



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **96139** (13) **C2**

(51) **МПК** (2011.01)
C07K 16/28 (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)
G01N 33/574 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) АНТИТІЛО ДО НЕЙРОПІЛІНУ-1 (NRP1)

1

2

(21) a200807262
(22) 08.11.2006
(24) 10.10.2011
(86) PCT/US2006/043516, 08.11.2006
(31) 60/734,798
(32) 08.11.2005
(33) US
(31) 60/820,561
(32) 27.07.2006
(33) US
(46) 10.10.2011, Бюл.№ 19, 2011 р.
(72) БОТТС РАЙАН ДЖ., US, У ЯНЬ, US
(73) ДЖЕНЕНТЕК, ІНК., US
(56) POZAS ESTHER ET AL: "Age-dependent effects of secreted semaphorins 3A, 3F, and 3E on developing hippocampal axons: In vitro effects and phenotype of Semaphorin 3A (-/-) mice" MOLECULAR AND CELLULAR NEUROSCIENCE, vol. 18, no. 1, July 2001 (2001-07), pages 26-43, XP002435741 ISSN: 1044-7431.
NASARRE PATRICK ET AL: "Semaphorin SEMA3F and VEGF have opposing effects on cell attachment and spreading." NEOPLASIA (NEW YORK), vol. 5, no. 1, January 2003 (2003-01), pages 83-92, XP002435742 ISSN: 1522-8002.
STEPHENSON JOHN M ET AL: "Neuropilin-1 is differentially expressed in myoepithelial cells and vascular smooth muscle cells in preneoplastic and neoplastic human breast: A possible marker for the progression of breast cancer" INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, vol. 101, no. 5, 10 October 2002 (2002-10-10), pages 409-414, XP002435743 ISSN: 0020-7136.
LI MIN ET AL: "Pancreatic carcinoma cells express neuropilins and vascular endothelial growth factor, but not vascular endothelial growth factor receptors" CANCER, vol. 101, no. 10, 15 November 2004 (2004-11-15), pages 2341-2350, XP002435744 ISSN: 0008-543X.

TORDJMAN RAFAELE ET AL: "A neuronal receptor, neuropilin-1, is essential for the initiation of the primary immune response" NATURE IMMUNOLOGY, vol. 3, no. 5, May 2002 (2002-05), pages 477-482, XP002435745 ISSN: 1529-2908.

GU CHENGHUA ET AL: "Neuropilin-1 conveys semaphorin and VEGF signaling during neural and cardiovascular development." DEVELOPMENTAL CELL, vol. 5, no. 1, July 2003 (2003-07), pages 45-57, XP002435746 ISSN: 1534-5807.

MATTHIES A M ET AL: "Neuropilin-1 participates in wound angiogenesis" AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY, PHILADELPHIA, PA, US, vol. 160, no. 1, January 2002 (2002-01), pages 289-296, XP002295429 ISSN: 0002-9440.

NASARRE PATRICK ET AL: "Semaphorin SEMA3F has a repulsing activity on breast cancer cells and inhibits E-cadherin-mediated cell adhesion" NEOPLASIA (NEW YORK), vol. 7, no. 2, February 2005 (2005-02), pages 180-189, XP009084412 ISSN: 1522-8002.

(57) 1. Антитіло до нейропіліну-1 (NRP1), що специфічно зв'язується з NRP1, де антитіло включає варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить CDRL1, що включає амінокислотну послідовність RASQYFSSYLA (SEQ ID NO:129), CDRL2, що включає амінокислотну послідовність GASSRAS (SEQ ID NO:130), і CDRL3, що включає амінокислотну послідовність QQYLGSPPT (SEQ ID NO:131), та варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить CDRH1, що включає амінокислотну послідовність GFTFSSYAMS (SEQ ID NO:132), CDRH2, що включає амінокислотну послідовність SQISPAGGYTNYADSVKG (SEQ ID NO:133), і CDRH3, що включає амінокислотну послідовність ELPYYRMSKVM DV (SEQ ID NO:134).

2. Антитіло до нейропіліну-1 (NRP1), що специфічно зв'язується з NRP1, за п. 1, що включає варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:5, і варіабельну

(19) **UA** (11) **96139** (13) **C2**

ділянку важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYAMSWVRQA PGKGLEWVSLQ ISPAGGYTNY ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCARGEL PYYRMSKVMD VWGQGTSLTVSS.

3. Антитіло за п. 2, що являє собою антитіло YW107.4.87.

4. Антитіло за будь-яким з пп. 1-3, де антитіло має здатність зв'язуватися як з мишачим NRP1, так і з людським NRP1.

5. Антитіло за будь-яким з пп. 1-3, де антитіло являє собою моноклональне антитіло.

6. Антитіло за будь-яким з пп. 1-3, де антитіло являє собою біспецифічне антитіло.

7. Антитіло за будь-яким з пп. 1-3, де антитіло являє собою гуманізоване антитіло.

8. Антитіло за будь-яким з пп. 1-3, де антитіло являє собою людське антитіло.

9. Антитіло за будь-яким з пп. 1-3, де антитіло являє собою синтетичне антитіло.

10. Застосування антитіла до NRP1 за будь-яким з пп. 1-9 для приготування лікарського засобу, призначеного для лікування або попередження порушення, асоційованого з патологічним ангиогенезом у ссавця.

