зв'язується з онкогеном HER-



2/neu. Цитотоксичність кон'югату «ТА.1-майтанзиноїд» була протестована *in vitro* на клітинній лінії раку молочної залози людини SK-BR-3, яка експресує  $3 \times 10^5$  поверхневих антигенів HER-2 на клітину. Цей кон'югат лікарського засобу досягав ступеня цитотоксичності, аналогічної цитотоксичності вільного мایتанзиноїдного лікарського засобу, і така цитотоксичність може бути підвищена шляхом збільшення числа молекул мایتанзиноїду на молекулу антитіла. Кон'югат "A7-майтанзиноїд" виявляв низьку системну цитотоксичність у мишей.

Кон'югати "антитіло-майтанзиноїд" одержують шляхом хімічного зв'язування антитіла з молекулою мایتанзиноїду, де вказане зв'язування не приводить до значного зниження біологічної активності антитіла або молекули мایتанзиноїду. Див., наприклад, патент США No 5208020 (який у всій своїй повноті вводиться в даний опис за допомогою посилання). Молекули мایتанзиноїду, присутні в даному кон'югаті, у середньому, у кількості 3-4 молекули на одну молекулу антитіла, виявляють ефективність у підвищенні цитотоксичності по відношенню до клітин-мішеней, але, при цьому, не роблять негативного впливу на функцію або розчинність антитіла, хоча передбачається, що навіть одна молекула токсину на антитіло, у порівнянні з некон'югованим антитілом, буде підвищувати цитотоксичність кон'югату. Мایتанзиноїди добре відомі фахівцям і можуть бути синтезовані відомими методами, або вони можуть бути виділені із природних джерел. Прийнятні мایتанзиноїди описані, наприклад, у патенті США № 5208020 і в інших патентах і в непатентних публікаціях, описаних вище. Переважними мایتанзиноїдами є мایتанзинол і аналоги мایتанзинолу, що мають модифікації в ароматичному кільці або в інших положеннях молекули мایتанзинолу, такі як різні складні ефіри мایتанзинолу.

Для створення кон'югатів «антитіло - мایتанзиноїд» може бути використана множина лінкерних груп, відомих фахівцям, включаючи, наприклад, групи, описані в патенті США № 5208020 або в Європейському патенті EP 0425235Y1, і в публікації Chari et al., *Cancer Research* 52:127-131 (1992) і в заявці на патент США № 10/960602, поданої 8 жовтня 2004 року, які у всій своїй повноті вводяться в даний опис за допомогою посилання. Кон'югати «антитіло - мایتанзиноїд», що містять лінкерний компонент SMCC, можуть бути отримані як описано в заявці на патент США № 10/960602, поданої 8 жовтня 2004 року. Лінкерними групами є дисульфідні групи, тіоефірні групи, групи, чутливі до впливу кислоти, фотохімічно нестійкі групи, групи, чутливі до дії пептидази, або групи, чутливі до дії естерази, описані у вищезгаданих патентах, при цьому, переважними є дисульфідні й тіоефірні групи. Додаткові лінкерні групи описані й проілюстровані в даній заявці.

Кон'югати "антитіло - мایتанзиноїд" можуть бути отримані з використанням різних біфункціональних білок-зв'язувальних агентів, таких як N-сукцинімідил-3-(2-піридилдитіо)пропіонат (SPDP), сукцинімідил-4-(N-малеїмідометил)циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), імінотіолан (IT), біфункціона-

льні похідні імідоефірів (такі як диметиладипімідат-HCl), активні складні ефіри (такі як дисукцинімідил-суберат), альдегіди (такі як глутаральдегід), біс-азидосполуки (такі як біс-(п-азидобензоїл)гександіамін), похідні біс-діазонію (такі як біс-(п-діазонійбензоїл)етилендіамін), діізоціанати (такі як толуол-2,6-діізоціанат) і біс-активні сполуки фтору (такі як 1,5-дифтор-2,4-динітробензол). Особливо переважними зв'язувальними агентами для створення дисульфідного зв'язку є N-сукцинімідил-3-(2-піридилдитіо)пропіонат (SPDP) (Carlsson et al., *Biochem. J.* 173:723-737 [1978]) і N-сукцинімідил-4-(2-піридилтіо)пентаноат (SPP).

Лінкер може бути приєднаний до молекули мایتанзиноїду в різних положеннях, залежно від типу зв'язку. Так, наприклад, складноефірний зв'язок може бути утворений за допомогою реакції з гідроксильною групою стандартними методами зв'язування. Така реакція може здійснюватися в положенні C-3, що має гідроксильну групу, у положенні C-14, модифікованому гідроксиметилом, у положенні C-15, модифікованому гідроксильною групою, і в положенні C-20, що має гідроксильну групу. У переважному варіанті винаходу, вказаний зв'язок утворюється в положенні C-3 мایتанзинолу або його аналогу.

#### ii. Ауристати́ни й доластати́ни

У деяких варіантах винаходу, імунокон'югат містить антитіло відповідно до винаходу, кон'юговане з доластатинами або з пептидними аналогами доластатину і їхніми похідними, також з ауристати́нами (патенти США №№ 5635483, 5780588). Було виявлено, що доластати́ни й ауристати́ни негативно впливають на динаміку утворення мікротрубочок, гідроліз GTP і розподіл ядер і клітин (Woyke et al (2001) *Antimicrob. Agents and Chemother.* 45(12):3580-3584), і мають протиракову (патент США 5663149) і протигрибкову активність (Pettit et al. (1998) *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:2961-2965). Молекули доластатинів або ауристатинів лікарських засобів можуть бути приєднані до антитіла біля N(аміно)-кінця або біля C(карбокси)-кінця молекули пептидного лікарського засобу (WO 02/088172).

Репрезентативними варіантами ауристатину є молекули лікарського засобу, що містять приєднаний до N-кінця монометилауристатин, DE і DF, і описані в заявці на патент США рег. № 10/983340, озаглавленої «Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands» і поданої 5 листопада 2004 року, де опис вказаної заявки у всій своїй повноті вводиться в даний опис за допомогою посилання.

Звичайно, пептидні молекули лікарського засобу можуть бути отримані шляхом утворення пептидного зв'язку між двома або більше амінокислотами і/або пептидними фрагментами. Такі пептидні зв'язки можуть бути утворені, наприклад, методом синтезу в рідкій фазі (див. E. Schroder and K. Liibke, "The Peptides", volume 1, pp 76-136, 1965, Academic Press), добре відомим фахівцям в галузі пептидного синтезу. Молекули ауристатинів/доластатинів лікарських засобів можуть бути отримані методами, описаними в патентах

США 5635483 і 5780588; і в публікаціях Pettit et al (1989) J. Am. Chem. Soc. 111:5463-5465; Pettit et al (1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277; Pettit, G.R., et al. Synthesis, 1996, 719-725; and Pettit et al (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 5:859-863. Див., також публікацію Doronina (2003) Nat. Biotechnol. 21(7):778-784; і заявку на патент США per. № 10/983340, озаглавлену «Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands» і подану 5 листопада 2004 року, де вказана заявка у всій своїй повноті вводиться в даний опис за допомогою посилання (у даній заявці описані, наприклад, лінкери й методи одержання монометилвалінових сполук, таких як MMAE і MMAF, кон'югованих з лінкерами).

### iii. Каліхеаміцин

В інших варіантах винаходу, імунокон'югат містить антитіло відповідно до винаходу, кон'юговане з однією або декількома молекулами каліхеаміцину. Антибіотики сімейства каліхеаміцинів здатні продукувати дволанцюжкові ДНК-розриви в сублікомольних концентраціях. Опис одержання кон'югатів сімейства каліхеаміцинів можна знайти в патентах США №№ 5712354, 5714586, 5739116, 5767285, 5770701, 5770710, 5773001, 5977296 (всі патенти належать компанії American Cyanamid Company). Структурними аналогами каліхеаміцину, які можуть бути використані в цих цілях, є, але не обмежуються ними,  $\gamma^1$ ,  $\alpha_2^1$ ,  $\alpha_3^1$ , N-ацетил- $\gamma^1$ , PSAG і  $\theta^1$  (див. Hinman et al., Cancer Research 53:3336-3342 (1993), Lode et al., Cancer Research 58:2925-2928 (1998) і вищезгадані патенти США, що належать компанії American Cyanamid). Іншим протипухлинним лікарським засобом, з яким може бути кон'юговано антитіло, є засіб QFA, що являє собою антифолат. Каліхеаміцин і QFA мають внутрішньоклітинні активні сайти й із працею проходять через плазматичну мембрану. Тому поглинання цих агентів клітинами шляхом інтерналізації, опосередкованої антитілом, приводить до значного посилення їх цитотоксичних ефектів.

### iv. Інші цитотоксичні засоби

Іншими протипухлинними засобами, які можуть бути кон'юговані з антитілами відповідно до винаходу, є BCNU, стрептозоцин, вінкрестин і 5-фторурацил, сімейство агентів, відомих під загальною назвою комплекс IX-E33288, описаний у патентах США №№ 5053394, 5770710, також еспераміцини (патент США № 5877296).

Ферментативно активними токсинами і їхніми фрагментами, які можуть бути використані в цих цілях, є А-ланцюг дифтерійного токсину, активні фрагменти дифтерійного токсину, що не зв'язуються, А-ланцюг екзотоксину (від *Pseudomonas aeruginosa*), А-ланцюг рицину, А-ланцюг абрину, А-ланцюг модецину, альфа-сарцин, білки *Aleurites fordii*, білка діантину, білки *Phytolacca americana* (PAP I, PAP II і PAP-S), інгібітор *Momordica charantia*, курцин, кротин, інгібітор *Saponaia officinalis*, ге-лонін, мітогелін, рестриктоцин, феноміцин, еноміцин і трикотецини. Див., наприклад, заявку WO 93/21232, опубліковану 28 жовтня 1993 року.

У даному винаході також розглядається імунокон'югат, утворений антитілом і сполукою, яка має нуклеолітичну активність (наприклад, рибонуклеа-

зу або ДНК-ендонуклеазу, таку як дезоксирибонуклеаза; ДНКазу).

Для селективної деструкції пухлини може бути використане антитіло, що може містити високорадіоактивний атом. Для продукування радіоактивно кон'югованих антитіл можуть бути використані різні радіоактивні ізотопи. Прикладами таких радіонуклідів є  $^{211}\text{At}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{212}\text{Pb}$  і радіоактивні ізотопи Lu. Якщо вказаний кон'югат використовується для детекції, то він може містити радіоактивний атом для сцинтиграфічних досліджень, наприклад,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  або  $^{123}\text{I}$ , або спін-мітку для візуалізації методом ядерного магнітного резонансу (ЯМР) (відомої також як МР-візуалізація, МРВ), таку як йод-123, йод-131, індій-111, фтор-19, вуглець-13, азот-15, кисень-17, га-долій, марганець або залізо.

Радіоактивні або інші мітки можуть бути включені в кон'югат відомими методами. Так, наприклад, пептид може бути синтезований біологічними методами, або він може бути синтезований методом хімічного синтезу амінокислот з використанням прийнятних амінокислотних попередників, що включають, наприклад, фтор-19 замість водню. Такі мітки, як  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  або  $^{123}\text{I}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$  і  $^{111}\text{In}$  можуть бути приєднані за допомогою цистеїнового залишку пептиду. Ітрій-90 може бути приєднаний за допомогою лізинового залишку. Для введення йоду-123 може бути застосований метод IODOGEN (Fraker et al. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80:49-57). Інші методи докладно описані в публікації «Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy» (Chatal, CRC Press 1989).

Кон'югати антитіла й цитотоксичного лікарського засобу можуть бути отримані з використанням різних біфункціональних білок-зв'язувальних агентів, таких як N-сукцинімідил-3-(2-піридилдитіо)пропіонат (SPDP), сукцинімідил-4-(N-малеїдометил)циклогексан-1-карбонилат (SMCC), імінотіолан (IT), біфункціональні похідні імідоефірів (такі як диметиладіпімідат-HCl), активні складні ефіри (такі як дисукцинімідилсуберат), альдегіди (такі як глутаральдегід), біс-азидосполуки (такі як біс(п-азидобензоїл)гександіамін), похідні біс-діазонію (такі як біс-(п-діазонійбензоїл)етилендіамін), діізоціанати (такі як толуол-2,6-діізоціанат) і біс-активні сполуки фтору (такі як 1,5-дифтор-2,4-динітробензол). Так, наприклад, імунотоксин рицин може бути отриманий як описано в публікації Vitetta et al. Science, 238:1098 (1987).  $^{14}\text{C}$ -мічена 1-ізоціанатобензил-3-метилдіетилентриамінопентаоцтова кислота (MX-DTPA) є репрезентативним хелатоутворювальним агентом для кон'югування радіонукліду з антитілом. Див. WO 94/11026. Лінкером може бути "отщепляемый лінкер", що полегшує вивільнення цитотоксичного лікарського засобу в клітині. Так, наприклад, можуть бути використані лінкери, чутливі до впливу кислоти; лінкери, чутливі до дії пептидази, фотохімічно нестійкі лінкери, диметилкові лінкери або дисульфідвмісні лінкери (Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992), патент США № 5208020).

Сполуками, які спеціально розглянуті в даному винаході, є, але не обмежуються ними, ADC, отримані з використанням перехресно-зв'язувальних реагентів, таких як BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, сульфо-EMCS, сульфо-GMBS, сульфо-KMUS, сульфо-MBS, сульфо-SIAB, сульфо-SMCC, сульфо-SMPB і SVSB (сукцинімідил-(4-вінілсульфон)бензоат), які є комерційно доступними (наприклад, поставляються фірмою Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, USA). Див. посібник із застосування й каталог (Application Handbook and Catalog), 2003-2004, стор. 467-498.

v. Одержання кон'югатів "антитіло - лікарський засіб"

У кон'югатах "антитіло - лікарський засіб" (ADC) відповідно до винаходу, антитіло (Ab) кон'юговане з однією або з декількома молекулами лікарського засобу (D) за допомогою лінкера (L), де, наприклад, на одну молекулу антитіла доводиться приблизно від 1 до 20 молекул лікарського засобу. Кон'югати ADC формули I можуть бути отримані декількома способами, що передбачають проведення реакцій органічного хімічного синтезу з використанням умов і реагентів, відомих фахівцям, де вказані способи включають: (1) реакцію взаємодії нуклеофільної групи антитіла із двовалентним лінкерним реагентом з утворенням Ab-L за допомогою ковалентного зв'язку, потім реакцію взаємодії з молекулою лікарського засобу D; і (2) реакцію взаємодії нуклеофільної групи молекули лікарського засобу із двовалентним лінкерним реагентом з утворенням D-L за допомогою ковалентного зв'язку, потім реакцію взаємодії з нуклеофільною групою антитіла. Додаткові методи одержання ADC описані нижче.

Ab-(L-D)<sub>p</sub> I

Лінкер може складатися з одного або більше лінкерних компонентів. Репрезентативними прикладами лінкерних компонентів є 6-малеїмідокапроїл («MC»), малеїмідопропаноїл («MP»), валін-цитрулін («val-cit»), аланін-фенілаланін («ala-phe»), п-амінобензилоксикарбоніл («PAB»), N-сукцинімідил-4-(2-піридилтіо)пентаноат («SPP»), N-сукцинімідил-4-(N-малеїмідометил)циклогексан-1-карбоксилат («SMCC») і N-сукцинімідил-(4-йодацетил)амінобензоат («SIAB»). Фахівцям відомі й інші лінкерні компоненти, деякі з яких описані в даній заявці. Див., також заявку на патент США рег. № 10/983340, озаглавлену «Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands» і подану 5 листопада 2004 року, де вказана заявка у всій своїй повноті вводиться в даний опис за допомогою посилання.

У деяких варіантах винаходу, лінкер може містити амінокислотні залишки. Репрезентативними амінокислотними лінкерними компонентами є дипептид, трипептид, тетрапептид або пентапептид. Репрезентативними дипептидами є валін-цитрулін (vc або val-cit) і аланін-фенілаланін (af або ala-phe). Репрезентативними трипептидами є гліцин-валін-цитрулін (gly-val-cit) і гліцин-гліцин-гліцин (gly-gly-gly). Амінокислотними залишками, що входять до складу амінокислотного лінкерного компо-

нента, є природні амінокислотні залишки, також невеликі амінокислоти й не-природні амінокислотні аналоги, такі як цитрулін. Амінокислотні лінкерні компоненти можуть бути сконструйовані й оптимізовані по їх селективності відносно ферментативного розщеплення конкретними ферментами, наприклад, пухлина-асоційованою протеазою, катепсином B, C і D, або плазміновою протеазою.

Нуклеофільними групами, які присутні на антитілах, є, але не обмежуються ними: (i) N-кінцеві аміногрупи, (ii) аміногрупи бічного ланцюга, наприклад, лізину, (iii) тіолові групи бічного ланцюга, наприклад, цистеїну, і (iv) гідроксильні або аміногрупи цукрів, де вказане антитіло є глікозильованим. Аміногрупи, тіольні групи й гідроксильні групи є нуклеофільними й можуть піддаватися реакції взаємодії з утворенням ковалентних зв'язків з електрофільними групами на лінкер них молекулах або лінкер них реагентах, включаючи: (i) активні складні ефіри, такі як NHS-ефіри, HOBT-ефіри, галогенформіати й галегенангідриди кислот; (ii) алкіл- і бензил галогеніди, такі як галогенацетаміди; (iii) альдегіди, кетони, карбоксильні й малеїмідні групи. Деякі антитіла мають відновлювані міжланцюгові дисульфіди, тобто цистеїнові містки. Для кон'югування з лінкерними реагентами, антитіла можуть бути зроблені реакційноздатним шляхом їхньої обробки відновником, таким як DTT (дитіотреїтол). Кожний цистеїновий місток, теоретично, може утворювати два реакційноздатних тіолових нуклеофіли. В антитіла можуть бути введені додаткові нуклеофільні групи за допомогою реакції взаємодії лізінів з 2-імінотіолоном (реагентом Траута), що буде приводити до перетворення аміну в тіол. Реакційноздатні тіолові групи можуть бути включені в антитіло (або його фрагмент) шляхом введення одного, двох, трьох, чотирьох або більше цистеїнових залишків (наприклад, одержання мутантних антитіл, що містять один або декілька неприродних цистеїнових амінокислотних залишків).

Кон'югати "антитіло - лікарський засіб" відповідно до винаходу можуть бути також отримані шляхом модифікації антитіла із введенням у нього електрофільних груп, які можуть реагувати з нуклеофільними замісниками на лінкерному реагенті або лікарському засобі. Цукри глікозильованих антитіл можуть бути окислені, наприклад, періодатними окислювачами з утворенням альдегідних або кетонних груп, які можуть реагувати з аміногрупою лінкерних реагентів або молекул лікарського засобу. Отримані імінові групи шифової основи можуть утворювати стабільний зв'язок, або вони можуть бути відновлені, наприклад, борогідридними реагентами з утворенням стабільних амінових зв'язків. В одному з варіантів винаходу, реакція взаємодії вуглеводної частини глікозильованого антитіла з галактозооксидазою або з метаперіодатом натрію може приводити до утворення карбонільних (альдегідних і кетонних) груп у білку, які можуть реагувати з відповідними групами на лікарському засобі (Hermanson, Bioconjugate Techniques). В іншому варіанті винаходу, білки, що містять N-кінцеві серинові або треонінові залишки, можуть реагувати з метаперіодатом натрію з утво-

ренням альдегіду замість першої амінокислоти (Geoghegan & Stroh (1992), Bioconjugate Chem. 3:138-146; патент США № 5362852). Такий альдегід може взаємодіяти з молекулою лікарського засобу або з лінкерним нуклеофілом.

Аналогічним чином, нуклеофільними групами на молекулі лікарського засобу є, але не обмежуються ними, аміногрупи, тіольні, гідроксильні, гідразидні, оксимові, гідразинові, тіосемікарбазонові, гідразинкарбоксилатні й арилгідразидні групи, здатні реагувати, з утворенням ковалентних зв'язків, з електрофільними групами на лінкерних молекулах і лінкерних реагентах, включаючи: (i) активні складні ефіри, такі як NHS-ефіри, HOBt-ефіри, галогенформіати й галегенангідриди кислот; (ii) алкіл- і бензилгалогеніди, такі як галогенацетаміди; (iii) альдегіди, кетони, карбоксильні й малеїмідні групи.