11. Застосування за п. 10, де порушення являє собою рак.

12. Застосування за п. 11, де рак вибирають із групи, що включає рак молочної залози, колоректальний рак, недрібноклітинний рак легені, неходжкінську лімфому (NHL), нирковий рак, рак передміхурової залози, рак печінки, рак голови та шиї, меланому, рак яєчника, мезотеліому, множинну мієлому і гліобластому.

13. Застосування за п. 12, де лікування додатково включає застосування другого терапевтичного агента.

14. Застосування за п. 13, де другий терапевтичний агент являє собою агент, вибраний із групи, що включає антиангіогенний агент, антинеопластичну композицію, хімотерапевтичний агент і цитотоксичний агент.

15. Застосування за п. 14, у якому антиангіогенний агент являє собою антагоніст VEGF.

16. Застосування за п. 15, у якому антагоніст VEGF являє собою антитіло до hVEGF.

17. Застосування за п. 16, у якому антитіло до hVEGF має здатність зв'язуватися з тим же самим епітопом VEGF, що і антитіло A4.6.1.

18. Застосування за п. 17, у якому антитіло до hVEGF являє собою бевасизумаб або ранібізумаб.

19. Застосування за п. 13, у якому другий терапевтичний агент являє собою інгібітор рецептора тирозинкінази, вибраний із групи, що включає ваталаніб (PTK787), ерлотиніб (TARCEVA®), OSI-7904, ZD6474 (ZACTIMA®), ZD6126 (ANG453), ZD1839, сунітиніб (SUTENT®), семаксаніб (SU5416), AMG706, AG013736, іматиніб (GLEEVEC®), MLN-518, CEP-701, PKC-412, лапатиніб (GSK572016), VELCADE®, AZD2171, сорафеніб (NEXAVAR®), XL880 і CHIR-265.

20. Полінуклеотид, що кодує антитіло до NRP1 за будь-яким з пп. 1-9.

21. Спосіб одержання антитіла до NRP1, що включає експресування вектора, що забезпечує експресію антитіла до NRP1, що включає полінуклеотид за п. 20, в придатній клітині-хазяїні.

22. Спосіб за п. 21, що додатково включає вилучення антитіла до NRP1.

23. Фармацевтична композиція, призначена для лікування порушень, асоційованих з патологічним ангиогенезом, що містить фармацевтично ефективну кількість антитіла до NRP1 за будь-яким з пп. 1-9 і фармацевтично прийнятні допоміжні речовини.

24. Набір для діагностування та лікування порушень, асоційованих з патологічним ангиогенезом, що містить фармацевтично ефективну кількість антитіла до NRP1 за будь-яким з пп. 1-9 і фармацевтично прийнятні допоміжні речовини.

25. Спосіб інгібування зв'язування NRP1 із VEGF у суб'єкта, що включає введення фармацевтично ефективної кількості антитіла до NRP1 за будь-яким з пп. 1-9, внаслідок чого антитіло до NRP1 інгібує зв'язування NRP1 із VEGF.

26. Спосіб за п. 25, де суб'єктом є пацієнт, у якого діагностовано порушення, асоційоване з патологічним ангиогенезом.

27. Спосіб виявлення білка NRP1 в зразку, що включає стадії введення в контакт зразка з антитілом до NRP1 за будь-яким з пп. 1-9, і виявлення зв'язування антитіла до NRP1 з білком NRP1.

28. Спосіб за п. 27, в якому порушення являє собою рак.

Дана заявка являє собою непопередню заявку, що згідно 35 U.S.C. 119(e) посягає на пріоритет попередніх заявок сер. № 60/734798, поданої 8 листопада 2005 р., і сер. № 60/820561, поданої 27 липня 2006 р., повний зміст яких включено в даний опис як посилання.

Галузь техніки, до якої відноситься винахід

Даний винахід відноситься в цілому до композицій і способів, які впливають на різні види активності нейропіліну (NRP). Більше конкретно винахід відноситься до композицій і способів модуляції утворення й підтримки судин, опосередкованої рецептором нейропіліну-1 (NRP1). Даний винахід

відноситься також до способів скринінгу терапевтичних субстанцій, які можна застосовувати для попередження або лікування станів і захворювань, асоційованих з ангиогенезом.

Передумови створення винаходу

Розвиток судинної системи є основною умовою для багатьох фізіологічних і патологічних процесів. Для активно зростаючих тканин, таких як тканини ембріонів і пухлин, потрібне відповідне постачання кров'ю. Для задоволення цієї потреби в них продукуються проангіогенні фактори, які підсилюють формування й підтримку нових судин за допомогою процесу, що звичайно називають ангио-

генезом. Формування судин являє собою складний, але впорядкований біологічний процес, що включає всі або деякі з наступних стадій: а) проліферацію ендотеліальних клітин (ЕК) на основі існуючих ЕК або їх диференцировка із клітин-попередників; б) міграцію й злипання ЕК з утворенням структур, що мають форму тяжів; в) наступне утворення трубок (тубулогенез) із судинних струн з формуванням судин, що мають центральну порожнину; г) утворення відростків від існуючих тяжів або судин з формуванням вторинних судин; д) додаткове ремоделювання й реструктурування первинного судинного сплетіння; і е) рекрутмент пери-ендотеліальних клітин для оточення зовні (упакування) ендотеліальних трубок, що забезпечує підтримку судин і їхні модуляторні функції; такими клітинами є перичити для невеликих капілярів, гладеньком'язові клітини для великих судин і міокардіальні клітини у серці (Hanahan D. *Science* 277, 1997, сс. 48-50; Hogan B. L. I Kolodziej P. A. *Nature Reviews Genetics*. 3, 2002, сс. 513-523; Lubarsky B. i Krasnow M. A. *Cell*. 112, 2003, сс. 19-28).

У цей час встановлено, що ангиогенез бере участь у патогенезі різних порушень. До них відносяться щільні пухлини й метастази, атеросклероз, ретролентальна фіброплазія, гемангіоми, хронічне запалення, внутріочні неоваскулярні хвороби, такі як проліферативні ретинопатії, наприклад, пов'язана з діабетом ретинопатія, пов'язана з віком дегенерація жовтої плями (AMD), неоваскулярна глаукома, імунне відторгнення трансплантованої рогівкової тканини й інших тканин, ревматоїдний артрит і псоріаз (Folkman i in., *J. Biol. Chem.*, 267, 1992, сс. 10931-10934; Klagsbrun i in., *Annu. Rev. Physiol.* 53, 1991, сс. 217-239 i Garner A., «*Vascular diseases*», в: *Pathobiology of Ocular Disease. A Dynamic Approach*, під ред. Garner A., Klintworth GK., 2-ої изд., з Marcel Dekker, NY, 1994, сс. 1625-1710).

У випадку росту пухлини ангиогенез, імовірно, має вирішальне значення для переходу від гіперплазії до неоплазії й для забезпечення харчування, необхідного для росту й метастазування пухлини (Folkman i in., *Nature* 339, 1989, с. 58). Нео васкуляризація дозволяє здобувати пухлини перевагу з позицій росту й проліферативну автономію в порівнянні зі здоровими клітинами. Пухлина, як правило, починається з однієї аномальної клітини й у результаті проліферації може збільшуватися в розмірі тільки до декількох кубічних міліметрів через далекість від доступного капілярного ложа й може залишатися «дрімаючою» без подальшого росту й дисемінації протягом тривалого періоду часу. Деякі пухлинні клітини потім перемикаються на ангиогенний фенотип, що приводить до активації ендотеліальних клітин, які розростаються й дозрівають із утворенням нових капілярних кровоносних судин. Ці кровоносні судини, що знову утворилися, не тільки забезпечують продовження росту первинної пухлини, але також і дисемінацію, і повторну колонізацію метастатичних пухлинних клітин. Так, виявлена кореляція між щільністю мікросудин у зрізах пухлини молочної залози й виживанням пацієнтів, що страждають зазначеним ви-

дом раку, а також деякими іншими пухлинами (Weidner i in., *N. Engl. J. Med* 324, 1991, сс. 1-6; Horak i in., *Lancet* 340, 1992, сс. 1120-1124; Macchiarini i in., *Lancet* 340, 1992, сс. 145-146). Точний механізм, що контролює перемикання ангиогенезу, поки недостатньо вивчений, але можна припустити, що неоваскуляризація маси пухлини є результатом чистого балансу безлічі стимуляторів і інгібіторів ангиогенезу (Folkman, *Nat Med* 1(1), 1995, сс. 27-31).

Процес розвитку судини чітко регулюється. До теперішнього часу виявлений цілий ряд молекул, більшість із яких являють собою секретуємі фактори, продуковані навколишніми клітинами, які беруть участь у регуляції диференцировки, проліферації, міграції й злипанні ЕК з утворенням структури, що мають форму тяжів. Наприклад, встановлено, що судинний ендотеліальний фактор росту (VEGF) є фактором, що має вирішальне значення, що бере участь у стимуляції ангиогенезу й в індукції проникності судин (Ferrara i in., *Endocr. Rev.* 18, 1997, сс. 4-25). Дані про те, що втрата навіть одного алеля VEGF приводить до загибелі ембріонів, свідчать про ту незамінну роль, що грає цей фактор в розвитку й диференціюванні судинної системи. Крім того, встановлено, що VEGF є ключовим медіатором неоваскуляризації, асоційованої з пухлинами й внутріочними порушеннями (Ferrara i in., *Endocr. Rev.*, вище). Для мПНК VEGF характерна надекспресія в більшості вивчених типів пухлин людини (Berkman i in., *J Clin Invest* 91, 1993, сс. 153-159; Brown i in., *Human Pathol.* 26, 1995, сс. 86-91; Brown i in., *Cancer Res.* 53, 1993, сс. 4727-4735; Mattern i in., *Brit. J. Cancer.* 73, 1996, сс. 931-934; i Dvorak i in., *Am J. Pathol.* 146, 1995, сс. 1029-1039).

Крім того, концентрація VEGF у рідині ока добре корелює з наявністю активної проліферації кровоносних судин у пацієнтів, що страждають діабетом і іншими пов'язаними з ішемією ретинопатіями (Aiello i in., *N. Engl. J. Med.* 331, 1994, сс. 1480-1487). Крім того, у сучасних дослідженнях встановлено, що VEGF локалізовано в хороїдальних неоваскулярних мембранах пацієнтів, що страждають AMD (Lopez i in., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 37, 1996, сс. 855-868).