Альтернативно, гібридний білок, що містить антитіло й цитотоксичний засіб, може бути отриманий, наприклад, рекомбінантними методами або методом пептидного синтезу. Довжина ДНК може становити відповідні області, що кодують дві частини кон'югату, або суміжні одна з одною, або розділені областю, що кодує лінкерний пептид, що не робить негативного впливу на бажані властивості даного кон'югату.

У ще одному варіанті винаходу, вказане антитіло може бути кон'юговане з "рецептором" (таким як стрептавідин) для його попереднього націлювання на пухлину, де вказаний кон'югат "антитіло-рецептор" уводять пацієнту з наступним видаленням незв'язаного кон'югату із кровотоку з використанням агента для кліренсу, потім уводять "ліганд" (наприклад, авідин), кон'югований із цитотоксичним засобом (наприклад, радіонуклеотидом).

#### Фармацевтичні композиції

Терапевтичні композиції, що містять антитіло відповідно до винаходу, одержують у зручних для зберігання формах шляхом змішування антитіла, що має потрібний ступінь чистоти, з не обов'язковими фізіологічно прийнятними носіями, наповнювачами або стабілізаторами (Remington; The Science and Practice of Pharmacy, 20th edition (2000) з одержанням водних розчинів, ліофілізованих препаратів або інших сухих препаратів. Прийнятні носії, наповнювачі або стабілізатори у використовуваних дозах і концентраціях повинні бути нетоксичними для реципієнтів, і ними є буфери, такі як фосфат, цитрат, гістидин і інші органічні кислоти; антиоксиданти, включаючи аскорбінову кислоту й метіонін; консерванти (такі як хлорид октадецилдиметилбензіламонію; хлорид гексаметонію; хлорид бензалконію; хлорид бензетонію; фенолоспирт, бутиловий або бензиловий спирт; алкілпарабени, такі як метил- або пропілпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол; і м-крезол); низькомолекулярні поліпептиди (що мають приблизно менше ніж 10 залишків); білки, такі як сироватковий альбумін, желатин або імуноглобуліни; гідрофільні полімери, такі як полівінілпіролідон; амінокислоти, такі як гліцин, glutамін, аспаргін, гістидин, аргінін або лізин; моносахариди, дисахариди й інші вуглеводи, включаючи глюкозу, манозу або декстрини; хелатоутворювальні агенти, такі як EDTA; цукри, такі як сахароза, маніт,

трегалоза або сорбіт; солеутворювальні протиіони, такі як натрій; металокомплекси (наприклад, комплекси Zn - білок); і/або неіоногенні поверхнево-активні речовини, такі як твін™, плуронік™ або поліетиленгліколь (ПЕГ).

Описана тут композиція може також містити декілька активних сполук, необхідних для конкретного показання, переважно, що мають додаткові активності, що не роблять негативного впливу одна на одну. Такі молекули можуть бути присутніми у комбінації в кількостях, ефективних для застосування в потрібних цілях.

Активні інгредієнти можуть бути також укладені в мікрокапсулу, отриману, наприклад, методами коацервації або шляхом міжфазної полімеризації, наприклад, у гідроксиметилцелюлозну або желатинову мікрокапсулу й поліметилметакрилатну мікрокапсулу, відповідно, у системи для доставки колоїдальних лікарських засобів (наприклад, у ліпосоми, альбумінові мікросфери, мікроемульсії, наночастинки й нанокапсули) або в макроемульсії. Така методика описана в керівництві Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20th edition (2000).

Композиції, використовувані для введення in vivo, повинні бути стерильними. Це може бути легко досягнуто шляхом фільтрації через стерильні фільтруючі мембрани.

Можуть бути отримані препарати пролонгованого вивільнення. Прийнятними прикладами препаратів пролонгованого вивільнення є напівпроникні матриці із твердих гідрофобних полімерів, що містять імуноглобулін відповідно до винаходу, де вказані матриці мають форму готових виробів, наприклад, плівок або мікрокапсул. Прикладами матриць пролонгованого вивільнення є поліефіри, гідрогелі (наприклад, полі(2-гідроксietилметакрилат) або полівініловий спирт), поліаліди (патент США № 3773919), співполімери L-глутамінової кислоти й  $\gamma$ -етил-L-глутамату, співполімер етилену-вінілацетату, що не розкладається, співполімери молочної кислоти - гліколевої кислоти, що розкладаються, такі як LUPRON DEPOT™ (мікросфери для ін'єкцій, що складаються із співполімера молочної кислоти - гліколевої кислоти й ацетату лейпроліду), і полі-D-(-)-3-гідроксимасляна кислота. Полімери, такі як співполімер етилену - вінілацетату й співполімер молочної кислоти - гліколевої кислоти здатні вивільняти молекули протягом більше 100 днів, деякі гідрогелі вивільняють білки за більш короткі періоди часу. Якщо інкапсульовані імуноглобуліни зберігаються в організмі протягом тривалого періоду часу, то вони можуть денатуруватися або агрегуватися під впливом вологи при 37°C, що приводить до втрати біологічної активності й до можливих змін імуногенності. Для стабілізації, залежно від конкретного механізму, можуть бути розроблені раціональні стратегії. Так, наприклад, якщо було виявлено, що механізмом агрегації є утворення міжмолекулярного S-S-зв'язку за допомогою тіо-дисульфідного обміну, то стабілізація може бути досягнута шляхом модифікації сульфгідрильних залишків, ліофілізації з кислотних розчинів, регуляції вмісту вологи з використанням відповідних добавок, і

одержання конкретних композицій на основі полімерної матриці.

Застосування

Антитіло відповідно до винаходу може бути використане, наприклад, у терапевтичних методах *in vitro*, *ex vivo* і *in vivo*.

В одному зі своїх аспектів даний винахід належить до способів лікування або попередження пухлини, раку або клітинно-проліферативного розладу, асоційованого з підвищеною експресією і/або активністю DLL4, де вказані способи включають введення ефективної кількості анти-DLL4-антитіла індивідууму, який потребує такого лікування.

В одному зі своїх аспектів даний винахід належить до способів ослаблення, інгібування, блокування або попередження росту пухлини або ракової пухлини, де вказані способи включають введення ефективної кількості анти-DLL4-антитіла індивідууму, який потребує такого лікування.

В одному зі своїх аспектів даний винахід належить до способів лікування пухлини, раку і/або клітинно-проліферативного розладу, де вказані способи включають введення ефективної кількості анти-DLL4-антитіла індивідууму, який потребує такого лікування.

В одному зі своїх аспектів даний винахід належить до способів інгібування ангіогенезу, де вказані способи включають введення ефективної кількості анти-DLL4-антитіла індивідууму, який потребує такого лікування.

В одному зі своїх аспектів даний винахід належить до способів лікування патологічного стану, асоційованого з ангіогенезом, де вказані способи включають введення ефективної кількості анти-DLL4-антитіла індивідууму, який потребує такого лікування. У деяких варіантах винаходу, вказаним патологічним станом, асоційованим з ангіогенезом, є пухлина, рак і/або клітинно-проліферативний розлад. У деяких варіантах винаходу, вказаним патологічним станом, асоційованим з ангіогенезом, є внутрішньоочне неоваскулярне захворювання.

Крім того, щонайменше деякі антитіла відповідно до винаходу можуть зв'язуватися з антигеном, що походить від інших видів. Відповідно до цього, антитіла відповідно до винаходу можуть бути використані для зв'язування з антигеном, що має специфічну активність, наприклад, у клітинній культурі, що містить вказаний антиген, і в організмі людини або інших ссавців, що мають антиген, з яким перехресно реагує антитіло відповідно до винаходу (наприклад, у шимпанзе, паванів, ігуанок, собакоподібних мавп і макак-резусів, також свиней або мишей). В одному з варіантів винаходу, антитіло відповідно до винаходу може бути використане для інгібування антигенної активності шляхом контактування вказаного антитіла з антигеном, так, щоб здійснювалося інгібування активності антигену. Переважним антигеном є людська білкова молекула.

В одному з варіантів винаходу, антитіло відповідно до винаходу може бути використане в способі зв'язування антигену в індивідуума, що страждає розладом, асоційованим з підвищеним

рівнем експресії і/або активності антигену, де вказаний спосіб включає введення даному індивідууму антитіла відповідно до винаходу для його зв'язування з антигеном. Переважним антигеном є людська білкова молекула, переважним індивідуумом є людина. Альтернативно, вказаним індивідуумом може бути ссавець, що експресує антиген, з яким зв'язується антитіло відповідно до винаходу. Крім того, вказаним індивідуумом може бути ссавець, якому був уведений вказаний антиген (наприклад, шляхом прямого введення антигену або експресії антигенного трансгена). Антитіло відповідно до винаходу може бути введене людині в терапевтичних цілях. Крім того, антитіло відповідно до винаходу може бути введене ссавцеві, що не є людиною (наприклад, примату, свині або миші) і експресуючому антиген, з яким перехресно реагує імуноглобулін, з метою лікування цього ссавця, або воно може бути введене тварині з моделлю людського захворювання. Що стосується тварини-моделі, то такі тварини можуть бути використані для оцінки терапевтичної ефективності антитіл відповідно до винаходу (наприклад, для визначення доз і часу введення).

Антитіла відповідно до винаходу можуть бути використані для лікування, інгібування, уповільнення прогресування, попередження/уповільнення виникнення рецидивів, поліпшення динаміки або попередження захворювань, розладів або станів, асоційованих з експресією і/або активністю однієї або декількох молекул антигену.

Репрезентативними розладами є карцинома, лімфома, бластома, саркома й лейкоз або лімфоїдні злоякісні пухлини. Більш конкретними прикладами таких ракових захворювань є плоскоклітинний рак (наприклад, епітеліальний плоскоклітинний рак), рак легенів, включаючи дрібноклітинний рак легенів, не-дрібноклітинний рак легенів, аденокарцинома легенів і плоскоклітинна карцинома легенів, рак черевної порожнини, гепатоцелюлярний рак, рак шлунка, включаючи рак шлунково-кишкового тракту; рак підшлункової залози, гліобластома, рак шийки матки, рак яєчника, рак печінки, рак сечового міхура, рак сечових шляхів, гепатома, рак молочної залози, рак товстої кишки, рак прямої кишки, рак ободової кишки, карцинома ендометрію або матки, карцинома слинних залоз, рак нирок, рак передміхурової залози, рак вульви, рак щитовидної залози, карцинома печінки, карцинома заднього проходу, карцинома пенісу, меланома, множинна мієлома й В-клітинний лімфома, рак головного мозку, також рак голови й шиї, і асоційовані з ними метастази. У деяких варіантах винаходу, вказане ракове захворювання вибрано із групи, яка складається із дрібноклітинного раку легенів, нейробластоми, меланоми, карциноми молочної залози, раку шлунка, раку ободової кишки (CRC) і гепатоцелюлярної карциноми. У деяких варіантах винаходу, вказане ракове захворювання вибрано із групи, яка складається з не-дрібноклітинного раку легенів, раку ободової кишки й карциноми молочної залози, включаючи метастази вказаних ракових захворювань.

У деяких варіантах винаходу, імункон'югат, що містить антитіло, кон'юговане з одним або де-

кількома цитотоксичними агентами, вводять вказаному пацієнту. У деяких варіантах винаходу, імунокон'югат і/або антиген, з яким він зв'язується, інтерналізується в клітині, що приводить до підвищення терапевтичної ефективності імунокон'югату, спрямованої на знищення клітини-мішені, з якою він зв'язується. В одному з варіантів винаходу, цитотоксичний агент придушує нуклеїнову кислоту або інгібує її активність у клітині-мішені. В одному з варіантів винаходу, вказаний цитотоксичний агент придушує полімеризацію мікротрубочок або перешкоджає такій полімеризації. Прикладами вказаних цитотоксичних агентів є будь-які з описаних тут хіміотерапевтичних засобів (таких як майтанзиноїд, ауристатин, доластатин або калихеаміцин), радіоактивний ізотоп, або рибонуклеаза або ДНК-ендонуклеаза.

Антитіла відповідно до винаходу, взяті окремо або в комбінації з іншими композиціями, можуть бути використані в терапевтичних цілях. Так, наприклад, антитіло відповідно до винаходу може бути введене разом з іншим антитілом, хіміотерапевтичним(и) засобом(ами) (включаючи суміші хіміотерапевтичних засобів), з іншим(и) цитотоксичним(и) засобом(ами), антиангіогенним(и) засобом(ами), цитокинами і/або ріст-інгібуючим(и) засобом(ами). Якщо антитіло відповідно до винаходу інгібує ріст пухлини, то може виявитися особливо бажаним його об'єднання з одним або декількома іншими терапевтичними засобами, які також інгібують ріст пухлини, наприклад, з анти-VEGF агентами, включаючи антитіла проти VEGF. Альтернативно або додатково, пацієнт може бути підданий комбінованій променевої терапії (наприклад, опроміненням зовнішнім пучком або терапії з використанням радіоактивно міченого агента, такого як антитіло). Такою вказаною вище комбінованою терапією є комбіноване введення (де два або більше агенти включені в одну або ту ж або в окремі композиції) і окреме введення, при якому антитіло відповідно до винаходу може бути введене до і/або після проведення допоміжної терапії.

#### Комбінована терапія

Як було вказано вище, даний винахід належить до комбінованої терапії, при якій анти-DLL4-антитіло вводять одночасно із проведенням іншої терапії. Так, наприклад, анти-DLL4-антитіла використовуються в комбінаціях із протираковою терапією або з терапією, спрямованою проти утворення нових судин, для лікування різних неопластичних або не-неопластичних станів. В одному з варіантів винаходу, вказаний неопластичний або не-неопластичний стан характеризується патологічним розладом, асоційованим з аберантним або небажаним ангіогенезом. Анти-DLL4-антитіл може бути введене послідовно або в комбінації з іншим засобом, ефективним для таких цілей, або у вигляді однієї композиції, або у вигляді окремих композицій. Альтернативно або додатково може бути уведена множина інгібіторів DLL4.

Введення анти-DLL4-антитіла може бути здійснене одночасно з іншими засобами, наприклад, у вигляді однієї композиції або у вигляді двох або більше окремих композицій із застосуванням того самого або різних способів введення. Альтернати-

вно або додатково, введення може бути здійснене послідовно в будь-якому порядку. У деяких варіантах винаходу, інтервали між введенням двох або більше композицій можуть становити від декількох хвилин до декількох днів або від декількох тижнів до декількох місяців. Так, наприклад, спочатку може бути введений протираковий засіб, потім інгібітор DLL4. Однак, розглядається також одночасне введення анти-DLL4-антитіла з іншими засобами, або введення спочатку анти-DLL4-антитіла, потім введення іншого засобу.

Ефективна кількість терапевтичних засобів, що вводиться в комбінації з анти-DLL4-антитілом, призначається лікарем або ветеринаром. Для досягнення максимального ефекту лікування вказаних станів, дозу, що вводиться, відповідним чином коректують. Доза також залежить від таких факторів, як тип використовуваного терапевтичного засобу й від конкретного пацієнта, що піддається лікуванню. Прийнятними дозами протиракового засобу є дози, які використовуються в сучасній терапії, і ці дози можуть бути знижені завдяки комбінованій дії (синергічній дії) протиракового засобу й анти-DLL4-антитіла. У деяких варіантах винаходу, комбінація інгібіторів підсилює ефективність одного інгібітору. Термін «потенціювати» означає підвищувати ефективність терапевтичного засобу, що вводиться у звичайній або припустимій дозі. Див. також розділ даної заявки, озаглавлений «Фармацевтичні композиції».

Звичайно, анти-DLL4-антитіла й протиракові засоби є прийнятними для лікування тих самих або аналогічних захворювань шляхом запобігання або ослаблення патологічного розладу, такого як ріст пухлини або ріст ракових клітин. В одному з варіантів винаходу, вказаним протираковим засобом є антиангіогенний засіб.

Ангіогенна терапія при раку являє собою стратегію лікування раку, метою якої є інгібування розвитку кровоносних судин пухлини, необхідних для подачі поживних речовин, необхідних для росту пухлини. Оскільки ангіогенез відбувається як при рості первинної пухлини, так і при метастазах, то лікування антиангіогенними засобами, здійснюване відповідно до даного винаходу, може приводити до інгібування росту пухлини в місці утворення первинної пухлини, також до попередження розвитку метастазів пухлини, що утворюються в інших ділянках, що дозволяє впливати на пухлину іншими терапевтичними засобами.

Багато які антиангіогенні засоби були ідентифіковані й відомі фахівцям, включаючи засоби, перераховані в даній заявці, наприклад, у розділі «Визначення» і засоби, описані, наприклад, у публікаціях Carmeliet & Jain, *Nature* 407:249-257 (2000); Ferrara et al., *Nature Reviews: Drug Discovery*, 3:391-400 (2004); і Sato Int. J. Clin. Oncol, 8:200-206 (2003). Див. також заявку на патент США US 20030055006. В одному з варіантів винаходу, анти-DLL4-антитіло використовується в комбінації з нейтралізуючим анти-VEGF-антитілом (або його фрагментом) і/або іншим антагоністом VEGF або антагоністом рецептора VEGF, включаючи, але не обмежуючись ними, наприклад, розчинний рецептор VEGF (наприклад, VEGFR-1, VEGFR-2,

VEGFR-3, нейтроліни (наприклад, NRP1, NRP2)), їхні фрагменти, аптамери, здатні блокувати VEGF або VEGFR, нейтралізуючі анти-VEGFR-антитіла, низькомолекулярні інгібітори тирозинкіназ VEGFR (RTK), антисмислові послідовності для VEGF, рибозими проти VEGF або рецепторів VEGF, варіанти антагоністів VEGF; і будь-які їхні комбінації. Альтернативно або додатково, пацієнту, крім антагоніста VEGF і іншого засобу, можуть бути, але необов'язково, одночасно введені два або більше інгібітори ангиогенезу. У деяких варіантах винаходу, один або декілька додаткових терапевтичних засобів, наприклад, протиракових засобів, можуть бути введені в комбінації з анти-DLL4-антитілом, антагоністом VEGF і антиангіогенним засобом.

У деяких аспектах винаходу, іншими терапевтичними методами, що підходять для комбінованої терапії пухлини з використанням анти-DLL4-антитіла є інша протиракова терапія (наприклад, хірургічне втручання, лікування радіологічними засобами (наприклад, променева терапія або введення радіоактивних речовин), хіміотерапія, лікування протираковими засобами, перерахованими в даній заявці й відомими фахівцям, або їхньої комбінації). Альтернативно або додатково, пацієнту можуть бути одночасно введені два або більше антитіла, що зв'язуються з тими самими або із двома або більше різними антигенами, описаними в даній заявці. Іноді може також виявитися переважним введення пацієнту одного або декількох цитокінів.

#### Хіміотерапевтичні засоби

У деяких своїх аспектах, даний винахід належить до способу блокування або зниження росту пухлини або ракових клітин, де вказаний спосіб включає введення ефективних кількостей антагоніста DLL4 і/або інгібітори(ів) ангиогенезу й одного або декількох хіміотерапевтичних засобів пацієнту, сприйнятливому до розвитку раку, або пацієнту, у якого був діагностований рак. Різні хіміотерапевтичні засоби можуть бути використані в комбінованих способах лікування відповідно до винаходу. Репрезентативний і необмежувачий список розглянутих хіміотерапевтичних засобів приводиться в даній заявці в розділі «Визначення».

Як очевидно для кожного середнього фахівця в даній галузі, відповідні дози хіміотерапевтичних засобів приблизно аналогічні дозам, уже застосовуваним у клінічній терапії, де вказані хіміотерапевтичні засоби вводять окремо або в комбінації з іншими хіміотерапевтичними засобами. Дози можуть варіюватися залежно від стану, що піддається лікуванню. Лікар, що призначає дане лікування, може самостійно обчислити відповідну дозу для кожного окремого індивідуума.