Нейтралізуючі антитіла до VEGF придушують ріст різних людських ліній пухлинних клітин у безтимусних мишей (Kim i in., *Nature* 362, 1993, сс. 841-844; Warren J. *Clin. Invest.* 95, 1995, сс. 1789-1797; Borgström i in., *Cancer Res.* 56, 1996, сс. 4032-4039; i Melnyk i in., *Cancer Res.* 56, 1996, сс. 921-924), а також інгібують внутріочний ангиогенез на моделях ішемічних порушень сітківки (Adamis i in., *Arch. Ophthalmol.* 114, 1996, сс. 66-71). Таким чином, моноклональні антитіла до VEGF або інші інгібітори дії VEGF є перспективними кандидатами для лікування пухлин і різних внутріочних пов'язаних з неоваскуляризацією порушень. Такі антитіла описані, наприклад, в EP 817648, опублікованої 14 січня 1998 р. і в WO 98/45331 і WO 98/45332, опублікованих 15 жовтня 1998 р. Одне з антитіл до VEGF, бевасизумаб, дозволено FDA для застосування в сполученні з хіміотерапевтичною обробкою для лікування метастатичного колоректального раку (CRC) і недрібноклітинного раку легень

(NSCLC). Бевасизумаб проходить вивчення в багатьох, що проводяться в цей час клінічних дослідках з погляду лікування різних пов'язаних з раком показань.

У процесі розвитку нервової системи від нейронів відходять ниткоподібні аксони, які мігрують на більшій відстані для досягнення своїх мішеней (див. огляд Carmeliet і Tessier-Lavigne, *Nature* 436, 2005, сс. 193-200). На провідній верхівці зростаючого аксона перебуває сенсорна структура, що володіє великою рухливістю, що називають точкою росту. Завдяки динамічним циклам розпрямлення й стиску філоподіальних виростів точка росту постійно сприймає й оцінює безліч забезпечуючих спрямованість (керівних) сигналів у навколишньому просторі й точно вибирає правильний шлях поширення до кінцевої мішені.

В останні десятиліття досягнуто помітний прогрес у розумінні механізмів, що забезпечують спрямованість аксонів (див. огляд Dickson, *Science* 298, 2002, сс. 1959-1964). Сигнали, що забезпечують спрямованість, можна розділяти на 4 типи: аттрактанти й репеленти; вони можуть діяти або в невеликому діапазоні (тобто в межах клітини або матрикса), або в більше широкому діапазоні (тобто мають здатність до поширення). До теперішнього часу ідентифіковано 4 основних класи молекул аксонів, що забезпечують спрямованість: нетрини, семафорний, ефріни й «слити» (slit) (див. огляд Huber і ін., *Annu Rev Neurosci* 26, 2003, сс. 509-563).

Семафорний (Sema), які називають також колапсинами, належать до великого сімейства філогенетично консервативних секретованих і асоційованих з мембраною білків. Представники сімейства семафоринів мають здатність опосередковувати зв'язані як з відштовхуванням, так і з залученням (атрактивністю) процесів, що забезпечують спрямованість, при розвитку нейрона (Raper, *Curr Opin Neurobiol* 10, 2000, сс. 88-94). До теперішнього часу ідентифіковано більше 30 семафоринів, які всі характеризуються наявністю консервативного N-кінцевого домена Sema, що складається приблизно з 500 амінокислот. Представників семафоринів розділяють на 8 підродин залежно від їхньої структурної подібності й видів, з яких вони отримані. Більше докладну інформацію про уніфіковану номенклатуру семафоринів можна знайти в: *Semaphorin Nomenclature Committee*, *Cell* 97, 1999, сс. 551-552.

Сімейство нейропіліну (NRP) складається із двох гомологічних білків нейропіліну-1 (NRP1) і нейропіліну-2 (NRP2). NRP1 був уперше ідентифікований як трансмембранний глікопротеїн типу I масою 130 кДа, що експресується в точках росту зростаючих аксонів. Потім за допомогою експресійного клонування був ідентифікований NRP2 (Fujisawa і Kitsukawa, *Curr Opin Neurobiol* 8, 1998, сс. 587-592). Установлено, що NRP являють собою рецептори для підгрупи семафоринів, а саме класу 3 семафоринів. Існує припущення про те, що NRP функціонують у якості не передавальних сигналів корецепторів поряд з іншим сімейством семафоринових рецепторів, таких як плексини.