Даний винахід також належить до способів і композицій для інгібування або попередження рецидивуючого росту пухлини або ракових клітин. Термін «рецидивуючий ріст пухлини або ракових клітин» використовується для визначення стану, на який страждає даний індивідуум, або стану, лікування якого одним або декількома методами терапії (наприклад, протиракової терапії, такої як хіміотерапія, променева терапія, хірургічне втручання, гормональна терапія і/або біологічна тера-

пія/імунотерапія, терапія анти-VEGF-антитілом, зокрема, стандартний терапевтичний метод лікування конкретного ракового захворювання), не є клінічно адекватним, або дає лише короткотривалий сприятливий ефект, тому такі пацієнти мають потребу в додатковій ефективній терапії. Використовуваний тут термін може також означати стан «несприйнятливості/резистентності» пацієнта, наприклад, стан пацієнта, у якого спостерігається певна відповідь на дану терапію, але при цьому, виникають побічні ефекти; або пацієнта, у якого розвивається резистентність, не спостерігається відповіді на дану терапію або не спостерігається задовільної відповіді на дану терапію й т.п. У різних варіантах винаходу, раковим захворюванням є рецидивуючий ріст пухлини або ракових клітин, при яких не спостерігається помітного зменшення числа ракових клітин або не спостерігається їхнього збільшення, або не спостерігається зменшення розміру пухлини або спостерігається його збільшення, або не спостерігається якого-небудь додаткового зменшення розміру ракової пухлини або числа ракових клітин. Встановлення рецидивуючого росту ракової пухлини або ракових клітин може бути здійснено будь-яким методом *in vivo* або *in vitro*, відомим фахівцям, що включають аналіз на ефективність придушення ракових клітин, де терміни «рецидив» або «резистентність» або «несприйнятливості» вживаються в їхньому загальноприйнятому змісті. Прикладом рецидивуючого росту пухлини є пухлина, резистентна до лікування анти-VEGF-антитілом.

Даний винахід належить до способів блокування або ослаблення рецидивуючого росту пухлини або ракових клітин в індивідуума, де вказані способи включають введення індивідууму одного або декількох анти-DLL4-антитіл з метою блокування або ослаблення рецидивуючого росту пухлини або ракових клітин. У деяких варіантах винаходу, антагоніст може бути уведений після проведення протиракової терапії. У деяких варіантах винаходу, анти-DLL4-антитіла вводять одночасно із проведенням протиракової терапії. Альтернативно або додатково, терапію анти-DLL4-антитілом проводять по черзі з іншою протираковою терапією, і така терапія може бути здійснена в будь-якому порядку. Даний винахід також охоплює способи введення одного або декількох інгібуючих антитіл для попередження розвитку або рецидиву ракового захворювання в пацієнтів, схильних до розвитку такого ракового захворювання. Звичайно, такий індивідуум піддавався (або піддається) комбінованій протираковій терапії. В одному з варіантів винаходу, протираковою терапією є лікування антиангіогенним засобом, наприклад, антагоністом VEGF. Антиангіогенними засобами є засоби, відомі фахівцям і перераховані в даній заявці в розділі «Визначення». В одному з варіантів винаходу, антиангіогенним засобом є нейтралізуюче анти-VEGF-антитіло або його фрагмент (наприклад, AVASTIN® (Genentech, South San Francisco, CA) або LUCENTIS® (Genentech, South San Francisco, CA)), Y0317, M4, G6, B20, 2C3 і т.п.). Див., наприклад, патенти США №№ 6582959, 6884879, 6703020; заявки WO 98/45332; WO 96/30046; W

094/10202; EP 0666868B1; заявки на патенти США 20030206899, 20030190317, 20030203409 і 20050112126; Popkov et al., *Journal of Immunological Methods* 288:149-164 (2004); і WO 2005012359. Додаткові засоби можуть бути введені в комбінації з антагоністом VEGF і анти-DLL4-антитілом для блокування або ослаблення рецидивуючого росту пухлини або ракових клітин, наприклад, див. розділ, озаглавлений тут «Комбінована терапія».

Антитіло відповідно до винаходу (і допоміжний терапевтичний засіб) вводять різними способами, включаючи парентеральне, підшкірне, внутрішньочеревинне, внутрішньолегеневе й інтраназальне введення, якщо необхідно місцеве лікування, то антитіло вводять в уражену ділянку або в склисте тіло. Парентеральною інфузією є внутрішньом'язове, внутрішньовенне, внутрішньоартеріальне, внутрішньочеревинне або підшкірне введення. Крім того, прийнятним способом введення антитіла є періодичне вливання, зокрема, вливання антитіла в зменшуваних дозах. Такі дози можуть бути введені будь-яким прийнятним способом, наприклад, шляхом ін'єкцій, таких як внутрішньовенні або підшкірні ін'єкції, і ці дози залежать від того, чи є таке введення періодичним або постійним.

Антитіловмісну композицію відповідно до винаходу готують, розділяють на дози й вводять відповідно до добре відомої медичної практики. Факторами, що враховуються для одержання таких композицій, є конкретний розлад, що піддається лікуванню, конкретний свавець, що піддається лікуванню, клінічний стан конкретного пацієнта, етіологічний фактор, що викликає даний розлад, ділянку, на яку спрямований даний засіб, спосіб введення, схема введення й інші фактори, відомі практичним лікарям. Вказане антитіло мабуть, але необов'язково, приготовлене у вигляді композиції з одним або декількома сучасними засобами, використовуваними для попередження або лікування розглянутого розладу. Ефективна кількість таких інших засобів залежить від кількості антитіла відповідно до винаходу, присутніх у даній композиції, типу розладу або способу його лікування й від інших факторів, обговорюваних вище. Вказані інші засоби звичайно вводяться в тих же самих дозах і тих же способах, які звичайно використовувалися раніше, або ці дози становлять приблизно 1-99% від використовуваних раніше доз.

Для попередження або лікування захворювання, прийнятні дози антитіла відповідно до винаходу (використовуваного окремо або в комбінації з іншими засобами, такими як хіміотерапевтичні засоби) залежать від типу захворювання, що піддається лікуванню, типу антитіла, тяжкості й курсу лікування захворювання, незалежно від того чи вводять вказане антитіло в профілактичних або терапевтичних цілях, від проведеного раніше лікування, від історії хвороби пацієнта і його сприйнятливості до антитіла, і від призначення лікаря. Таке антитіло може бути введене пацієнту один раз або декілька разів під час проведення курсу лікування. Залежно від типу й тяжкості захворювання, початкова попередньо встановлена доза антитіла,

що вводиться пацієнту, становить приблизно від 1 мкг/кг до 15 мкг/кг (наприклад, 0,1 мкг/кг - 10 мкг/кг), незалежно від того, чи здійснюють одноразове або багаторазове введення або безперервну інфузію даного антитіла. Типова добова доза може становити приблизно від 1 мкг/кг до 100 мкг/кг або більше, залежно від вищезгаданих факторів. Для повторного введення протягом декількох днів або більше, залежно від стану, лікування може проводитися доти, поки не буде досягнуте бажане придушення симптомів захворювання. Репрезентативна доза антитіла може становити приблизно від 0,05 мкг/кг до 10 мкг/кг. Так, наприклад, пацієнту можуть бути введені одна або декілька доз, що становлять приблизно 0,5 мкг/кг, 2,0 мкг/кг, 4,0 мкг/кг або 10 мкг/кг (або будь-які їхні комбінації). Такі дози можуть бути введені періодично, наприклад, щотижня або раз на три тижні (наприклад, пацієнту може бути введене приблизно від двох до двадцяти, наприклад, приблизно шість доз антитіла). При цьому, спочатку може бути уведена більше висока доза, потім можуть бути введені одна або декілька більш низьких доз. Репрезентативна схема введення доз включає введення початкової дози, що становить приблизно 4 мкг/кг, з наступним щотижневим введенням підтримуючої дози, що становить приблизно 2 мкг/кг антитіла. Однак, можуть бути застосовані й інші, схеми введення. Моніторинг ефекту такої терапії може бути легко проведений стандартними методами й із застосуванням стандартних аналізів.

Анти-DLL4-антитіла відповідно до винаходу можуть бути використані в аналізах для детектування рівня експресії DLL4 (таких як діагностичні або прогностичні аналізи) у конкретних клітинах або тканинах, де вказані антитіла мітять як описано нижче і/або іммобілізують на нерозчинній матриці.

В іншому своєму аспекті, даний винахід належить до способів детектування DLL4, де вказані способи включають детектування комплексу «DLL4 - анти-DLL4-антитіло» у зразку. Використовуваний тут термін «детектування» включає якісне і/або кількісне детектування (визначення рівнів) у присутності або за відсутності контролю.

В іншому своєму аспекті, даний винахід належить до способів діагностики розладу, асоційованого з експресією і/або активністю DLL4, де вказані способи включають детектування комплексу «DLL4 - анти-DLL4-антитіло» у біологічному зразку, узятому в пацієнта, що страждає на вказаний розлад, або в пацієнта з підозрою на такий розлад. У деяких варіантах винаходу, експресією DLL4 є підвищений рівень експресії або аномальна (небажана) експресія. У деяких варіантах винаходу, вказаним розладом є пухлина, рак і/або клітинно-проліферативний розлад.

В іншому своєму аспекті, даний винахід належить до будь-якого з описаних тут анти-DLL4-антитіл, де вказане анти-DLL4-антитіло містить детектовану мітку.

В іншому своєму аспекті, даний винахід належить до комплексу, що складається з будь-якого з описаних тут анти-DLL4-антитіл і DLL4. У деяких варіантах винаходу, вказаний комплекс присутній



in vivo або in vitro. У деяких варіантах винаходу, вказаний комплекс містить ракову клітину. У деяких варіантах винаходу, анти-DLL4-антитіло є детектовано міченим.

Анти-DLL4-антитіла можуть бути використані для детектування DLL4 у будь-якому одному з ряду добре відомих аналітичних методів детекції. Так, наприклад, біологічний зразок може бути проаналізований на DLL4 шляхом узяття зразка з потрібного джерела, змішування зразка з анти-DLL4-антитілом з утворенням комплексу «антитіло/DLL4» з будь-яким DLL4, присутнім у даній суміші, і детектування будь-якого комплексу «антитіло/DLL4», присутнього в даній суміші. Біологічний зразок може бути отриманий для аналізу методами, відомими фахівцям і прийнятими для аналізу конкретного зразка. Методи змішування зразка з антитілами й методи детектування комплексу «антитіло/DLL4» вибирають залежно від типу застосовуваного аналізу. Такими аналізами є імуногістохімічний аналіз, конкурентний аналіз і «сендвіч»-аналіз, також аналізи на стеричне інгібування.

У методах аналізу на DLL4 використовуються один або декілька з нижченаведених реагентів, таких як: мічений аналог DLL4, іммобілізований аналог DLL4, мічене анти-DLL4-антитіло, іммобілізоване анти-DLL4-антитіло й стричні кон'югати. Мічені реагенти також відомі як «мітки».

Використовуваною міткою є будь-яка детектована функціональна група, що не впливає на зв'язування DLL4 і анти-DLL4-антитіла. Відомо, що в імуноаналізах використовуються різні мітки, і прикладами таких міток є молекули, які можуть бути детектовані безпосередньо, такі як флуорохром, хемілюмінесцентна речовина й радіоактивні мітки, також молекули, такі як ферменти, які, для їх детектування, повинні бути піддані реакції взаємодії або дериватизації. Прикладами таких міток є радіоізотопи  $^{32}\text{P}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$  і  $^{131}\text{I}$ , флуорофори, такі як хелатні комплекси рідкісноземельних металів або флуоресцеїн і його похідні, родамін і його похідні, дансил, умбеліферон, люциферази, наприклад, люцифераза світляка й бактеріальна люцифераза (патент США № 4737456), люциферин, 2,3-дигідрофталазиндіони, пероксидаза хрину (ПХ), лужна фосфатаза,  $\beta$ -галактозидаза, глюкоамілаза, лізоцим, сахарид-оксидази, наприклад, глюкозооксидаза, галактозооксидаза й глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа, гетероциклічні оксидази, такі як уриказа й ксантин-оксидаза, приєднані до ферменту, що використовує пероксид водню для окислювання барвника-попередника, такого як ПХ; лактопероксидаза або мікропероксидаза; біотин/авідин, спінові мітки, бактеріофагові мітки, стабільні вільні радикали й т.п.

Для ковалентного зв'язування цих міток з білками або поліпептидами застосовуються стандартні методи. Так, наприклад, для мічення антитіл вищеописаними флуоресцентними, хемілюмінесцентними й ферментними мітками можуть бути використані зв'язувальні реагенти, такі як діальдегіди, карбодііміди, дималеїміди, бісїмідати, бісдіазотований бензидині т.п. Див., наприклад, патенти США №№ 3940475 (флуориметрія) і 3645090

(ферменти; Hunter et al., Nature, 144: 945 (1962); David et al., Biochemistry, 13: 1014-1021 (1974); Pain et al., J. Immunol. Methods, 40: 219-230 (1981); i Nygren, J. Histochem. and Cytochem., 30: 407-412 (1982). Переважними мітками, використовуваними в даній заявці, є такі ферменти як пероксидаза хрину й лужна фосфатаза. Кон'югування такої мітки, включаючи ферменти, з даним антитілом являє собою стандартну технологічну процедуру, застосовувану в методах імуноаналізів і відому середньому фахівцеві в даній галузі. Див., наприклад, O'Sullivan et al., "Methods for the Preparation of Enzyme-antibody Conjugates for Use in Enzyme Immunoassay," in Methods in Enzymology, ed. J.J. Langone and H. Van Vunakis, Vol. 73 (Academic Press, New York, New York, 1981), pp. 147-166.

Для проведення деяких аналітичних методів необхідна іммобілізація реагентів. Іммобілізація приводить до відділення анти-DLL4-антитіла від будь-якого DLL4, що залишився у розчині у вільному стані. Таку процедуру звичайно здійснюють шляхом інсолубілізації анти-DLL4-антитіла або аналога DLL4 перед проведенням процедури аналізу, як це відбувається при адсорбції на не розчинній у воді матриці або поверхні (Bennich et al., патент США 3720760), шляхом ковалентного зв'язування (наприклад, перехресного зв'язування із глутаральдегідом) або шляхом наступної інсолубілізації анти-DLL4-антитіла або аналога DLL4, наприклад, за допомогою імунопреципітації.

Експресія білків у зразку може бути оцінена відповідно до протоколів імуногістохімічного аналізу й забарвлювання. Було показано, що імуногістохімічне забарвлювання тканинних зрізів являє собою надійний метод оцінки або детектування присутності білків у зразку. Імуногістохімічні («ІГХ») методи передбачають використання антитіла для зондування й візуалізації клітинних антигенів in situ, звичайно з використанням хромогенних або флуоресцентних реагентів. Для одержання зразка може бути використаний зразок тканини або клітини, узятий у ссавця (звичайно в людини). Прикладами таких зразків є, але не обмежуються ними, ракові клітини, такі як ракові клітини товстої кишки, молочної залози, передміхурової залози, яєчника, легень, шлунка, підшлункової залози, лімфому й лейкозу. Зразок може бути отриманий із застосуванням різних процедур, відомих фахівцям, - включаючи, але не обмежуючись ними, хірургічну операцію, аспірацію або біопсію. Тканина може бути свіжою або замороженою. В одному з варіантів винаходу, зразок фіксують і заливають у парафін або т.п. Зразок тканини може бути фіксований (тобто пресервований) стандартними методами. Середньому фахівцеві в даній галузі відомо, що вибір фіксуючої речовини залежить від цілей гістологічного забарвлювання зразка або якого-небудь іншого аналізу. Середньому фахівцеві в даній галузі також відомо, що час фіксації залежить від розміру зразка тканини й від використовуваної фіксуючої речовини.

Імуногістохімічний (ІГХ) аналіз може бути здійснений у комбінації з іншими методами, такими як морфологічне забарвлювання і/або флуоресцентна гібридизація in-situ. Фахівцям відомі два загаль-

них методи ІГХ-аналізу: прямий і непрямий аналізи. Відповідно до першого аналізу, зв'язування антитіла з антигеном-мішенню (наприклад, DLL4) визначають прямим методом. У вказаному прямому аналізі використовують мічений реагент, такий як флуоресцентна мітка або мічене ферментом «перше» антитіло, що може бути візуалізоване без взаємодії з іншим антитілом. У типовому непрямому аналізі, некон'юговане «перше» антитіло зв'язується з антигеном, потім мічене «друге» антитіло зв'язується з першим антитілом. Якщо «друге» антитіло кон'юговане з ферментом міткою, то для візуалізації антигену додають хромогенний або флуорогенний субстрат. Ампліфікація сигналу може відбуватися в результаті реакції декількох «других» антитіл з різними епітопами на «першому» антитілі.

«Перше» і/або «друге» антитіло, використовуване для імуногістохімічного аналізу, звичайно мітять детектованою молекулою. Існує множина міток, які можуть бути, в основному, розділені на групи відповідно до описаного нижче категоріями.

Крім процедур одержання зразка, обговорюваних вище, може виявитися бажаною додаткова обробка зрізів тканини, здійснювана до, під час або після проведення ІГХ-аналізу. Так, наприклад, можуть бути застосовані методи відновлення епітопу, такі як нагрівання зразка тканини в цитратному буфері (див., наприклад, Leong et al. Appl. Immunohistochem. 4(3):201 (1996)).

Після проведення необов'язкової стадії блокування, зріз тканини обробляють «першим» антитілом протягом певного періоду часу й у прийнятних умовах, достатніх для зв'язування першого антитіла, з білковим антигеном-мішенню в зразку ткани. Відповідні умови, прийнятні для досягнення даної мети, можуть бути визначені шляхом рутинного експериментування. Рівень зв'язування антитіла зі зразком визначають із використанням будь-якої однієї з детектованих міток, обговорюваних вище. Переважною міткою є ферментна мітка (наприклад, HRPO), яка каталізує хімічне перетворення хромогенного субстрату, такого як 3,3'-діамінобензидиновий хромоген. Переважно, вказану ферментативну мітку кон'югують з антитілом, що специфічно зв'язується з «першим» антитілом (наприклад, «першим» антитілом є кроляче поліклональне антитіло, «другим» антитілом є козяче антикроляче антитіло).

Приготовлені наступним чином зразки можуть бути отримані у вигляді гістологічних зрізів і нанесені на предметні стекла. Потім ці предметні стекла аналізують під мікроскопом, і оцінюють відповідно до критеріїв інтенсивності забарвлювання, звичайно використовуваними фахівцями в рутинних процедурах аналізу. Інтенсивність забарвлювання може бути оцінена за наступними критеріями:

Таблиця 2

Картина забарвлювання	Оцінка
Забарвлювання в клітинах не спостерігалось.	0
Дуже слабке/ледь помітне забарвлювання спостерігалось в більше ніж 10% клітин.	1+
Слабке-помірне забарвлювання спостерігалось в більше ніж 10% клітин.	2+
Помірне-інтенсивне забарвлювання спостерігалось в більше ніж 10% клітин.	3+

Звичайно, в імуногістохімічному аналізі, оцінка картини забарвлювання приблизно 2+ або вище є діагностичною і/або прогностичною. У деяких варіантах винаходу, в імуногістохімічному аналізі, оцінка картини забарвлювання приблизно 1+ або вище є діагностичною і/або прогностичною. В інших варіантах винаходу, оцінка картини забарвлювання приблизно 3 або вище є діагностичною і/або прогностичною. При цьому, слід зазначити, що якщо клітини і/або тканини пухлини або аденоми товстої кишки оцінюють за допомогою імуногістохімічного аналізу, то забарвлювання звичайно визначають або оцінюють у пухлинних клітинах і/або тканинах (а не в стромальних або оточуючих тканин, які можуть бути присутніми у зразку).

Існують також і інші аналітичні методи, відомі як конкурентні аналізи або «сендвіч»-аналізи, і такі методи широко використовуються в промисловості по виготовленню комерційно доступних діагностичних засобів.

Конкурентні аналізи ґрунтуються на здатності аналога міченого DLL4 конкурувати з тестовим зразком DLL4 за зв'язування з обмеженим числом антигензв'язувальних сайтів анти-DLL4-антитіла. Анти-DLL4-антитіло звичайно піддають інсолюбілізації до або після конкурентного зв'язування, потім

мітку й DLL4, пов'язані з анти-DLL4-антитілом, відділяють від незв'язаної мітки й DLL4. Такий поділ здійснюють шляхом декантування (де вказаний партнер по зв'язуванню був попередньо підданий інсолюбілізації) або шляхом центрифугування (де партнер по зв'язуванню був осаджений після конкурентної реакції). Кількість тестованого зразка DLL4 зворотно пропорційна кількості зв'язаної мітки, як було визначено по кількості речовини-маркера. Були побудовані криві «доза - відповідь» по відомих кількостях DLL4, і отримані результати порівнювали з результатами тесту для визначення кількості DLL4, присутнього в тестованому зразку. Якщо як детектовані маркери використовуються ферменти, то такі аналізи називаються ELISA-системами.

Конкурентний аналіз іншого типу, який називається «гомогенним» аналізом, не передбачає розділення фаз. У цьому випадку кон'югат ферменту з DLL4 одержують і використовують так, щоб анти-DLL4-антитіло, при його зв'язуванні з DLL4, могло модифікувати ферментативну активність. У цьому випадку, DLL4 або його імунологічно активні фрагменти кон'югують з ферментом, таким як пероксидаза, за допомогою біфункціонального органічного містка. Кон'югати, призначені для

використання з анти-DLL4-антитілом, вибирають так, щоб зв'язування анти-DLL4-антитіла привело до інгібування або потенціювання ферментативної активності мітки. Цей метод *per se* широко застосовується на практиці й називається EMIT.

У методах гомогенного аналізу із застосуванням стеричного утруднення використовуються стеричні кон'югати. Ці кон'югати синтезують шляхом ковалентного зв'язування низькомолекулярного гаптену з невеликим фрагментом DLL4, так, щоб антитіло проти гаптену, було, по суті, нездатне зв'язуватися з даним кон'югатом одночасно з анти-DLL4-антитілом. У цій процедурі аналізу, DLL4, присутній у тестованому зразку, буде зв'язуватися з анти-DLL4-антитілом, що дозволяє антитілу проти гаптену зв'язуватися з даним кон'югатом і приводити до зміни властивостей гаптенового кон'югату, наприклад, до зміни інтенсивності флуоресценції в тому випадку, якщо гаптен є флуорофор.

«Сендвіч»-аналізи, зокрема, можуть бути використані для визначення DLL4 або анти-DLL4-антитілу. У послідовно проведених «сендвіч»-аналізах, іммобілізоване анти-DLL4-антитіло використовують для адсорбції тестованого зразка DLL4, потім тестований зразок видаляють шляхом промивання, і зв'язаний DLL4 використовують для адсорбції «другого» міченого анти-DLL4-антитіла, після чого зв'язану речовину відділяють від іншої мітки. Кількість зв'язаної мітки прямо пропорційно кількості тестованого зразка DLL4. В «одночасно» проведених «сендвіч»-аналізах, тестований зразок не відділяють від мітки перед додаванням міченого анти-DLL4-антитіла. У зразках, тестованих на присутність DLL4, застосовується послідовно проведений «сендвіч»-аналіз, у якому як одне антитіло використовується моноклональне анти-DLL4-антитіло, як інше антитіло використовується поліклональне анти-DLL4-антитіло.

Вище були описані лише репрезентативні аналізи на DLL4. Інші методи, застосовувані в цей час, або методи, які будуть розроблені в майбутньому, і в які для визначення DLL4 буде використовуватися анти-DLL4-антитіло, входять в об'єм розглянутих методів, включаючи описані тут біоаналізи.

#### Промислові вироби

В іншому своєму аспекті, даний винахід належить до промислового виробу, що містить матеріали, використовувані для лікування, попередження і/або діагностики описаних вище розладів. Промисловий виріб містить контейнер і етикетку або вкладиш, вкладений в упаковку або наклеєний на контейнер. Прийнятними контейнерами є, наприклад, сулії, флакони, шприци й т.п. Контейнери можуть бути виготовлені з різних матеріалів, таких як скло або пластик. Цей контейнер містить композицію, що сама по собі або в комбінації з іншою(ними) композицією(ями) є ефективною для лікування, попередження і/або діагностики даного стану, і може мати стерильний вхідний отвір (наприклад, таким контейнером може бути пакет для внутрішньовенного введення розчину або посудина, що має пробку, що протикається безголковою голкою для ін'єкції). У даній композиції щонайме-

нше одним активним агентом є антитіло відповідно до винаходу. На етикетці або у вкладиші, вкладеному в упаковку, повинно бути вказано, що така композиція використовується для лікування даного конкретного захворювання, такого як рак. Крім того, вказаний промисловий виріб може включати (а) перший контейнер з композицією, що втримується в ньому, що включає антитіло відповідно до винаходу, і (б) другий контейнер з композицією, що втримується в ньому, що включає додатковий терапевтичний засіб, включаючи, наприклад, хіміотерапевтичний засіб або антиангіогенний засіб, включаючи, наприклад, анти-VEGF-антитіло (наприклад, бевацизумаб). У цьому варіанті винаходу, промисловий виріб відповідно до винаходу може додатково містити вкладений в упаковку вкладиш, у якому вказано, що композиції, що містять «перше» і «друге» антитіло, можуть бути використані для лікування конкретного стану, наприклад, раку. Альтернативно або додатково, вказаний промисловий виріб може також містити другий (або третій) контейнер, що включає фармацевтично прийнятний буфер, такий як бактеріостатична вода для ін'єкцій (BWF), забуферений фосфатом фізіологічний розчин, розчин Рінгера й розчин декстрози. Крім того, воно може включати й інші матеріали, необхідні для комерційного виробництва й для споживача, включаючи інші буфери, розріджувачі, фільтри, голки й шприци.

Нижче приводяться приклади способів і композицій відповідно до винаходу. При цьому, слід зазначити, що виходячи з наведеного вище загального опису винаходу можуть бути здійснені й інші різні варіанти винаходу.

#### ПРИКЛАДИ

##### Матеріали й методи

Комерційно доступні реагенти, описані в прикладах, використовували відповідно до інструкцій виробників, якщо це не обговорено особливо. Джерелом клітин, використовуваних у нижченаведених прикладах і у всьому описі винаходу, є Американська колекція типових культур, American Type Culture Collection Manassas, VA 20108, і ці клітини ідентифікують по їхніх реєстраційних номерах ATCC®. Роботи, цитовані в прикладах, перераховані після прикладів. Всі ці роботи вводяться в даний опис за допомогою посилання.

##### Приклад 1: Матеріали й методи

У прикладах були використані наступні матеріали й методи.

Аналіз HUVEC на сферах з фібриновим гелем. Аналіз HUVEC на сферах з фібриновим гелем докладно описаний у літературі (Nakatsu, M. N. et al. *Microvasc Res* 66, 102-12 (2003)). Коротко, 3 сфери Cytodex™ (Amersham Pharmacia Biotech) покривали 350-400 клітинами HUVEC на сферу. Приблизно 200 сфер, покритих HUVEC, заливали у фібриновий згусток в одну з ямок 12-ямкового планшета для культивування тканин. На верхню частину згустку висівали  $8 \times 10^4$  клітин SF. Аналізи завершували на 9-й день для проведення імунозabarвлення й візуалізації. У деяких експериментах, розростання HUVEC візуалізували шляхом забарвлювання кон'югованим з біотином анти-CD31 антитілом (клон WM59, eBioscience) і стреп-

тавідином-Су3. Для забарвлювання ядер HUVEC, фібринові гелі фіксували протягом ночі в 2% параформальдегіді (PFA) і забарвлювали 4',6-діамідино-2-феніліндолом (DAPI, Sigma). Для забарвлювання Ki67, фібринові гелі обробляли 10×трипсином-EDTA протягом 5 хвилин для видалення верхнього шару SF, потім нейтралізували 10% FBS в PBS і фіксували протягом ночі в 4% PFA. Потім фібринові гелі блокували 10% козячою сироваткою в PBST протягом 4 годин, після чого інкубували протягом ночі із кролячим антимишачим Ki67 (готовий до вживання клон Sp6, Lab Vision), потім здійснювали детектування з використанням «другого» Су3-кон'югованого антитіла проти кролячих IgG (Jackson ImmunoResearch). Всі нічні процедури інкубування проводили при 4°C.

Дослідження сітківки новонароджених мишей. Новонародженим мишам CD1 від того самого приплоду і.р. ін'єктували PBS або YW26.82 (10 мг/кг) на P1 і P3. Очі витягали на P5 і фіксували 4% PFA в PBS протягом ночі. Вирізані сітківки блокували 10% козячою сироваткою в PBST протягом 3 годин, потім інкубували протягом ночі з «першими» антитілами. Перша суміш включала біотинільований ізолектин B4 (25 мкг/мл, Bandeiraea simplicifolia; Sigma), і один з нижченаведених компонентів, таких як кроляче антимишаче Ki67 (1:1, готовий до вживання клон Sp6, Lab Vision) або мишаче Су3-кон'юговане антитіло проти альфа-SMA (1:2000, Sigma-Aldrich) і 10% сироватку в PBLEC (1% тритон X-100, 0,1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM MnCl<sub>2</sub> в PBS, pH 6,8). Потім сітківки промивали в PBST і інкубували протягом ночі з комбінацією «другого» антитіла й стрептавідину Alexa Fluor® 488 (1:200; Molecular Probes) і з Су3-кон'югованим антитілом проти кролячих IgG (1:200; Jackson ImmunoResearch). Після завершення забарвлювання, сітківки фіксували 4% PFA в PBS. Всі нічні процедури інкубування проводили при 4°C. Зображення гістологічних зрізів сітківки одержували на предметному склі за допомогою конфокальної флуоресцентної мікроскопії.

Моделі пухлини. Були використані 8-10-тижневі самиці «голих» мишей з уродженою відсутністю природних клітин-кілерів. Для генерування підшкірних пухлин, мишам у правий задній бік ін'єктували 0,1 мл клітинної суспензії, що містить 50% матригелю (BD Bioscience). Кожній миші ін'єктували 5×10<sup>6</sup> ракових клітин людської товстої кишки HM7, 10×10<sup>6</sup> клітин карциноми людської товстої кишки Colo205, 10×10<sup>6</sup> клітин карциноми легень людини Calu6, 10×10<sup>6</sup> клітин карциноми легень людини MV-522, 10×10<sup>6</sup> клітин мишачого лейкозу WENI-3, 10×10<sup>6</sup> клітин мишачої лімфоми EL4, 10×10<sup>6</sup> клітин раку яєчника людини SK-OV-3 XI, 10×10<sup>6</sup> клітин мишачого раку легень LL2, 10×10<sup>6</sup> клітин лейкозу/лімфоми EL4 або 10×10<sup>6</sup> клітин недрібноклітинного раку легень H1299. Для одержання моделі людської меланоми MDA-MB-435, мишам у жирове тіло молочної залози ін'єктували 0,1 мл клітинної (5×10<sup>6</sup>) суспензії, що містить 50% матригель. Анти-DLL4-антитіло YW26.82 вводили і.р. (10 мг/кг маси тіла, два рази на тиждень). Для одержання наступних моделей пухлини, кожній досліджуваній миші в правий бік підшкірно імплан-

тували фрагмент пухлини (1 мм<sup>3</sup>): недрібноклітинного раку легень SKMES-1, раку молочної залози людини MX-1, раку прямої і ободової кишки людини SW620 і людської аденокарциноми LS174T. Розмір пухлини оцінювали за допомогою штангенциркуля. Об'єм пухлини (мм<sup>3</sup>) визначали шляхом вимірювання довжини (l) і ширини (w) і обчислювали за формулою:  $V = lw^2/2$ . Кожна група включала 10-15 тварин. Статистичне порівняння груп обробки здійснювали за допомогою двостороннього t-критерію Стьюдента.

Мічення й імуногістохімічний аналіз судин пухлини. Мишей анестезували ізофлураном. Потім і.в. ін'єктували ФІТЦ-мічений лектин Lycopersicon esculentum (150 мкг в 150 мкл 0,9% NaCl; Vector Laboratories)-і залишали на 5 хвилин для його надходження в кровотік, потім здійснювали системну перфузію. Судинну мережу піддавали транскардіальній перфузії 1% PFA в PBS протягом 3 хвилин. Пухлини видаляли й фіксували шляхом занурення в ту ж саму фіксуючу речовину на 2 години, після чого інкубували протягом ночі в 30% сахарозі для кріозахисту, потім заливали в OCT. Зрізи (товщиною 4 мкм) забарвлювали антитілом проти мишачого CD31 (1:50, BD Pharmingen), потім козячим антитілом проти щурячих IgG Alexa 594 (1:800, Molecular Probes).

Гістологічний і імуногістохімічний аналіз мишачої тонкої кишки. Були отримані фіксовані у формаліні й залиті в парафін зрізи тканин мишачої тонкої кишки товщиною 3 мкм. Гістохімічну ідентифікацію клітин тонкої кишки здійснювали з використанням альціанового синього відповідно до рекомендацій виробників (PolyScientific). Для забарвлювання анти-Ki67 антитілом, зрізи попередньо обробляли розчином для відновлення мішені (S1700, DAKO) і інкубували із кролячим анти-Ki67-антитілом (1:200, клон SP6, Neomarkers). «Друге» козяче антикроляче антитіло в концентрації 7,5 г/мл (Vector labs) детектували з використанням набору Vectastain ABC Elite Kit (Vector labs). Всі Ki67-забарвлені зрізи піддавали контрастному фарбуванню гематоксиліном Мейера. Для забарвлювання HES-1 використовували антитіло проти щурячого HES-1 (клон NM1, MBL, International), потім TSA-HRP.

Інтерференція РНК. Набір дуплексів короткої інтерферуючої РНК (кіРНК) (SMART), націлених на людський DLL4, і контрольну не-націлену кіРНК (Si Control Non-Target siRNA #2) заповували в компанії Dharmascon. Дуплекси кіРНК (50 нМ) трансфектували в клітини HUVEC при 40% конфлюентності з використанням реагенту OptiMEM-1® і ліпופектаміну™ 2000 (Invitrogen). FACS-аналіз проводили через 48 годин після трансфекції кіРНК. Нижче представлені послідовності набору SMART з 4 кіРНК, націлених на DLL4:

СAACTGCCCTTATGGCTTTT (SEQ ID NO:62) (олігонуклеотид 1, смислова послідовність),

AAAGCCATAAGGGCAGTTGTT (SEQ ID NO:63) (олігонуклеотид 1, антисмислова послідовність),

СAACTGCCCTTCAATTCATT (SEQ ID NO:64) (олігонуклеотид 2, смислова послідовність),

TGAAATTGAAGGGCAGTTGTT (SEQ ID NO:65)  
(олігонуклеотид 2, антисмислова послідовність),  
TGACCAAGATCTCAACTATT (SEQ ID NO:66)  
(олігонуклеотид 3, смислова послідовність),  
GTAGTTGAGATCTTGGTCATT (SEQ ID NO:67)  
(олігонуклеотид 3, антисмислова послідовність),  
GGCCAACATATGCTTGTGAATT (SEQ ID NO:68)  
(олігонуклеотид 4, смислова послідовність),  
TTCACAAGCATAGTTGGCCTT (SEQ ID NO:69)  
(олігонуклеотид 4, антисмислова послідовність).

Ліганд Notch: ELISA-аналіз на блокування Notch. 96-ямкові мікротитраційні планшети покривали рекомбінантним щурячим Notch 1-Fc (rrNotch1-Fc, R&D Systems) у концентрації 0,5 мкг/мл. У цьому аналізі використовували кондиціоноване середовище, що містить DLL4-AP (амінокислоти 1-404 DLL4, приєднані до лужної фосфатази (AP) людської плаценти). Для одержання кондиціонованого середовища, клітини 293 були тимчасово трансфектовані DLL4-AP-експресуючої плазмідой з використанням реагенту Fugen6 (Roche Molecular Biochemicals). Через п'ять днів після трансфекції, кондиціоноване середовище збирали, фільтрували й вміщували на зберігання при 4°C. Очищені антитіла, які титрували починаючи від 0,15 і до 25 мкг/мл, попередньо інкубували протягом 1 години при кімнатній температурі з DLL4-AP-кондиціонованим середовищем при розведенні, що забезпечувало 50% максимально досяжне зв'язування з покритим rrNotch1-Fc. Потім суміш антитіла/DLL4-AP додавали в rrNotch1-Fc-покритий планшет протягом 1 години при кімнатній температурі, після чого планшети декілька разів промивали PBS. Зв'язаний DLL4-AP детектували з використанням реагенту 1-Step PNPP (Pierce), використовуючи як субстрат, і вимірювали оптичну густину (OD) на 405 нм. Ідентичний аналіз здійснювали з використанням DLL 1-AP (людського DLL1, амінокислоти 1-445). Аналогічні аналізи здійснювали з використанням очищеного DLL4-His (С-кінцевого His-міченого людського DLL4, амінокислоти 1-404) і Jag1-His (R&D system). Зв'язані His-мічені ліганди детектували з використанням мишачого анти-His mAb (1 мкг/мл, - Roche Molecular Biochemicals), біотинільованого козячого антимишачого антитіла (Jackson ImmunoResearch) і стрептавідину-AP (Jackson ImmunoResearch).

Екстракція РНК і кількісна ЗТ-ПЛР у реальному часі. Екстракцію повнорозмірної РНК із HUVES в двовимірній культурі здійснювали з використанням набору RNeasy® Mini Kit (Qiagen) відповідно до інструкцій виробників. Для екстракції повнорозмірної РНК із клітин HUVES, що ростуть у фібринових гелях, ці фібринові гелі обробляли 10× трипсином-EDTA (Gibco) протягом 5 хвилин для видалення верхнього шару фібробластів, потім нейтралізували 10% FBS в PBS. Після цього фібринові згустки видаляли з ямок для культивування тканини й піддавали центрифугуванню (10K протягом 5 хвилин) у мікропробірках для видалення надлишкової рідини. Отримані геліві «гранули» піддавали лізису з використанням буфера для лізису (за допомогою набору RNeasy® Mini Kit), потім обробляли як і у випадку HUVES в двовимірній культурі. Якість РНК оцінювали з використанням 6000 наночипів із РНК

і біоаналізатора Agilent 2100 (Agilent Technologies). Кількісні ЗТ-ПЛР у реальному часі проводили із трьома повторностями з використанням ПЛР-системи в реальному часі 7500 (Applied Biosystems). Як еталонний ген для нормалізації використовували людський ген GAPDH. Рівні експресії виражали як середню ( $\pm$  середньоквадратична помилка) кратність змін мРНК по відношенню до контролю для 3 окремих визначень. Нижче представлені послідовності прямого й зворотного праймера й зондів для VEGFR2, TGF $\beta$ 2 і GAPDH.