Хоча NRP уперше описані як медіатори, що забезпечують спрямованість аксонів, установлено також, що вони відіграють основну роль у розвитку судин (Carmeliet і Tessier-Lavigne, 2005). Вони ідентифіковані в якості специфічного для конкретної ізоформи рецептора VEGF, що експресується на пухлинні й ендотеліальних клітинах, що обумовлює проведення великих досліджень, спрямованих на з'ясування ролі NRP у біології судин і пухлин (Soker і ін., *Cell* 92, 1998, сс. 735-745; Klagsbrun і ін., *Adv Exp Med Biol* 515, 2002, сс. 33-48). Генетичні дослідження дозволили точно довести, що Nrp1 необхідно для судинного морфогенезу. Втрата функції Nrp1 приводить до прояву пов'язаних з ремоделюванням і розгалуженістю дефектів судин, до фенотипу, що може додатково підсилюватися в результаті втрати функції Nrp2 (Kawasaki і ін., *Development* 126, 1999, сс. 4895-4902; Takashima і ін., *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 2002, сс. 3657-3662). Ці результати дозволили припустити, що на ранній стадії розвитку Nrp1 і Nrp2 можуть мати функції, що перекриваються. Однак на більш пізніх стадіях розвитку локалізація експресії кожного Nrp стає різною, так, Nrp1 експресується, насамперед в артеріях, а Nrp2 у венах і лімфатичних судинах (Yuan і ін., *Development* 129, 2002, сс. 4797-4806; Herzog і ін., *Mech Dev* 109, 2001, сс. 115-119). Слід зазначити, що втрата тільки функції Nrp2 специфічно порушує розвиток лімфатичної системи. Оскільки під час розвитку Nrp1 експресується в багатьох інших типах клітин, роль судинного Nrp1 проявляється за допомогою створення ЕК-специфічного «вимикання» (knock-out, KO), що приводить до судинних дефектів, аналогічним виявленим при алелі, що мовчить (Gu і ін., *Dev Cell* 5, 2003, сс. 45-57). Важливо відзначити, що в цьому дослідженні встановлено також, що для розвитку судин не потрібне зв'язування Sema3A з NRP1. В інших дослідженнях були виявлені дефекти в забезпеченні спрямованості ендотеліальних верхівок клітин при розвитку ромбоподібного мозку в Nrp1- KO-ембріонів (Gerhardt і ін., *Dev Dyn* 231, 2004, сс. 503-509).

Не дивлячись на широке вивчення ролі NRP1 у розвитку судин, залишається неясним чи проявляє NRP1 свою функцію в судинах тільки через шлях VEGF-рецептор 2 VEGF (VEGFR2) як підсилювач зв'язування VEGF з VEGFR2, і тим самим, підсилюючи передачу VEGFR2-сигналу, або через шлях передачі сигналу, що не залежить від VEGFR2, або шляхом сполучення зазначених шляхів.

Моноклональні антитіла можна одержувати на основі технології рекомбінантної ДНК. Широке застосування одержали створені моноклональні антитіла, зокрема, отримані з організму гризунів, однак антитіла з організму, крім людини, часто є антигенними для людини. У даній галузі були початі спроби перебороти цю проблему шляхом конструювання «химерних» антитіл, у яких антигензв'язуючий центр антитіла з організму крім людини зшивають із людською константною ділянкою (Cabilly і ін., *US* 4816567). Ізотип людської константної ділянки можна вибирати з метою зміни здатності антитіла брати участь в антитіло-

обумовленій клітиннозалежної цитотоксичності (ADCC) і комплементзалежної цитотоксичності. Ще однією спробою зниження антигензв'язуючих функцій антитіл і мінімізації застосування гетерологічних послідовностей у людських антитілах, було створення гуманізованих антитіл до різних антигенів, у яких ділянки, що значно уступають по розміру інтактній людській варіабельній ділянці, були замінені на відповідну послідовність із організмів крім людини. Наприклад, залишки з організму гризунів були замінені на відповідні сегменти людського антитіла. На практиці гуманізовані антитіла, як правило, являють собою людські антитіла, у яких деякі залишки гіперваріабельних ділянок (CDR) і можливо деякі залишки каркасної ділянки (FR) замінені залишками аналогічних доменів антитіл гризунів (Jones і ін., *Nature* 321, 1986, сс. 522-525; Riechmann і ін., *Nature* 332, 1988, сс. 323-32; Verhoeven і ін., *Science* 239, 1988, сс. 1534-1536).

Перед введенням людині терапевтичного антитіла, як правило, проводять доклінічні дослідження на ссавцях крім людини для оцінки ефективності й/або токсичності антитіла. В ідеальному варіанті антитіла, які піддають таким дослідженням, мають здатність розпізнавати й взаємодіяти з високою ефективністю з антигеном-мішенню, що є ендогенним для тварини-хазяїна, такого як миша або примат, крім людини.

Фагова дисплейна технологія являє собою ефективний інструмент створення й відбору нових білків, які зв'язуються з лігандом, таким як антиген. За допомогою методу фагової презентації можна створювати великі бібліотеки варіантів білків і швидко вибирати в них ті послідовності, які зв'язуються з високою афінністю з антигеном-мішенню. Нуклеїнові кислоти, що кодують варіанти поліпептидів, зливають із нуклеотидною послідовністю, що кодує вірусний оболонковий білок, такий як білок, кодуємий геном III, або білок, кодуємий геном VIII. Створені моновалентні фагові дисплейні системи, у яких нуклеотидну послідовність, що кодує білок або поліпептид, зливають із нуклеотидною послідовністю, що кодує частину білка, кодуемого геном III (Bas, S., *Proteins* 8, 1990, с. 309; Lowman і Wells, *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* 3, 1991, с. 205). При використанні моновалентної фагової дисплейної системи здійснюють експресію з невисокими рівнями генного злиття й експресують також білки, кодуємі геном III дикого типу, у результаті чого зберігається інфективність часток. Методи створення пептидних бібліотек і скринінгу зазначених бібліотек описані в цілому ряді патентів (див., наприклад, U.S. 5723286, U.S. 5432018, U.S. 5580717, U.S. 5427908 і U.S. 5498530).