#### TGF $\beta$ 2

Прямий праймер: GTA AAG TCT TGC AAA TGC AGC TA (SEQ ID NO:70)

Зворотний праймер: CAT CAT CAT TAT CAT CAT CAT TGT C (SEQ ID NO:71)

Зонд: AAT TCT TGG AAA AGT GGC AAG ACC AAA AT (SEQ ID NO:72)

#### VEGFR2

Прямий праймер: CTT TCC ACC AGC AGG AAG TAG (SEQ ID NO:73)

Зворотний праймер: TGC AGT CCG AGG TCC TTT (SEQ ID NO:74)

Зонд: CGC ATT TGA TTT TCA TTT CGA CAA CAG A (SEQ ID NO:75)

#### GAPDH

Прямий праймер: GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC (SEQ ID NO:76)

Зворотний праймер: GAA GGT GAA GGT CGG AGT C (SEQ ID NO:77)

Зонд: CAA GCT TCC CGT TCT CAG CC (SEQ ID NO:78)

Приклад 2: Генерування фагових анти-DLL4-антитіл

Бібліотеки синтезованих фагових антител конструювали на одній каркасній області (гуманізоване анти-ErbB2-антитіло, 4D5) шляхом введення варіабельності в гіперваріабельні області (CDR) важкого і легкого ланцюгів (Lee, C. V. et al. J. Mol. Biol. 340, 1073-93 (2004); Liang, W. C. et al. J. Biol. Chem. 281, 951-61 (2006)). Пеннінг на планшетах з вихідними бібліотеками здійснювали в цілях проведення аналізу на His-мічений людський DLL4 (амінокислоти 1-404), іммобілізований на імунопланшетах MaxiSorp™. Після чотирьох раундів збагачення, клони довільно збирали і конкретні клони, які зв'язувалися, ідентифікували з використанням фагового ELISA. Отримані hDLL4-клони, які зв'язувалися, були потім скриніровані з використанням His-міченого мишачого білка DLL4 для ідентифікації клонів, які перехресно зв'язувалися. Для кожного позитивного фагового клону, варіабельні області важкого і легкого ланцюгів субклонували в експресійні вектори pRK, які були сконструйовані так, щоб вони були здатні експресувати повнорозмірні ланцюги IgG. Конструкції важкого і легкого ланцюгів котрансфекували в клітини 293 або CHO, і експресовані антитіла виділяли з безсироваткового середовища на афінній колонці з білком А. Очищені антитіла тестували за допомогою ELISA на блокуванні взаємодії DLL4 з щурячим Notch1-Fc, і за допомогою FACS на зв'язування зі стабільними клітинними лініями, які експресують або повнорозмірний людський DLL4, або мишачий DLL4. Для дозрівання афінності, фагові бібліотеки з трьома

різними комбінаціями CDR-петель (CDR-L3, -H1 і -H2), які походять від вихідного клону, що представляє інтерес, конструювали з застосуванням стратегії м'якої рандомізації так, щоб кожне вибране положення було модифіковане з отриманням залишку не-дикого типу, або щоб підтримувалось відношення залишків не-дикого типу до залишків дикого типу, що складає приблизно 50:50 (Liang et al., 2006, див. вище). Потім клони з високою афінністю ідентифікували в чотири раунди пеннінгу в рідкій фазі, що проводиться для аналізу на людські і мишачі His-мічені білки DLL4 в умовах постійно зростаючої жорсткості.

#### Приклад 3: Характеризація анти-DLL4-антитіл

Для визначення афінності зв'язування анти-DLL4 Mab проводили вимірювання з використанням поверхневого плазмонного резонансу (SRP) на пристрої Biacore™-3000 (Biacore, Inc., Piscataway, NJ). Коротко, біосенсорні чіпи з карбоксиметильованим декстраном (CM5, Biacore Inc.) активували гідрохлоридом N-етил-N'-(3-диметиламінопропіл)карбодіміду (EDC) і N-гідроксисукцинімідом (NHS) відповідно до інструк-

цій постачальників. Анти-DLL4-антитіло розводили 10 mM ацетатом натрію, pH 4,8, до 5 мкг/мл, потім ін'єктували при швидкості потоку 5 мкл/хв. Швидкість досягнення величини одиниць відгуку (RU) зв'язаного антитіла, що становить приблизно 500. Потім для блокування непрореагувавших груп вводили 1M етаноламін. Для вимірювання кінетики реакції вводили ін'єкції двократних серійних розведень людських або мишачих молекул DLL4-His (0,7 nM-500 nM) в PBS, що містить 0,05% твіну™ 20 при 25°C і при швидкості потоку 25 мкл/хв. Швидкість асоціації ( $k_{on}$ ) і швидкість дисоціації ( $k_{off}$ ) обчислювали з використанням простої лангмюрівської моделі зв'язування 1:1 (Biacore Evaluation Software version 3.2). Константу рівноважної дисоціації ( $K_d$ ) обчислювали як відношення  $k_{off}/k_{on}$ . Результати цього експерименту представлені в таблиці 3. Антитіло YW26.81 давало аналогічні величини  $K_d$  для людського й мишачого DLL4 (величини  $K_d$  становили 0,1 нм і 0,09 нм, відповідно), що дозволяє проводити оцінку ефективної дії антитіл на мишачих моделях.

Таблиця 3

Афінність і кінетика зв'язування анти-DLL4-антитіл з людським і мишачим DLL4. «NA» означає, що вимірювання не проводили

Клон	мишачий дельта 4 (ECD5.5)			людський дельта 4 (ECD5.5)		
	$k_{on}/10^5$	$k_{off}/10^{-4}$	$K_d$ (нм)	$k_{on}/10^5$	$k_{off}/10^{-4}$	$K_d$ (нм)
YW26	0,57	16	28	0,3	7,4	25
YW26.6	4,1	0,61	0,15	2	0,49	0,25
YW26.14	3,3	0,73	0,22	1,8	0,66	0,37
YW26.20	3,3	1	0,3	1,7	0,79	0,46
YW26.34	3,6	0,65	0,18	1,9	0,67	0,35
YW26.82	5,4	0,46	0,09	2,4	0,37	0,15

#### Приклад 4: Додаткова характеристика анти-DLL4-антитіла

Картування епітопів анти-DLL4 Mab YW26.82: Анти-DLL4 Mab 26.82 розпізнавало детермінанту зв'язування, яка присутня в EGF-подібному повторі # 2 (EGL2) людського позаклітинного домена DLL4 (ECD). EGL2 містить амінокислоти 252-282 людського ECD DLL4. Коротко, мутанти ECD DLL4 були експресовані як гібридні білки з лужною фосфатазою й було проаналізоване їхнє зв'язування з антитілом. На фіг. 11а схематично представлений набір мутантів DLL4, експресованих у вигляді С-кінцевих гібридних білків з лужною фосфатазою (AP) у плаценті людини. У дужках вказані послідовності DLL4, включені в гібридні білки. Середовище, яке кондиціоноване клітинами 293T і містить гібридні білки, тестували на 96-ямкових мікротитраційних планшетах, покритих очищеним анти-DLL4 Mab (YW26.82, 0,5 мкг/мл). Зв'язаний DLL4.AP детектували з використанням реагенту 1-Step PNPP (Pierce) як субстрату і вимірювали оптичну густину OD на 405 нм. Mab YW26.82 зв'язувалося з конструкціями, що містять домен EGL2 DLL4, і не зв'язувалося з конструкцією, що не містить домен EGL2 DLL4. Ці результати показали, що анти-DLL4 Mab YW 26.82 розпізнавало епітоп у домені EGL2 людського ECD DLL4.

Mab YW26.82 селективно зв'язується з мишачим і людським DLL4. 96-ямкові планшети Nunc Maxisorp покривали очищеними рекомбінантними білками як вказано вище (1 мкг/мл). Зв'язування YW26.82 у вказаних концентраціях вимірювали за допомогою ELISA. Зв'язані антитіла детектували за допомогою ПХ-кон'югованого анти-людського антитіла з використанням ТМВ як субстрату і вимірювали оптичну густину OD на 450 нм. Як аналітичний контроль використовували анти-HER 2-антитіло й рекомбінантний ErbB2-ECD (фігура 11b). Результати цього експерименту представлені на фігурі 11b. Mab YW26.82 зв'язувалося з людським і мишачим DLL4, і не зв'язувалося з людським DLL1 і людським JAG1 на детектованому рівні. Ці результати показали, що Mab YW26.82 селективно зв'язується з DLL4.

FACS-аналіз клітин 293, тимчасово трансфікованих вектором, повнорозмірним DLL4, Jag1 або DLL1, також продемонстрував, що Mab YW26.82 селективно зв'язується з DLL4. Як показано на фігурі 11с, значний рівень зв'язування YW26.82 детектувався тільки на DLL4-трансфікованих клітинах (верхня панель). На DLL1- або Jag1-трансфікованих клітинах якого-небудь значного зв'язування не спостерігалось. Експресія Jag1 і DLL1 була підтверджена за допомогою зв'язуван-

ня рекомбінантного щурячого Notch 1-Fc (rrNotch1-Fc, середня панель) і рекомбінантного щурячого Notch2-Fc (rrNotch2-Fc, нижня панель), відповідно. YW26.82, rrNotch1-Fc або rrNotch2-Fc (R & D system) використовували при 2 мкг/мл, потім використовували ФЕ-кон'юговане козяче антитіло проти людських IgG (1:500, Jackson ImmunoResearch).

Експерименти на конкурентне зв'язування показали, що Mab YW26.82 ефективно й селективно блокує взаємодію Notch з DLL4, але не з іншими лігандами Notch. Як показано на фігурі 11d, анти-DLL4 Mab блокує зв'язування DLL4-AP, але не DLL1-AP, з покритим rNotch1, при обчисленому TC50 ~12 нм (ліва панель). Анти-DLL4 Mab блокує зв'язування DLL4-His, але не Jag1-His, з покритим rNotch1, при обчисленому IC50 ~8 нм (права панель).

Анти-DLL4 Mab YW26.82 специфічно зв'язувався з ендегенно експресованим DLL4 в ендотеліальних людських клітинах пупкової вени (HUVEC). Був проведений FACS-аналіз HUVEC, трансфікованих контрольною або DLL4-специфічною кРНК. YW26.82 використовували при 2 мкг/мл, потім використовували ФЕ-кон'юговане козяче антитіло проти людського IgG (1:500, Jackson ImmunoResearch). Результати цього експерименту представлені на фігурі 11e. При цьому спостерігалось зв'язування з нетрансфекованими HUVEC (контроль) і з HUVEC, трансфекованими контрольною кРНК. На противагу цьому, рівень зв'язування з HUVEC, трансфекованими кРНК DLL4, значно знижувався. Ці експерименти продемонстрували, що анти-DLL4 Mab YW26.82 специфічно зв'язується з ендегенно експресованим DLL4 в HUVEC.

Приклад 5: Обробка анти-DLL4-антитілом приводить до підвищення рівня проліферації ендотеліальних клітин *in vitro*

Ендотеліальні клітини людської пупкової вени (HUVEC), що ростуть у фібринових гелях у присутності спільно культивованих клітин фібробластів шкіри людини (SF), дають відростки, що мають чітко виражену порожнино-подібну структуру (Nakatsu, M. N. et al. *Microvasc Res* 66, 102-12 (2003)). Додавання анти-DLL4-антитіла YW26.82 приводить до помітного збільшення довжини й числа відростків (фіг. 7a). Протеолітичний процесинг Notch, каталізований  $\gamma$ -секретазною активністю білкового комплексу, є основною стадією в процесі активації Notch (Baron, M. *Semin Cell Dev Biol* 14, 113-9 (2003)). Цікаво відзначити, що інгібітор  $\gamma$ -секретаз дибензазепін (DBZ) (van Es, J. H. et al. *Nature* 435, 959-63 (2005); Milano, J. et al. *Toxicol Sci* 82, 341-58 (2004)) робить такий же вплив на розростання HUVEC. Беручи до уваги, що ці дві обробки діють по різних механізмах, слід зазначити, що значний рівень проростання явно зумовлений ослабленням передачі сигналу Notch. Ki67-зabarвлювання показало, що посилене проростання ЕК викликане підвищенням рівня проліферації клітин (фіг. 7b). У вихідному аналізі, проведеному у фібриновому гелі, розростання HUVEC і наступне утворення порожнин підтверджували шляхом спільного культивування із клітинами SF. При заміні клітин SF кондиціонованим середови-

щем, анти-DLL4 Mab і DBZ ще мали здатність підсилювати розростання HUVEC (фіг. 1c), що підтверджує автономну роль ЕК у передачі сигналу DLL4/Notch. У зворотному експерименті, активація Notch іммобілізованим білком DLL4 приводила до значного інгібування росту клітин (фіг. 7e). Ці результати дозволяють припустити, що стан активації передачі сигналу DLL4/Notch тісно пов'язаний із проліферацією ЕК.

Приклад 6: Обробка анти-DLL4-антитілом приводить до підвищення рівня проліферації ендотеліальних клітин *in vivo*

У сітківці мишей відразу після народження розвивається стереотипичний судинний малюнок у добре визначеній послідовності подій (Stone, J. & Dreher, Z. *J Comp Neurol* 255, 35-49 (1987); Gerhardt, H. et al. *J. Cell Biol.* 161, 1163-77 (2003); Frattiger, M. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43, 522-7 (2002)). Явно виражена й динамічна експресія DLL4 у зростаючих ЕК у сітківці новонароджених мишей дозволяє припустити про можливу роль DLL4 у регуляції розвитку судин сітківки (Claxton, S. & Frattiger, M. *Gene Expr Patterns* 5, 123-7 (2004)). Системна доставка YW26.82 приводила до значної зміни судинної мережі сітківки. У сітківці відбувалася масивна акумуляція ЕК, у результаті чого утворювалася складчаста структура із примітивною судинною морфологією (фіг. 7d). В ЕК спостерігалось значне збільшення інтенсивності Ki67-мічення, що вказує на посилення проліферації ЕК (фіг. 7h). Тому такий гіперпроліферативний фенотип ЕК сітківки після блокади DLL4 у новонароджених мишей підтвердив дані *in vitro*.

Приклад 7: Основна роль DLL4/Notch у регуляції проліферації епітеліальних клітин

VEGF регулює кілька фундаментальних процесів в ЕК (Ferrara, N. *Exs*, 209-31 (2005); Coultas, L. et al. *Nature* 438, 937-45 (2005)). Однак, у цьому зв'язку не дуже зрозуміло, яким чином сигнали VEGF інтегруються в складних процесах утворення судин, таких як артеріофенозна (AV) диференціація й ієрархічна судинна організація, тобто події, які, як очевидно, вимагають додаткових у високому ступені скоординованих шляхів передачі сигналу. Генетичні дослідження, проведені на риби зебри, дають підставу припустити, що VEGF діє перед каскадом реакцій Notch під час артеріальної ендотеліальної диференціації (Lawson, N. D. et al. *Development* 128, 3675-83 (2001)). Авторами даного винаходу було виявлено, що VEGF-стимуляція HUVEC приводить до підвищення рівня поверхневої експресії DLL4 (дані не приводяться), що відповідає недавно висловленому повідомленню про активацію мРНК DLL4 за допомогою VEGF-стимуляції (Patel, N. S. et al. *Cancer Res* 65, 8690-7 (2005)). Цікаво відзначити, що сам DLL4 активується після активації Notch (фігура 12), що дає підставу припустити про існування механізму позитивного зворотного зв'язку, завдяки якому DLL4 ефективно передає сигнал VEGF на шлях Notch. Коротко, HUVEC стимулювали іммобілізованим С-кінцевим His-міченим людським DLL4 (амінокислоти 1-404) за відсутності або в присутності DBZ (0,08 мкМ). Через 36 годин після стимуляції, ендегенну експресію DLL4 оцінювали за допомогою

FACS-аналізу, проведеного з використанням анти-DLL4-антитіла.

Слід зазначити, що гіперпроліферація ЕК, що виникає в результаті блокування передачі сигналу Notch, все-таки залежить від VEGF. У культурі тривимірного фібринового гелю, обробка анти-VEGF Mab приводить до припинення значного рівня розростання ЕК у присутності або за відсутності DBZ (фіг. 7f), що підвищує ймовірність того, що гіперпроліферативна поведінка може бути зумовлена посиленням сигналу VEGF. Дійсно, блокування Notch під дією YW26.82 або DBZ приводить до активації VEGFR2 (фіг. 7g). І навпаки, активація Notch під дією іммобілізованого DLL4 придушує експресію VEGFR2 (фіг. 7g). Тому хоча VEGF може діяти перед проходженням каскаду реакцій DLL4/Notch, однак DLL4/Notch здатний до тонкого настроювання відповіді за допомогою негативної регуляції експресії VEGFR2.

Приклад 8: Обробка анти-DLL4-антитілом блокує диференціювання ендотеліальних клітин і розвиток артерій

Крім підвищення рівня проліферації ЕК, антагоністична дія DLL4/Notch приводить до різкої морфологічної зміни відростків ЕК у фібриновому гелі. Багатоклітинні порожнина-подібні структури, в основному, були відсутні (фіг. 8a), що дозволяє припустити про порушення диференціювання ЕК. У сітківках, оброблених моноклональним антитілом Mab YW26.82, характерна картина радіально чергованих артерій і вен була в значній мірі порушена. Забарвлювання антитілом проти  $\alpha$ -актину гладкого м'яза (ASMA), яке асоціюється з артеріями сітківки, повністю було відсутнє (фіг. 8c). Таке спостереження дуже нагадувало порушення розвитку артерій в DLL4<sup>-/-</sup>-ембріонів. Ці дані, із всіх точок зору, підтверджують, що DLL4/Notch відіграє головну роль у регуляції диференціювання ЕК.

Приклад 9: Експресія TFGE асоціюється з активованим станом Notch

Аналогічно каскаду реакцій Notch, передача сигналу TGF $\beta$  залежить від його оточення й робить різні й часто протилежні дії на інгібування диференціювання, проліферації й росту клітин. Крім того, каскад реакцій TGF $\beta$  бере участь у процесах розвитку судин (Orness, L. D. et al., Nat Genet 26, 328-31 (2000); Oshima, M. et al., Dev Biol 179, 297-302 (1996); Larsson, J. et al. Embo J 20, 1663-73 (2001)). Так, наприклад, дефіцит кінази 1, подібної до рецептора активіна (ALK1), тобто специфічного рецептора TGF $\beta$  типу I ЕК, приводить до утворення примітивної сітчастої структури ЕК у жовчоточних мішках і до недостатньої артеріовенозної функції (AVM), тобто загального фенотипу, властивого мишам з порушенням передачі сигналу Notch (Orness, L. D. et al., Nat Genet 26, 328-31 (2000); Iso, T. et al., Arterioscler Thromb Vase Biol 23, 543-53 (2003)). Це наштовхнуло авторів даного винаходу на думку про дослідження можливого взаємозв'язку між цими двома каскадами реакцій. Авторами даного винаходу було виявлено, що експресія TGF $\beta$ 2 (фіг. 8b) безпосередньо пов'язана з активованим станом Notch, що дозволяє припустити, що каскад реакцій TGF $\beta$  може проходити після каскаду реакцій Notch. У цілому, дані, отри-

мані авторами даного винаходу, підтверджують модель, у якій система DLL4/Notch, що служить як «лінія передачі сигналу», інтегрує сигнали VEGF за допомогою регуляції експресії DLL4 і спрямовує TGF $\beta$ -шлях на стимуляцію диференціювання ЕК.

Приклад 10: Обробка анти-DLL4-антитілом інгібує ріст пухлини in vivo

Для повного виявлення можливої ролі передачі сигналу DLL4/Notch у процесі ангиогенезу пухлини, авторами даного винаходу був досліджений вплив блокування DLL4 на ріст пухлини в преклінічних моделях пухлини (фіг. 9a-d). У моделях із ксенотрансплантатами пухлин HM7, Colo205 і Calu6 (фіг. 9a-c), обробка антитілом YW26.82 була ініційована після стабільного розвитку пухлини (після досягнення розміру пухлини  $\geq 250$  мм<sup>3</sup>). У всіх трьох моделях, розходження у швидкостях росту пухлини в контрольній групі й груп обробки ставало помітним через три дні після введення дози. Об'єм пухлини в групі обробки залишався незмінним протягом двотижневої обробки. Крім підшкірних пухлин, анти-DLL4 Mab також інгібувало ріст пухлин у жировому тілі мишачої молочної залози. У моделі пухлини MDA-MB-435, обробку починали через 14 днів після ін'єкції пухлинних клітин. Розходження кривих росту пухлин у контрольній групі й у груп обробки спостерігалось через шість днів після введення дози й ставало усе більше помітним у міру продовження обробки (фіг. 9d).

Авторами даного винаходу був також досліджений вплив блокування DLL4 і/або VEGF на ріст великої кількості пухлин у преклінічних моделях пухлин (фіг. 9e-f; i-p). У моделях ксенотрансплантата пухлин MV-522 і WENI3, обробка антитілом YW26.82 і/або анти-VEGF-антитілом була ініційована після стабільного розвитку пухлини (після досягнення розміру пухлини  $\geq 250$  мм<sup>3</sup>). У моделі MV-522, обробка антитілом YW26.82 і анти-VEGF-антитілом приводила до інгібування росту окремих пухлин, комбінація із двох обробок давала ще більший ефект. У моделі WENI3, обробка анти-VEGF-антитілом не робила якого-небудь впливу на ріст пухлини, обробка антитілом YW26.82 приводила до значного інгібування росту пухлини. У моделі SK-OV-3X1, LL2, EL4, H1299, SKMES-1, MX-1, SW620 і LS174T, обробка антитілом YW26.82 (5 мг/кг, i.p., два рази на тиждень) і/або обробка анти-VEGF-антитілом (5 мг/кг, i.p., два рази на тиждень) була проведена після стабільного розвитку пухлин. У кожній із цих моделей, обробка одним антитілом YW26.82 приводила до інгібування росту пухлини. Крім того, у всіх моделях, у яких була протестована вказана комбінація, антитіло YW26.82 виявляло підвищену ефективність у комбінації з анти-VEGF-антитілом.

Приклад 11: Обробка анти-DLL4-антитілом приводить до посилення проліферації пухлинних ендотеліальних клітин

У дослідженнях на інгібування росту пухлини авторами даного винаходу була використана модель пухлини мишачої лімфоми EL4 для гістологічного аналізу судинної системи. Авторами даного винаходу було виявлено, що обробка анти-DLL4 Mab приводить до різкого збільшення щільності



ендотеліальних клітин (фіг. 9g). На противагу цьому, анти-VEGF-антитіло дає абсолютно протилежний ефект (фіг. 9g), хоча обидві ці обробки виявляють аналогічну ефективність у цій моделі.

Приклад 12: Обробка анти-DLL4-антитілом приводить до інгібування перфузії судинної системи пухлини

Оскільки *in vitro* блокування каскаду реакцій DLL4/Notch погіршує утворення порожнина-подібної структури ендотеліальними клітинами (фіг. 8a), то було проведене дослідження для того, щоб визначити, чи викликає обробка анти-DLL4 Mab аналогічне порушення судинної системи пухлини й чи впливає вона на ефективне надходження крові. Системна перфузія Фітц-Лектином показала, що обробка анти-DLL4 Mab приводить до значного зниження рівня мічення пухлинних судин лектином (фіг. 9h). Слід зазначити, що, як було показано, порушення артеріовенозної (AV) функції в ALK1-дефіцитних мишей приводить до порушення кровообігу (Urness, L. D. et al., Nat Genet 26, 328-31 (2000)). Беручи до уваги важливу роль передачі сигналу DLL4/Notch в AV-диференціації, слід зазначити, що в сітківці ембріонів і новонароджених мишей, анти-DLL4 Mab може впливати на конкретні події життєвого циклу пухлинних ЕК і викликати порушення спрямованого кровотоку. Дійсно, у пухлинах Colo205, оброблених анти-DLL4 Mab, є області, де висока густина ЕК асоціюється з низьким вмістом життєздатних пухлинних клітин, що зумовлено слабкою судинною функцією. Для переважного розуміння природи конкретних судинних порушень були проведені додаткові дослідження із застосуванням методів візуалізації судинної системи.

Приклад 13: DLL4/Notch не відіграє важливої ролі в гомеостазі мишачої тонкої кишки

Беручи до уваги плейотропну роль передачі сигналу Notch у регуляції гомеостазу самовідновлювальних систем у немовлят, основна проблема загального інгібування Notch полягає в тому, що таке інгібування може мати негативний ефект. Так, наприклад, передача сигналу Notch необхідна для збереження недиференційованих клітин-попередників крипти в тонкому кишечнику (van Es, J. H. et al. Nature 435, 959-63 (2005); Fre, S. et al. Nature 435, 964-8 (2005)). Дійсно, інгібітори  $\gamma$ -

секретази, які повинні без всякого розходження блокувати всі активності Notch, викликають небажані побічні ефекти в гризунів, що зумовлено збільшенням маси бокаловидних клітин у компартменті крипти (Milano, J. et al. Toxicol Sci 82, 341-58 (2004); Wong, G. T. et al. J. Biol. Chem 279, 12876-82 (2004)). Авторами даного винаходу були проведені імуногістохімічні аналізи тонкого кишечника мишей, оброблених анти-DLL4 Mab. На відміну від DBZ-обробки, яких-небудь розходжень у профілях диференціювання або проліферації епітеліальних клітин крипти в груп, оброблених анти-DLL4 Mab, і в контрольній групі після 6-тижневої обробки, не спостерігалось (фіг. 10). Крім того, анти-DLL4 Mab не робило впливу на експресію гена-мішені Notch для HES-1 у популяції (TA), яка швидко ділиться й тимчасово ампліфікується (фіг. 10). Ці результати підтверджують думку, що передача сигналу DLL4/Notch у значній мірі залежить від судинної системи.

Приклад 14: Обробка анти-DLL4-антитілом не впливає на судинну мережу сітківки дорослих мишей

Хоча блокування DLL4 впливає на розвиток судинної системи сітківки в новонароджених мишей, однак введення анти-DLL4-антитіла не робило помітного впливу на судинну систему сітківки дорослої тварини (фіг. 8d). Таким чином, передача сигналу DLL4/Notch відіграє вирішальну роль у процесі активного ангиогенезу, однак вона відіграє менш важливу роль у підтримці нормальної судинної системи. На підтвердження цієї думки, можна відзначити, що в процесі обробки анти-DLL4 Mab, якої-небудь помітної втрати маси або загибелі мишей з пухлиною, яким вводили дозу 10 мг/кг два рази на тиждень протягом 8 тижнів, не спостерігалось. У пухлинних моделях, анти-DLL4 Mab і анти-VEGF-антитіло робили протилежну дію на судинну систему пухлини, що дозволяє зробити припущення про існування механізмів їхньої дії, що не перекриваються.

Хоча представлений вище винахід докладно описаний на прикладах, які приводяться для ілюстрації й переважного розуміння даного винаходу, однак наведений вище опис винаходу й приклади його здійснення не повинні розглядатися як обмеження об'єму винаходу.

## ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> GENENTECH, INC.  
 YAN, Minhong  
 WU, Yan

<120> Анти-DLL4-антитіла і способи їх застосування

<130> P2336R1

<150> US 60/811,349  
 <151> 2006-06-06

<150> US 60/811,357  
 <151> 2006-06-06

<150> US 60/866,767  
 <151> 2006-11-21

<150> US 60/866,772  
 <151> 2006-11-21

<160> 78

<210> 1  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> послідовність антитіла

<400> 1  
 Gly Phe Thr Phe Thr Asp Asn Trp Ile Ser  
                                   5                                  10

<210> 2  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> послідовність антитіла

<400> 2  
 Gly Phe Ser Phe Arg Asp Asn Trp Ile Ser  
                                   5                                  10

<210> 3  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> послідовність антитіла

<400> 3  
 Gly Val Ile Asn Pro Asn Ser Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser  
   1                                  5                                  10                                  15

Val Lys Gly

125

94464

126

<210> 4  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> послідовність антитіла

<400> 4  
Gly Leu Ile Asn Pro Gln Ser Gly Ser Ser Asp Tyr Ala Asp Ser  
1 5 10 15  
Val Lys Gly

<210> 5  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> послідовність антитіла

<400> 5  
Gly Val Ile Asn Pro Asn Ser Gly Ala Thr Glu Tyr Ala Asp Ser  
1 5 10 15  
Val Lys Gly

<210> 6  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> послідовність антитіла

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

<210> 7  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> послідовність антитіла

<400> 7  
Gly Val Ile Asn Ser Ile Ser Gly Ala Thr Ala Tyr Ala Asp Ser  
1 5 10 15  
Val Lys Gly

<210> 8  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Штучна послідовність

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; послідовність антитіла

&lt;400&gt; 8

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

Val Lys Gly

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Штучна послідовність

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; послідовність антитіла

&lt;400&gt; 9

Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Asp	Asn	Phe	Gly	Gly	Tyr	Phe	Asp	Tyr
1				5					10					15

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Штучна послідовність

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; послідовність антитіла

&lt;400&gt; 10

Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Ser	Thr	Ala	Val	Ala
				5					10	

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Штучна послідовність

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; послідовність антитіла

&lt;400&gt; 11

Ser	Ala	Ser	Phe	Leu	Tyr	Ser
				5		

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Штучна послідовність

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; послідовність антитіла

&lt;400&gt; 12

Gln	Gln	Ser	Tyr	Thr	Thr	Pro	Pro	Thr
				5				

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Штучна послідовність

<220>  
<223> послідовність антитіла

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

<210> 14  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> послідовність антитіла

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

<210> 15  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> послідовність антитіла

<400> 15  
Gln Gln Ser Tyr Asn Gly Pro Ser Thr  
5

<210> 16  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> послідовність антитіла

<400> 16  
Gln Gln Ser Tyr Thr Gly Pro Ser Thr  
5

<210> 17  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> послідовність антитіла

<400> 17  
Gln Gln Trp Phe Ser Thr Ala Pro Thr  
5

<210> 18  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> послідовність антитіла

<400> 18

Gln Gln Ser Tyr Thr Gly Thr Val Thr  
5

<210> 19  
<211> 87  
<212> PRT  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> послідовність антитіла

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

<210> 20  
<211> 81  
<212> PRT  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> послідовність антитіла

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

<210> 21  
<211> 80  
<212> PRT  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> послідовність антитіла

133

94464

134

&lt;400&gt; 21

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

Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala  
 20 25 30

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

Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser  
 50 55 60

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

Val Thr Val Ser Ser  
 80

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 79

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Штучна послідовність

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; послідовність антитіла

&lt;400&gt; 22

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

Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala  
 20 25 30

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

Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser  
 50 55 60

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

Thr Val Ser Ser

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 87

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Штучна послідовність

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; послідовність антитіла

&lt;400&gt; 23

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

Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser  
 20 25 30

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg  
 35 40 45

135

94464

136

Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys  
50 55 60

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
65 70 75

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

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 81

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Штучна послідовність

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; послідовність антитіла

&lt;400&gt; 24

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

Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro  
20 25 30

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Arg Val Thr Ile Ser Val Asp  
35 40 45

Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala  
50 55 60

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

Leu Val Thr Val Ser Ser  
80

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 80

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Штучна послідовність

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; послідовність антитіла

&lt;400&gt; 25

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

Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro  
20 25 30

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Arg Val Thr Ile Ser Val Asp  
35 40 45

Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala  
50 55 60

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

Val Thr Val Ser Ser  
80



<210> 26  
 <211> 79  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> послідовність антитіла

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

<210> 27  
 <211> 87  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> послідовність антитіла

<400> 27  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly  
           1                  5                  10                  15  
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser  
                           20                  25                  30  
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Arg  
                           35                  40                  45  
 Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln  
                           50                  55                  60  
 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
                           65                  70                  75  
 Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
                           80                  85

<210> 28  
 <211> 81  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> послідовність антитіла

<400> 28  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly

139

94464

140

```

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
      80

```

```

<210> 29
<211> 80
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> послідовність антитіла

```

```

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

Val Thr Val Ser Ser
      80

```

```

<210> 30
<211> 79
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> послідовність антитіла

```

```

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

```

141

94464

142

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

Thr Val Ser Ser

<210> 31

<211> 87

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> послідовність антитіла

<400> 31

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys  
20 25 30

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

Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln  
50 55 60

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser  
65 70 75

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

<210> 32

<211> 81

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> послідовність антитіла

<400> 32

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala  
20 25 30

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp  
35 40 45

Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala  
50 55 60

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

Leu Val Thr Val Ser Ser  
80

<210> 33

<211> 80

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> послідовність антитіла

<400> 33

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

<210> 34

<211> 87

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> послідовність антитіла

<400> 34

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

<210> 35

<211> 81

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> послідовність антитіла

<400> 35

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly
1				5					10					15
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala

145

94464

146

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

&lt;210&gt; 36

&lt;211&gt; 80

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Штучна послідовність

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; послідовність антитіла

&lt;400&gt; 36

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

Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	
				20					25					30	

Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	
				35					40					45	

Thr	Ser	Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	
				50					55					60	

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

Val	Thr	Val	Ser	Ser											
				80											

&lt;210&gt; 37

&lt;211&gt; 79

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Штучна послідовність

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; послідовність антитіла

&lt;400&gt; 37

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

Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	
				20					25					30	

Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	
				35					40					45	

Thr	Ser	Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	
				50					55					60	

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

Thr Val Ser Ser

<210> 38  
 <211> 80  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> послідовність антитіла

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

<210> 39  
 <211> 80  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> послідовність антитіла

<400> 39  
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro  
 1 5 10 15  
 Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly  
 20 25 30  
 Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser  
 35 40 45  
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val  
 50 55 60  
 Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr  
 65 70 75  
 Lys Val Glu Ile Lys  
 80

- - -

<210> 40  
 <211> 80  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>

<223> послідовність антитіла

<400> 40

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

Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly  
20 25 30

Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
35 40 45

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu  
50 55 60

Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr  
65 70 75

Lys Val Glu Ile Lys  
80

<210> 41

<211> 80

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> послідовність антитіла

<400> 41

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

Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly  
20 25 30

Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser  
35 40 45

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu  
50 55 60

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

Lys Val Glu Ile Lys  
80

<210> 42

<211> 25

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> послідовність антитіла

<400> 42

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

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

<210> 43

152

```

<211> 13
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> послідовність антитіла

<400> 43
  Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
                5                      10

<210> 44
<211> 30
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> послідовність антитіла

<400> 44
  Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
    1                      5                      10                      15
  Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                20                      25                      30

<210> 45
<211> 11
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> послідовність антитіла

<400> 45
  Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
                5                      10

<210> 46
<211> 23
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> послідовність антитіла

<400> 46
  Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
    1                      5                      10                      15
  Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
                20

<210> 47
<211> 15
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> послідовність антитіла

<400> 47
  Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
    1                      5                      10                      15

```



154

```

<400> 48
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 1             5             10             15
Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Clu Asp Phe Ala Thr Tyr
                20             25             30
Tyr Cys

```

```
<400> 49
  Phe Gly Gln Gly Thr  Lys  Val  Glu  Ile  Lys
                   5          10
```

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

```

<400> 51
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
  1             5             10             15

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          20             25             30

```

155

94464

156

<210> 52  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> послідовність антитіла

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

<210> 53  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> послідовність антитіла

<400> 53  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val  
 1 5 10 15  
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser  
 20 25 30  
 Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys  
 35 40 45  
 Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser  
 50 55 60  
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile  
 65 70 75  
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln-Gln  
 80 85 90  
 Ser Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu  
 95 100 105  
 Ile Lys

<210> 54  
 <211> 114  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> послідовність антитіла

<400> 54  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly  
   1                  5                  10                  15  
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr  
                   20                  25                  30  
 Asp Asn Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
                   35                  40                  45  
 Glu Trp Val Gly Val Ile Asn Pro Asn Ser Gly Ala Thr Glu Tyr  
                   50                  55                  60  
 Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser  
                   65                  70                  75  
 Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp  
                   80                  85                  90  
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Asn Phe Gly Gly Tyr Phe  
                   95                  100                  105  
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
                   110

<210> 55  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> послідовність антитіла

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

Ile Lys Arg

<210> 56  
 <211> 114  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> послідовність антитіла

<400> 56  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly  
     1                    5                    10                    15  
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Arg  
                     20                    25                    30  
 Asp Asn Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
                     35                    40                    45  
 Glu Trp Val Gly Val Ile Asn Pro Asn Ser Gly Ser Thr Asp Tyr  
                     50                    55                    60  
 Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser  
                     65                    70                    75  
 Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp  
                     80                    85                    90  
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Asn Phe Gly Gly Tyr Phe  
                     95                    100                    105  
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
                     110

<210> 57  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> послідовність антитіла

<400> 57  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val  
     1                    5                    10                    15  
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser  
                     20                    25                    30  
 Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys  
                     35                    40                    45  
 Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser  
                     50                    55                    60  
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile  
                     65                    70                    75  
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln  
                     80                    85                    90

161

94464

162

Ser Val Asn Gly Pro Ala Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu  
                                   95                                  100                                  105

Ile Lys Arg

<210> 58

<211> 114

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> послідовність антитіла

<400> 58

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

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

Asp Asn Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
                                   35                                  40                                  45

Glu Trp Val Gly Tyr Ile Ser Pro Asn Ser Gly Phe Thr Tyr Tyr  
                                   50                                  55                                  60

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

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

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Asn Phe Gly Gly Tyr Phe  
                                   95                                  100                                  105

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
                                   110

<210> 59

<211> 108

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 59

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

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

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

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

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

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln

163

94464

164

80

85

90

Ser Tyr Thr Gly Thr Val Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu  
 95 100 105

Ile Lys Arg

<210> 60

<211> 6

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<220>

<221> Модифікована основа сигналу СААТ

<222> 2

<223> Основами є g, a, t або c

<400> 60

cncaat 6

<210> 61

<211> 6

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<220>

<221> Poly-A\_сигнал

<222> повнорозмірний

<223> Сигнал поліаденілювання

<400> 61

aataaa 6

<210> 62

<211> 21

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> кіРНК

<400> 62

caactgccct tatggctttt t 21

<210> 63

<211> 21

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> кіРНК

<400> 63

aaagccataa gggcagttgt t 21

<210> 64

<211> 21

<212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> кіРНК  
  
 <400> 64  
 caactgcct tcaatttcac t 21  
  
 <210> 65  
 <211> 21  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> кіРНК  
  
 <400> 65  
 tgaattgaa ggcagttgt t 21  
  
 <210> 66  
 <211> 21  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> кіРНК  
  
 <400> 66  
 tgaccaagat ctcaactact t 21  
  
 <210> 67  
 <211> 21  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> кіРНК  
  
 <400> 67  
 gtagttgaga tcttggtcat t 21  
  
 <210> 68  
 <211> 21  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> кіРНК  
  
 <400> 68  
 ggccaactat gcttgtgaat t 21  
  
 <210> 69  
 <211> 21  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> кіРНК  
  
 <400> 69  
 ttcacaagca tagttgcct t 21

<210> 70  
<211> 20  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Олігонуклеотидний праймер

<400> 70  
aagtcttgca aatgcagcta 20

<210> 71  
<211> 25  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Олігонуклеотидний праймер

<400> 71  
catcatcatt atcatcatca ttgtc 25

<210> 72  
<211> 29  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Олігонуклеотидний зонд

<400> 72  
aattcttgga aaagtggcaa gacaaaaat 29

<210> 73  
<211> 21  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Олігонуклеотидний праймер

<400> 73  
ctttccacca gcaggaagta g 21

<210> 74  
<211> 18  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Олігонуклеотидний праймер

<400> 74  
tgcagtccga ggtccttt 18

<210> 75  
<211> 28  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Олігонуклеотидний зонд

<400> 75



cgcatTTgat tttcatttcg acaacaga 28

<210> 76  
<211> 20  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Олігонуклеотидний праймер

<400> 76  
gaagatggtg atgggatttc 20

<210> 77  
<211> 19  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Олігонуклеотидний праймер

<400> 77  
gaaggtgaag gtcggagtc 19

<210> 78  
<211> 20  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Олігонуклеотидний зонд

<400> 78  
caagcttccc gttctcagcc 20

Клон #	H1								
	26	27	28	29	30	31	32	33	34
152.26	G	F	T	F	T	D	N	W	I
152.26.6	G	F	T	F	T	D	N	W	I
152.26.14	G	F	S	F	R	D	N	W	I
152.26.20	G	F	T	F	T	D	N	W	I
152.26.34	G	F	T	F	T	D	N	W	I
152.26.40	G	F	T	F	T	D	N	W	I
152.26.82	G	F	T	F	T	D	N	W	I

Клон #	H2																	
	49	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
152.26	G	V	I	N	P	N	S	G	S	T	D	Y	A	D	S	V	K	G
152.26.6	G	L	I	N	P	Q	S	G	S	S	D	Y	A	D	S	V	K	G
152.26.14	G	V	I	N	P	N	S	G	S	T	D	Y	A	D	S	V	K	G
152.26.20	G	V	I	N	P	N	S	G	A	T	E	Y	A	D	S	V	K	G
152.26.34	G	L	I	N	P	T	S	G	S	T	I	Y	A	D	S	V	K	G
152.26.40	G	V	I	N	S	I	S	G	A	T	A	Y	A	D	S	V	K	G
152.26.82	G	Y	I	S	P	N	S	G	F	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G