Важливою для створення фагових дисплейних бібліотек антитіл є демонстрація експресії пептидів на поверхні ниткового фага й експресія функціонально активних фрагментів антитіл у периплазмі *E. coli* (Smith і ін., *Science* 228, 1985, с. 1315; Skerra і Pluckthun, *Science* 240, 1988, с. 1038). Бібліотеки антитіл або антигензв'язуючих поліпептидів створювали численними шляхами, у тому числі шляхом зміни індивідуального гена шляхом вбудовування довільних послідовностей ДНК або шляхом

клонування сімейства родинних генів. Методи презентації антитіл або антигензв'язуючих фрагментів з використанням фагової дисплейної бібліотеки описані в U.S. 5750373, 5733743, 5837242, 5969108, 6172197, 5580717 і 5658727. Потім бібліотеку піддають скринінгу відносно експресії антитіл або антигензв'язуючих білків з необхідними характеристиками.

Фагова дисплейна технологія має кілька переваг у порівнянні із загальноприйнятими методами одержання антитіл з необхідними характеристиками на основі гібридом або рекомбінантної ДНК. Ця технологія дозволяє створювати великі бібліотеки антитіл із широкою розмаїтістю послідовностей у більше короткий час і без використання тварин. Для одержання гібридом або одержання гуманізованих антитіл може знадобитися навіть кілька місяців. Крім того, оскільки для створення фагових дисплейних бібліотек не потрібна імунізація, їх можна створювати для антигенів, які є токсичними або мають низку антигенності (Hogenboom, *Immunotechniques* 4, 1988, сс. 1-20). Фагові бібліотеки антитіл можна застосовувати також для створення й ідентифікації нових терапевтичних антитіл.

Фагові дисплейні бібліотеки застосовували для створення людських антитіл з імунізованих, неімунізованих людей, послідовностей зародкової лінії або популяції Ig інтактних (несенсибілізованих) В-клітин (Barbas і Burton, *Trends Biotech* 14, 1996, с. 230; Griffiths і ін., *EMBO J.* 13, 1994, с. 3245; Vaughan і ін., *Nat. Biotech.* 14, 1996, с. 309; Winter, EP 0368684B1). Були створені інтактні або неімунні антигензв'язуючі бібліотеки з використанням різних лімфоїдних тканин. Деякі з таких бібліотек надходять у продаж, наприклад, створені на фірмі Cambridge Antibody Technology and Morphosys (Vaughan і ін., *Nature Biotech* 14, 1996, с. 309; Knappik і ін., *J. Mol. Biol.* 296, 1999, с. 57). Однак багато які із зазначених бібліотек мають обмежену розмаїтість.

Можливість ідентифікувати й виділяти високоафінні антитіла з фагової дисплейної бібліотеки є важливою для виділення нових антитіл, призначених для терапевтичного застосування. Виділення високоафінних антитіл з бібліотеки залежить від розміру бібліотеки, ефективності їхнього одержання в бактеріальних клітинах і розмаїтості бібліотеки (див, наприклад, Knappik і ін., *J. Mol. Biol.* 296, 1999, с. 57). Розмір бібліотеки зменшується в результаті неефективного виробництва через неправильне укладання антитіла або антигензв'язуючого білка й присутності стоп-кодонів. Експресія в бактеріальних клітинах може інгібуватися при неправильному укладанні антитіла або антигензв'язуючого центра. Експресію можна підвищувати шляхом заміни залишків у вигинах поверхні розділу варіабельної/константної ділянки або відібраних залишків в CDR (Deng і ін., *J. Biol. Chem.* 269, 1994, с. 9533; Ulrich і ін., *PNAS*, 92, 1995, сс. 11907-11911; Forsberg і ін., *J. Biol. Chem.* 272, 1997, с. 12430). Послідовність каркасної ділянки являє собою фактор, що бере участь у забезпеченні правильного укладання, коли фагові бібліотеки антитіл продукують у бактеріальних клітинах.

Для виділення високоафінних антитіл важливо також створення бібліотеки антитіл або антигензв'язуючих білків з високою розмаїтістю. Бібліотеки з розмаїтістю в обмежених CDR були створені з використанням різних підходів (див., наприклад, Tomlinson, *Nature Biotech.* 18, 2000, сс. 989-994). CDR3-ділянки становлять інтерес у цьому плані, оскільки вони часто беруть участь у зв'язуванні антигену. CDR3-ділянки важкого ланцюга значно варіюються по розмірі, послідовності й структурній конформації.

Інші підходи урізноманітнення передбачають рандомізацію CDR-ділянок варіабельних ділянок важких і легких ланцюгів з використанням всіх 20 амінокислот у кожному положенні. Установлено, що застосування всіх 20 амінокислот може приводити до широкої розмаїтості послідовностей варіантів антитіл і підвищувати шанс ідентифікації нових антитіл (Barbas, *PNAS* 91, 1994, с. 3809; Yelton D.E., *J. Immunology* 155, 1995, с. 1994; Jackson J.R., *J. Immunology* 154, 1995, с. 3310 і Hawkins R.E., *J. Mol. Biology* 226, 1992, с. 889).

Короткий виклад суті винаходу

Даний винахід відноситься до нових антитіл до NRP1, що володіє здатністю модулювати щонайменше один опосередковуваний нейропліном вид біологічної активності. Переважно антитіла до NRP1 являють собою антагоністичні антитіла, які мають здатність інгібувати щонайменше один опосередковуваний нейропліном вид біологічної активності. Більш конкретно, у даному винаході запропоновані способи одержання антитіл до NRP1 зі створеної фагової бібліотеки людських синтетичних антитіл і додання антитілам до NRP1 нової функції, що блокує. Антитіла до NRP1, пропоновані у винаході, можна розділяти на два класи залежно від типу їхнього зв'язування з NRP1: антитіла до NRP1^A (включаючи YW64.3 і його варіанти), які зв'язуються з CUB-доменами (α1α2) NRP1; і антитіла до NRP1^B (включаючи YW 107.4 і його варіанти), які зв'язуються з доменами фактора коагуляції V/VIII (b1b2) NRP1.