Клон #	H3															
	93	94	95	96	97	98	99	100	A	B	C	D	M	101	102	
152.26	V	Y	Y	C	A	R	D	N	F	G	G	Y	F	D	Y	
152.26.6	V	Y	Y	C	A	R	D	N	F	G	G	Y	F	D	Y	
152.26.14	V	Y	Y	C	A	R	D	N	F	G	G	Y	F	D	Y	
152.26.20	V	Y	Y	C	A	R	D	N	F	G	G	Y	F	D	Y	
152.26.34	V	Y	Y	C	A	R	D	N	F	G	G	Y	F	D	Y	
152.26.40	V	Y	Y	C	A	R	D	N	F	G	G	Y	F	D	Y	
152.26.82	V	Y	Y	C	A	R	D	N	F	G	G	Y	F	D	Y	

Клон #	L1												
	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34		
152.26	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A		
152.26.6	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A		
152.26.14	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A		
152.26.20	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A		
152.26.34	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A		
152.26.40	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A		
152.26.82	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A		

Fig. 1a

Клон #	L2						
	50	51	52	53	54	55	56
152.26	S	A	S	F	L	Y	S
152.26.6	S	A	S	F	L	Y	S
152.26.14	S	A	S	F	L	Y	S
152.26.20	S	A	S	F	L	Y	S
152.26.34	S	A	S	F	L	Y	S
152.26.40	S	A	S	F	L	Y	S
152.26.82	S	A	S	F	L	Y	S

Клон #	L3								
	89	90	91	92	93	94	95	96	97
152.26	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T
152.26.6	Q	Q	S	Y	T	G	Q	S	T
152.26.14	Q	Q	S	V	N	G	P	A	T
152.26.20	Q	Q	S	Y	N	G	P	S	T
152.26.34	Q	Q	S	Y	T	G	P	S	T
152.26.40	Q	Q	W	F	S	T	A	P	T
152.26.82	Q	Q	S	Y	T	G	T	V	T

Fig. 1b

I			
A	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT	-H1-	WVRQAPGQGLEWMG -H2-
B	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS	-H1-	WVRQAPGQGLEWM -H2-
C	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS	-H1-	WVRQAPGQGLEWM -H2-
D	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS	-H1-	WVRQAPGQGLEWM -H2-
II			
A	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVS	-H1-	WIRQPPGKGLEWIG -H2-
B	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVS	-H1-	WIRQPPGKGLEWI -H2-
C	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVS	-H1-	WIRQPPGKGLEWI -H2-
D	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVS	-H1-	WIRQPPGKGLEWI -H2-
III			
A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	-H1-	WVRQAPGKGLEWVS -H2-
B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV -H2-
C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV -H2-
D	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV -H2-
Акцептор			
A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK	-H1-	WVRQAPGKGLEWVS -H2-
B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV -H2-
C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV -H2-
Другий акцептор			
A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK	-H1-	WVRQAPGKGLEWVS -H2-
B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV -H2-
C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV -H2-
D	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV -H2-

Фиг. 2a

I			
A	RVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDТАVYYCAR	-H3-	WGQGTЛVTVSS SEQ ID NO.: 19
B	RVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDТАVYYCAR	-H3-	WGQGTЛVTVSS SEQ ID NO.: 20
C	RVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDТАVYYCA	-H3-	WGQGTЛVTVSS SEQ ID NO.: 21
D	RVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDТАVYYC	-H3-	WGQGTЛVTVSS SEQ ID NO.: 22
II			
A	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADТАVYYCAR	-H3-	WGQGTЛVTVSS SEQ ID NO.: 23
B	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADТАVYYCAR	-H3-	WGQGTЛVTVSS SEQ ID NO.: 24
C	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADТАVYYCA	-H3-	WGQGTЛVTVSS SEQ ID NO.: 25
D	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADТАVYYC	-H3-	WGQGTЛVTVSS SEQ ID NO.: 26
III			
A	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDТАVYYCAR	-H3-	WGQGTЛVTVSS SEQ ID NO.: 27
B	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDТАVYYCAR	-H3-	WGQGTЛVTVSS SEQ ID NO.: 28
C	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDТАVYYCA	-H3-	WGQGTЛVTVSS SEQ ID NO.: 29
D	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDТАVYYC	-H3-	WGQGTЛVTVSS SEQ ID NO.: 30
Акцептор			
A	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDТАVYYCSR	-H3-	WGQGTЛVTVSS SEQ ID NO.: 31
B	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDТАVYYCSR	-H3-	WGQGTЛVTVSS SEQ ID NO.: 32
C	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDТАVYYCS	-H3-	WGQGTЛVTVSS SEQ ID NO.: 33
Другий акцептор			
A	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDТАVYYCAR	-H3-	WGQGTЛVTVSS SEQ ID NO.: 34
B	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDТАVYYCAR	-H3-	WGQGTЛVTVSS SEQ ID NO.: 35
C	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDТАVYYCA	-H3-	WGQGTЛVTVSS SEQ ID NO.: 36
D	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDТАVYYC	-H3-	WGQGTЛVTVSS SEQ ID NO.: 37

Фиг. 2b

kv1 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC -L1- WYQQKPGKAPKLLIY -L2- GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP  
kv2 DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC -L1- WYLQKPGQSPQLLIY -L2- GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA  
kv3 EIVLTQSPGTLSTLSPGERATLSC -L1- WYQQKPGQAPRLLIY -L2- GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEP  
kv4 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC -L1- WYQQKPGQPPKLLIY -L2- GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQA

EDFATYYC -L3- FGQGTKVEIK SEQ ID NO.: 38  
EDVGVIYC -L3- FGQGTKVEIK SEQ ID NO.: 39  
EDFAVIYC -L3- FGQGTKVEIK SEQ ID NO.: 40  
EDVAVIYC -L3- FGQGTKVEIK SEQ ID NO.: 41

Fig. 3

Послідовності каркасної області легкого ланцюга huMAb4D5-8

LC-FR1 <sup>1</sup>Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys<sup>23</sup> (SEQ ID NO: 42)  
LC-FR2 <sup>35</sup>Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr<sup>49</sup>  
(SEQ ID NO: 43)  
LC-FR3 <sup>57</sup>Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys<sup>88</sup>  
(SEQ ID NO: 44)  
LC-FR4 <sup>98</sup>Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys<sup>107</sup> (SEQ ID NO: 45)

Послідовності каркасної області важкого ланцюга huMAb4D5-8

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

Fig. 4

Послідовності каркасної області легкого ланцюга huMAb4D5-8, модифіковані в положенні 66 (підкреслене)

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

Послідовності каркасної області важкого ланцюга huMAb4D5-8, модифіковані в положеннях 71, 73 і 78 (підкреслене)

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

### Fig. 5

#### Клон 26.20

VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTD<sup>N</sup>WISWVRQAPGKGLEWVGVINPNSGATEYADSV  
KGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDNFGGYFDYWGQGT<sup>L</sup>V (SEQ ID NO:54)

VL

DIQMTQSPSSLSASVGD<sup>R</sup>VTITCRASQDVSTAVAWYQQKPKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSG  
SGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQSYNGPSTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:55)

#### Клон 26.14

VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFRD<sup>N</sup>WISWVRQAPGKGLEWVGVINPNSGSTDYADSV  
KGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDNFGGYFDYWGQGT<sup>L</sup>V (SEQ ID NO:56)

VL

DIQMTQSPSSLSASVGD<sup>R</sup>VTITCRASQDVSTAVAWYQQKPKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSG  
SGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQSVNGPATFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:57)

#### Клон 26.82

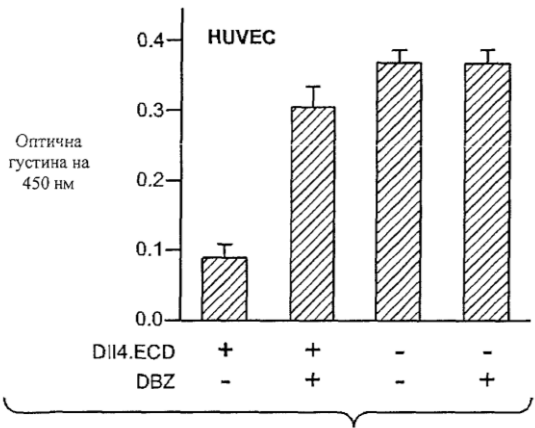
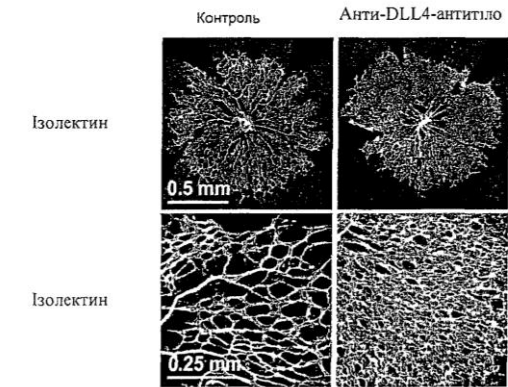
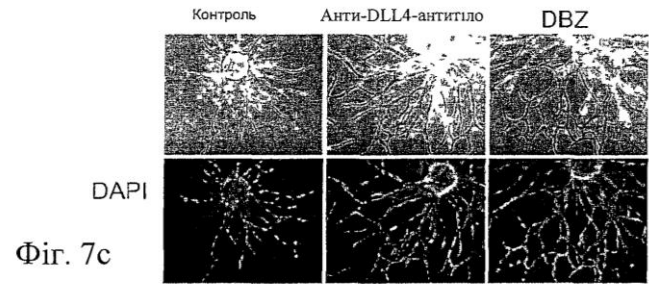
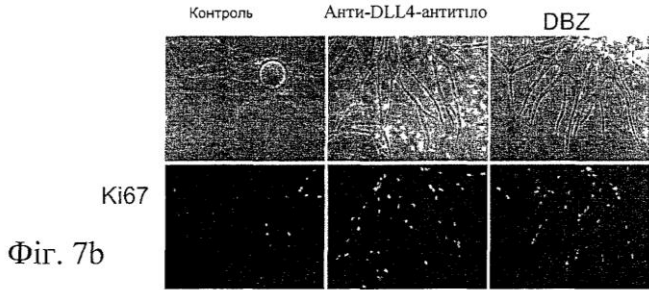
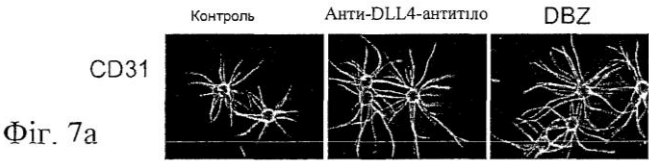
VH

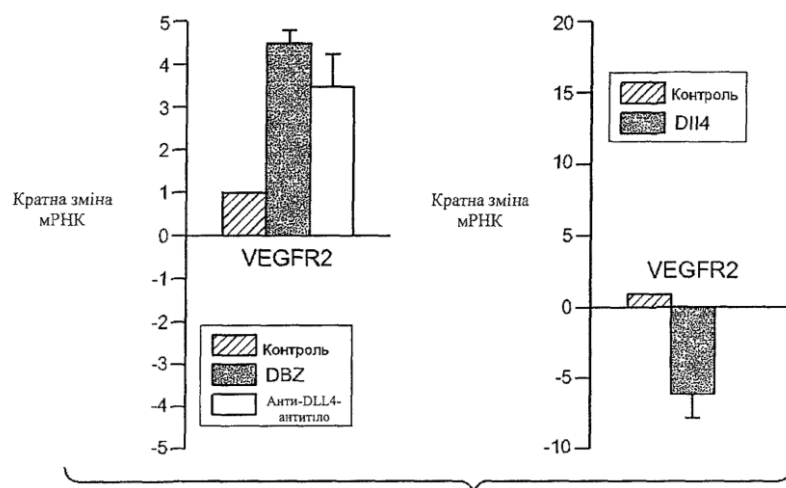
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTD<sup>N</sup>WISWVRQAPGKGLEWVG<sup>Y</sup>ISPN<sup>S</sup>SGFTYYADSV  
KGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDNFGGYFDYWGQGT<sup>L</sup>V (SEQ ID NO:58)

VL

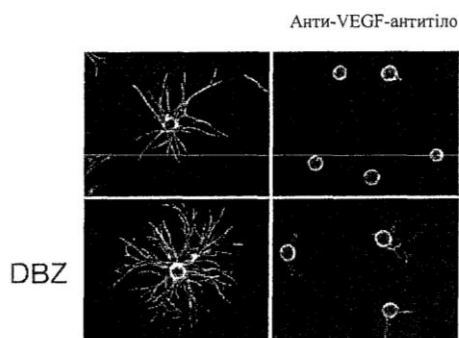
DIQMTQSPSSLSASVGD<sup>R</sup>VTITCRASQDVSTAVAWYQQKPKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSG  
SGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQSYTGT<sup>V</sup>TFTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:59)

### Fig. 6

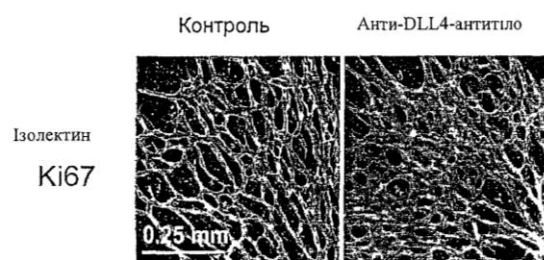




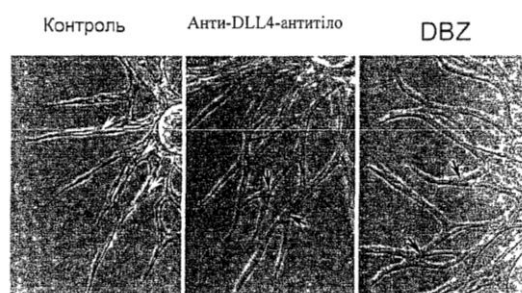
Фіг. 7g



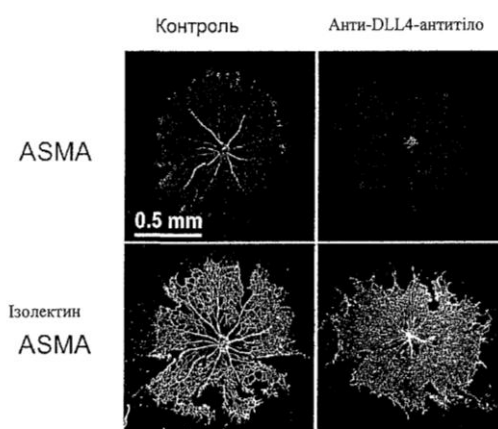
Фіг. 7f



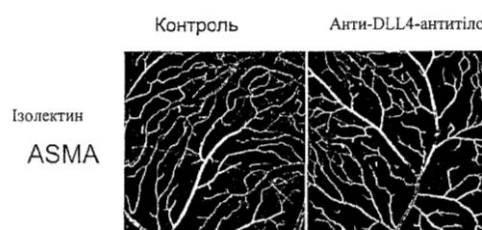
Фіг. 7h



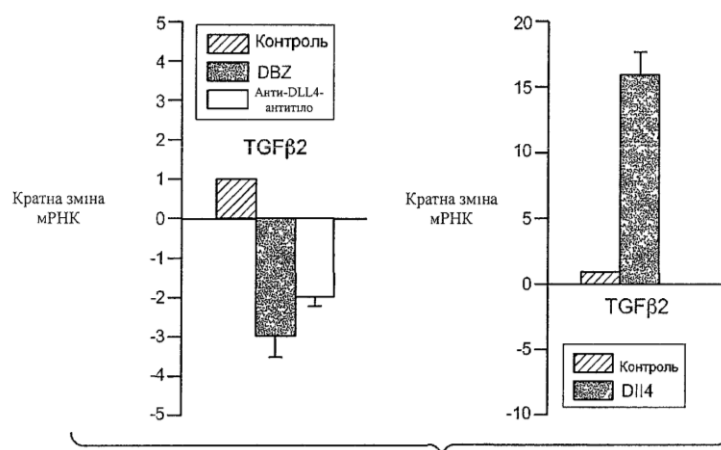
Фіг. 8a



Фіг. 8c

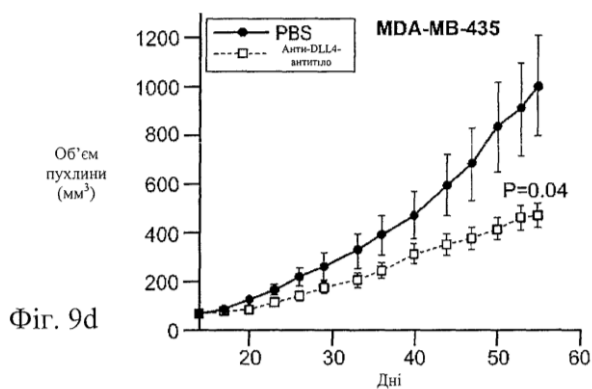
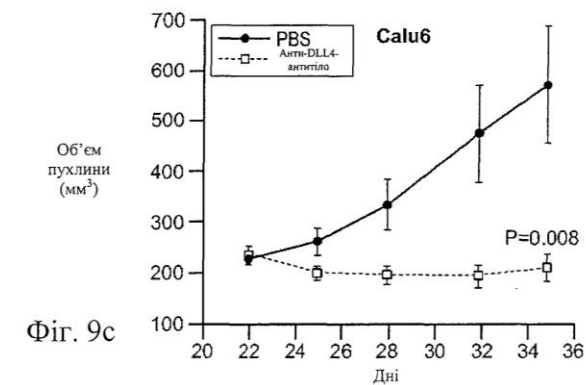
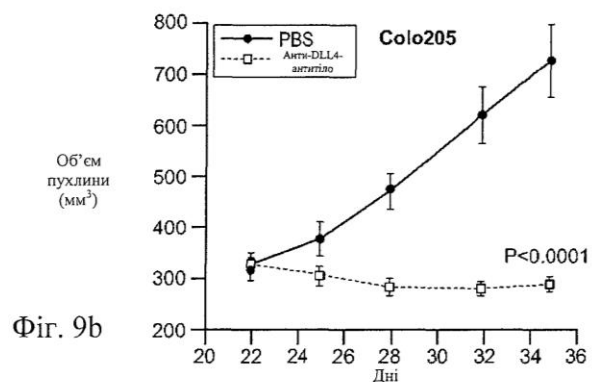
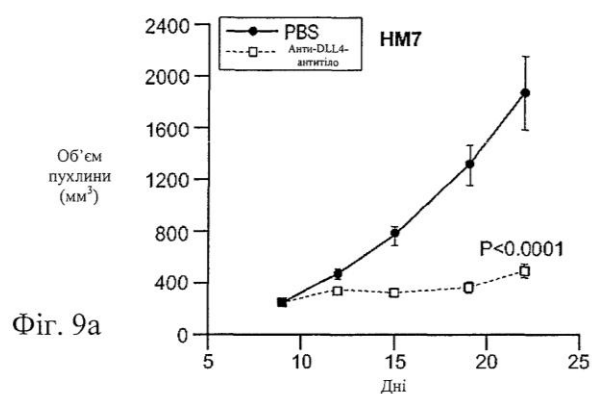


Фіг. 8d



Фіг. 8b





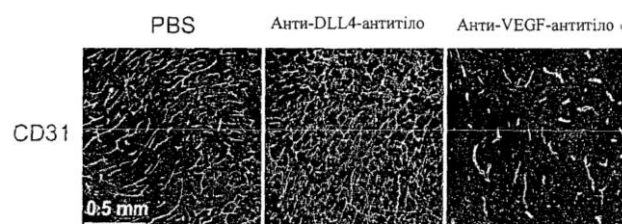
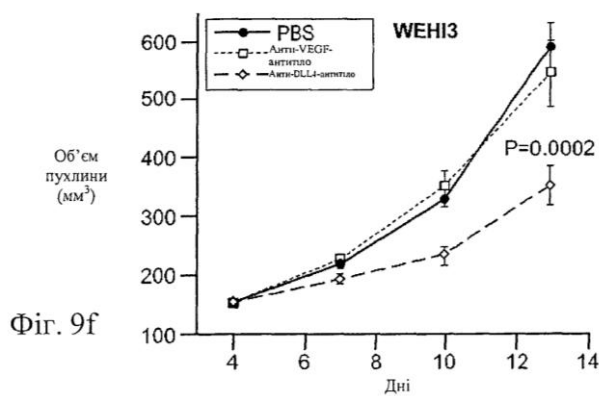
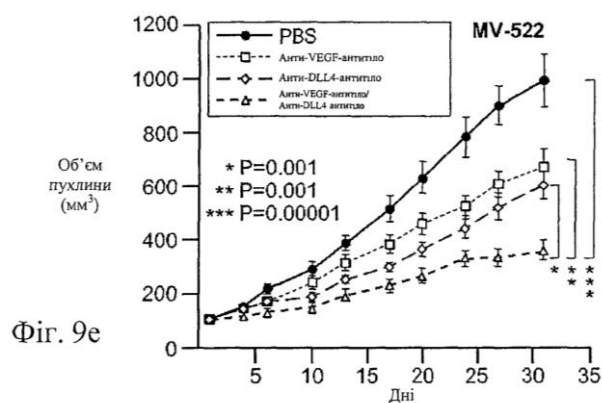


Fig. 9g

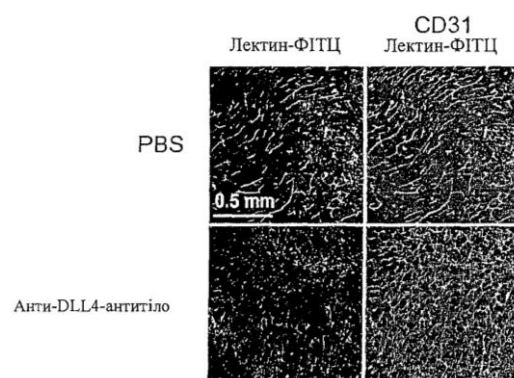
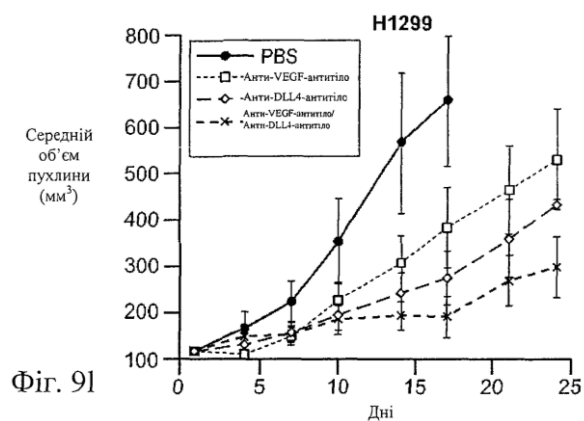
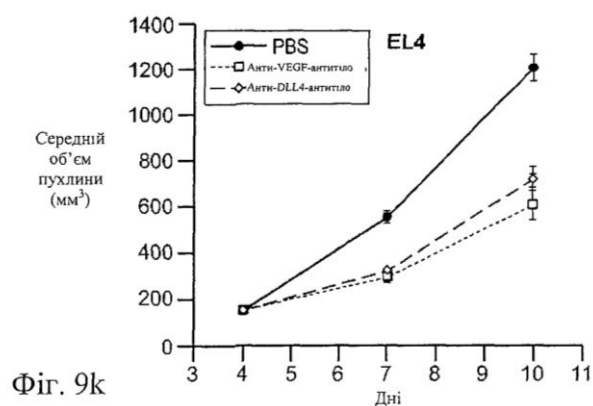
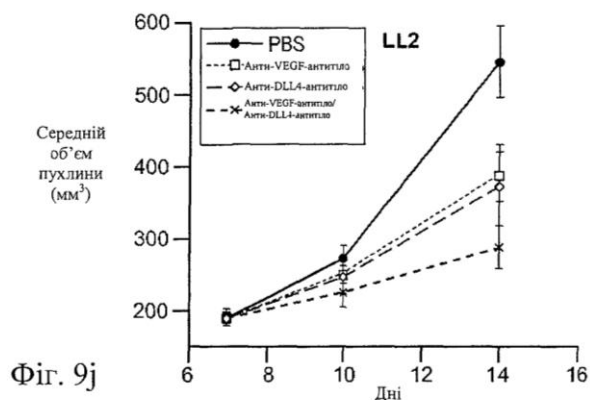
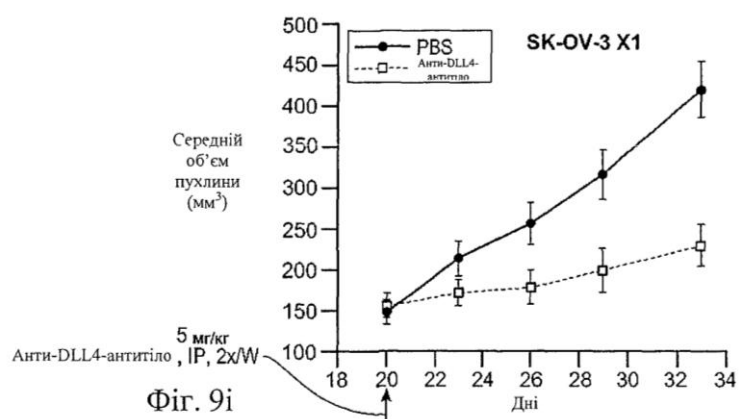
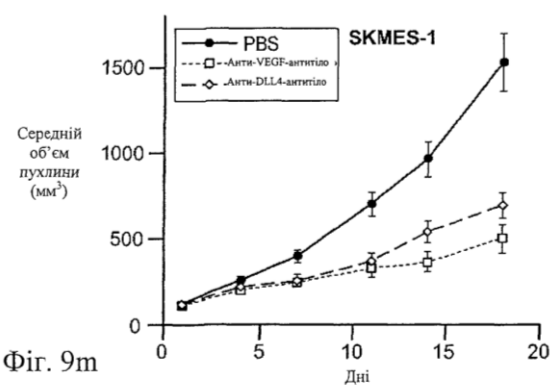
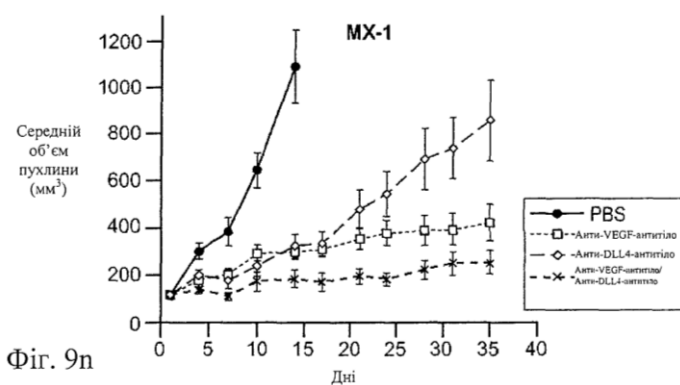


Fig. 9h

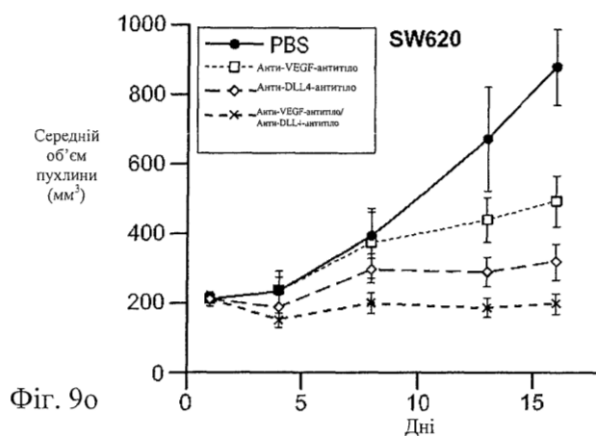




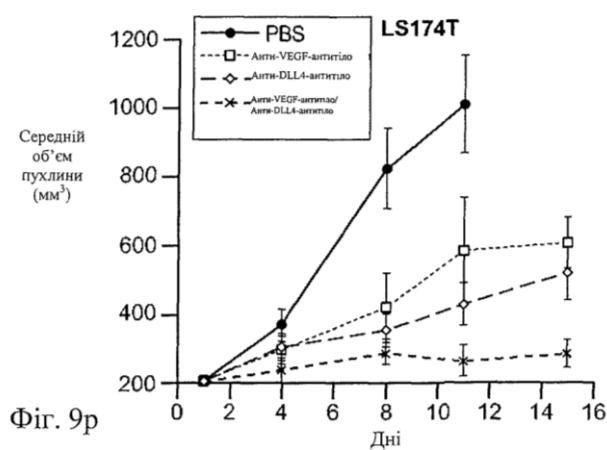
Фіг. 9m



Фіг. 9n



Фіг. 9o



Фіг. 9p

193

94464

194

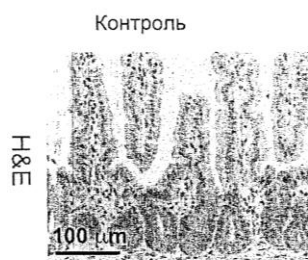


Fig. 10a

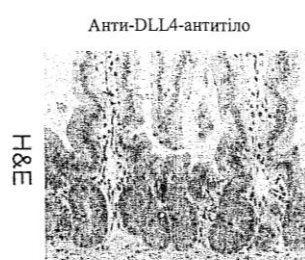


Fig. 10b

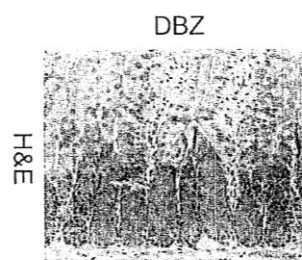


Fig. 10c

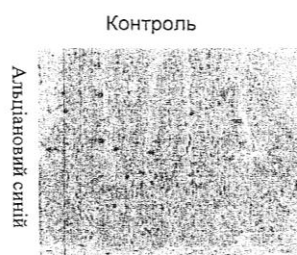


Fig. 10d

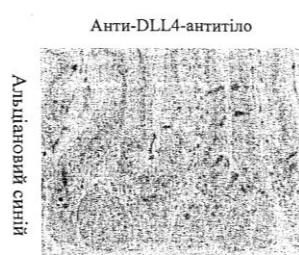


Fig. 10e

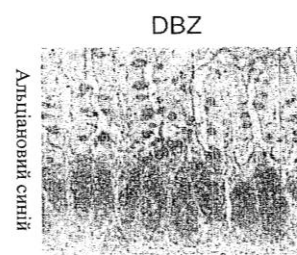


Fig. 10f



Fig. 10g

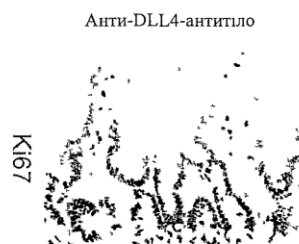


Fig. 10h

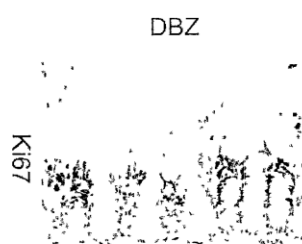


Fig. 10i

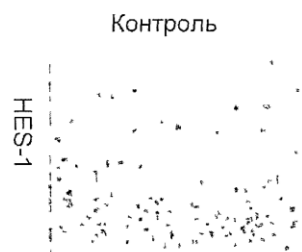


Fig. 10j

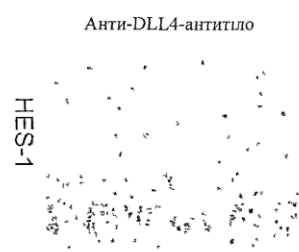
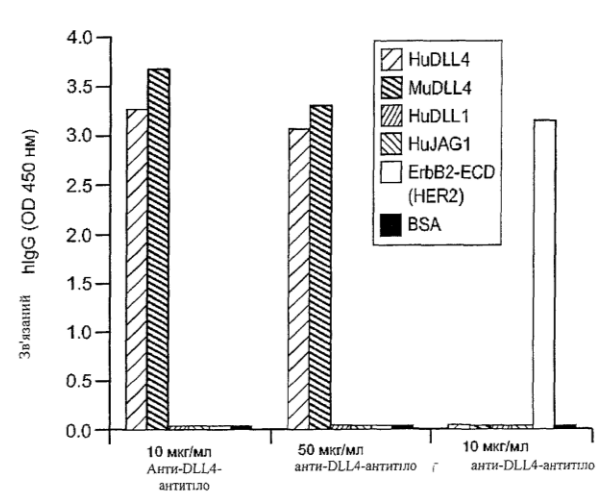
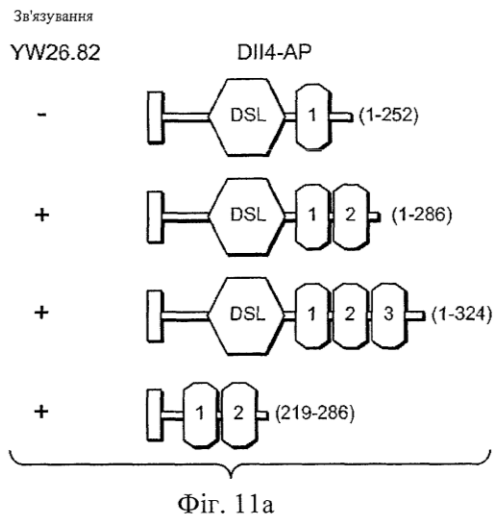


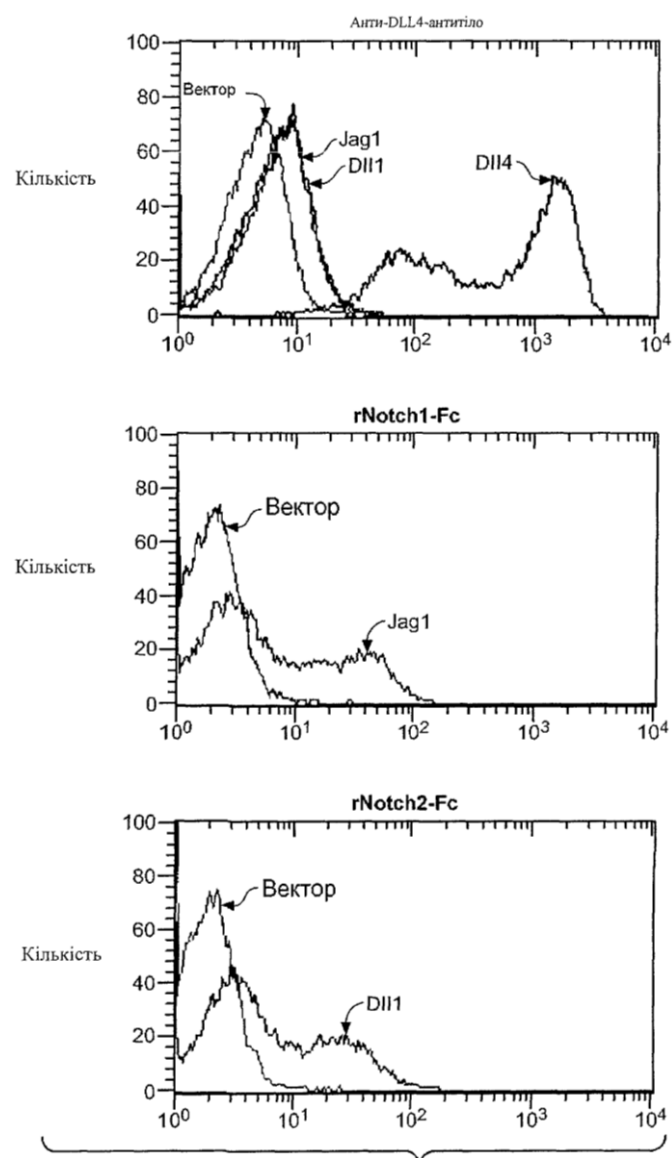
Fig. 10k



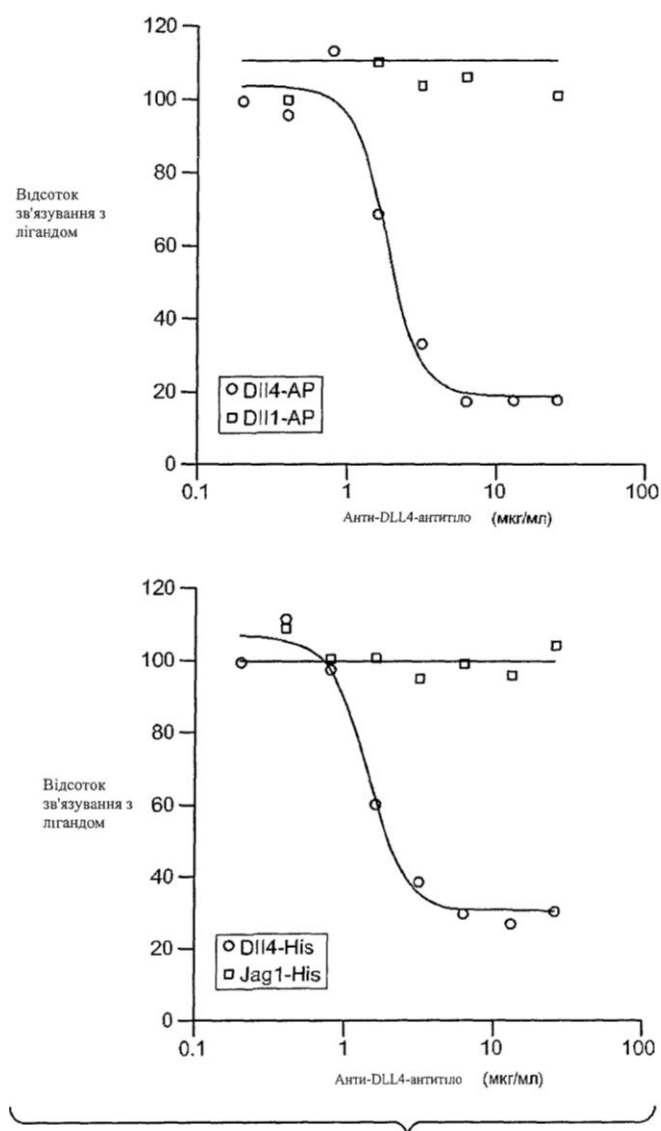
Fig. 10l



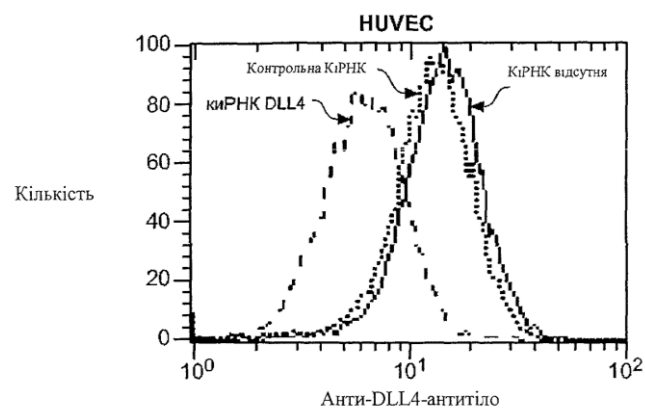
Фіг. 11b



Фиг. 11c



Фиг. 11d



Фиг. 11e



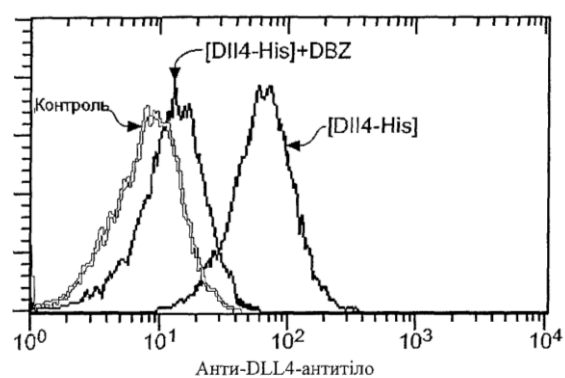


Fig. 12