Згідно одному з об'єктів винаходу антитіла до NRP1^A, пропоновані у винаході, можна вибирати із клонів антитіла «YW64», представлених у таблиці III, які мають ідентифіковані часткові послідовності CDR і афінність до зв'язування з мишачими й людськими NRP1. Антитіло до NRP1^A, пропоноване у винаході, переважно містить варіабельну ділянку легкого ланцюга, що несе наступні амінокислотні послідовності CDR: CDRL1 (RASQSISSYLA; SEQ ID NO:123), CDRL2 (GASSRAS; SEQ ID NO:124) і CDRL3 (QQYMSVPIT; SEQ ID NO:125). Наприклад, антитіло до NRP1^A містить послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга, що представлена в SEQ ID NO:3. Антитіло до NRP1^A, пропоноване у винаході, переважно містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, що несе наступні амінокислотні послідовності CDR: CDRH1 (GFSFSSEPIIS; SEQ ID NO:126), CDRH2 (SSITGKNGYTTYADSVKQ; SEQ ID NO:127) і CDRH3 (WGKKVYGMVDV; SEQ ID NO:128). Наприклад, антитіло до NRP1^A містить послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга, що представлена в SEQ ID NO:4. Більше краще антитіло

до NRP1^A, пропоноване у винаході, являє собою антитіло YW64.3, що містить послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга, що представлена в SEQ ID NO:3, і послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга, що представлена в SEQ ID NO:4.

Відповідно до наступного об'єкта винаходу антитіла до NRP1^B, пропоновані у винаході, можна вибирати із клонів антитіла «YW107.4», представлених у таблиці IV, які мають ідентифіковані часткові послідовності CDR і афінність до зв'язування з мишачими й людськими NRP1. Антитіло до NRP1^B, пропоноване у винаході, переважно містить варіабельну ділянку легкого ланцюга, що несе наступні амінокислотні послідовності CDR: CDRL1 (RASQYFSSYLA; SEQ ID NO:129), CDRL2 (GASSRAS; SEQ ID NO:130) і CDRL3 (QQYLGSPPT; SEQ ID NO:131). Наприклад, антитіло до NRP1^B містить послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга, що представлена в SEQ ID NO:5. Антитіло до NRP1^B, пропоноване у винаході, переважно містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, що несе наступні амінокислотні послідовності CDR: CDRH1 (GFTFSSYAMS; SEQ ID NO:132), CDRH2 (SQISPAGGYTNYADSVKQ; SEQ ID NO:133) і CDRH3 (ELPYRMSKVMVDV; SEQ ID NO:134). Наприклад, антитіло до NRP1^B містить послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга, що представлена в SEQ ID NO:6. Більше краще антитіло до NRP1^B, пропоноване у винаході, являє собою антитіло YW107.4.87, що містить послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга, що представлена в SEQ ID NO:5, і послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга, що представлена в SEQ ID NO:6.

У даному винаході запропоноване також застосування антитіл до NRP1 для лікування асоційованих з ангіогенезом порушень, таких як рак. В одному із кращих варіантів здійснення винаходу антитіла до NRP1, пропоновані у винаході, застосовують у сполученні з антитілом до VEGF. Краще антитіло до VEGF має здатність до зв'язування з тим же епітопом VEGF, що й антитіло A4.6.1. Більше краще антитіло до VEGF являє собою бевазизумаб або ранибизумаб.

Короткий опис креслень

На кресленнях показано:

на Фіг. 1 - специфічність до зв'язування антитіл до NRP1. (1A) Антитіла до NRP1 зв'язуються специфічно з людським і мишачим NRP1. Специфічність до зв'язування антитіл до NRP1 YW64.3 і YW107.4 у вигляді Ig (10 мкг/мл) оцінювали по зв'язуванню з лунками, сенсibilізованими hNRP1, mNRP1, hNRP2, mNRP2, Erb2-ECD або BCA, і зв'язані Ig виявляли за допомогою кон'югатів антитіла до людського Ig з HRP. (1B) Результати FACS-аналізу антитіл до NRP1 YW64.3 і YW 107.4 у вигляді Ig, що свідчать про здатності антитіл зв'язуватися з білком, що перебуває на клітинній поверхні, NRP1 (HUVEC);

на Фіг. 2 - дані про здатності до зв'язування антитіла до NRP1 YW 107.4 і його варіанти з дозрілою афінністю YW107.4.87 (анти-NRP1^B). (2A) Результати кінетичного BIAcore-аналізу варіанта з дозрілою афінністю YW107.4.87. (2B) Результати

FACS-аналізу YW 107.4 і YW 107.4.87 у вигляді Ig, що свідчать про підвищену здатність до зв'язування варіанта з дозрілою афінністю YW107.4.87 з білком, що перебуває на клітинній поверхні, NRP1 (HUVES);

на Фіг. 3 - послідовності варіабельних ділянок YW 64.3 (анти-NRP1^A) і YW107.4.87 (анти-NRP1^B) і послідовності h4D5, наведені для порівняння. Нумерація основ проведена по базі даних Кебота. Послідовності CDR перебувають у позначенні прямокутником ділянці. (3A) Послідовності варіабельної ділянки легкого ланцюга h4D5 (SEQ ID NO:1), YW 64.3 (SEQ ID NO:3) і YW107.4.87 (SEQ ID NO:5). (3B) Послідовності варіабельної ділянки важкого ланцюга h4D5 (SEQ ID NO:2), YW 64.3 (SEQ ID NO:4) і YW107.4.87 (SEQ ID NO:6);

на Фіг. 4 - дані, що свідчать про блокування антитілами до NRP1 зв'язування VEGF₁₆₅ з NRP1;

на Фіг. 5 - результати кількісної оцінки індукованого Sema3A колапси DRG (ганглії спинного корінця) (5A) і індукованого Sema3F-колапси гіпокампа (5B). Показано, що анти-NRP1^A специфічно блокує індукований Sema3A колапс точки росту нейрона DRG, але не блокує індукований Sema3F колапс точки росту нейрона гіпокампа;

на Фіг. 6 - дані, що свідчать про те, що антитіла до NRP1 мають здатність інгібувати індуковану VEGF міграцію клітин лінії HUVES і утворення відростків *in vitro*. (6A) Результати кількісного аналізу міграції (n=6 для кожного варіанта). *p=0,00003; **p=9,9×10⁻¹¹; критерій Ст'юдента. (6B) Результати кількісного аналізу утворення відростків від гранули, n = 12-14 гранул на кожний варіант;

на Фіг. 7 - дані, що свідчать про інгібуючу дію *in vivo* антитіл до NRP1 на ремоделювання судин у сітківці, що розвивається, мишей. (7A) - Проілюстрований розвиток судин, починаючи від дня 5 після народження (P5) до P8. Судини подовжуються за концентричною схемою до краю сітківки. Диск зорового нерва (ONH) локалізований у центрі сітківки; (7B) - проілюстровано, що ремоделювання судин поблизу ONH відбувається між P5 і P8; (7B) - проілюстроване проникнення судинних відростків у більше глибокі шари сітківки. Відростки від судин простираються в зовнішній плексиформний шар (OPL) і утворюють сплетіння. Пізніші відростки проникають у шари між NFL (шари нервового волокна) і OPL шарами, досягаючи зрештою внутрішнього плексиформного шару (IPL); (7Г) - результати кількісної оцінки щільності судин; загальна кількість елементів зображення одержують на основі 12 репрезентативних зображень, отриманих для кожного варіанта для 4 оброблених сітківки, *p=0,006; **p<0,0001; критерій Ст'юдента; (7Д) - результати кількісної оцінки подовження судин, оцінене по співвідношенню відстані від ONH до кінця судинної мережі й відстані від ONH до кінця чаші сітківки. Представлено дані 12 репрезентативних оцінок 4 оброблених сітківки;

на Фіг. 8 - дані про вплив антитіл до NRP1 на індуковану VEGF проникність судин, проліферацію HUVES, фосфорильовання VEGFR2 і передачу сигналів у прямому напрямку від VEGFR2. (8A) - результати аналізів по кількісній оцінці проникності судин шкіри мишей. Представлено середні зна-

чення, отримані в 6 незалежних експериментах (p=0,69 для анти-NRP1^A і p=0,989 для анти-NRP1^B); (8B) - дані кількісної оцінки проліферації HUVES у присутності VEGF або без нього (n=5 для кожного варіанта); (8B) - дані про рівень фосфорильовання VEGFR2 в HUVES, отримані за допомогою ELISA з використанням антитіл, які розпізнають повний VEGFR2 або VEGFR2 з фосфорильованим тіозином. Рівень фосфорильовання VEGFR2 у клітинах, оброблених анти-NRP1^A, не відрізнявся вірогідно від контрольної групи (p=0,133). *p=0,00017; критерій Ст'юдента; (8Г) - результати аналізу методом імуноблотингу лизатів HUVES. Клітини обробляли зазначеними антитілами з наступною інкубацією з VEGF;

на Фіг. 9 - дані про інгібуючу ріст пухлин дію антитіл до NRP1 (або індивідуально, або в сполученні з антитілом до VEGF) на різних моделях ксенотрансплантатів пухлини, (9B) - дані про середній обсяг трансплантатів модельних пухлин SK-MES-1, H1299 і Fo5 відповідно, (9Г) - графік Каплана-Мейєра (Kaplan-Meier) для моделі пухлини SK-MES-1;

на Фіг. 10 - дані про вплив на судини антитіл до NRP1 (або індивідуально, або в сполученні з антитілом до VEGF) на моделі пухлини Fo5, (10A) - середні значення щільності судин (обмірюваної за допомогою перфузії лектина); загальна кількість елементів зображення, отримана для 3-4 оброблених пухлин для кожного варіанта, (10B) середня щільність перицитів (оцінена за допомогою фарбування PDGFR()), (10B) - співвідношення перицитів/судин, оцінене по відносному перицелюлярному покриттю;

на Фіг. 11- дані, що свідчать про адитивну дію інгібування NRP1 і VEGF на ремоделювання судин, 11A - модель, з якої видно, що блокада функції NRP1 у судинах, що знову утворюються, інгібує ремоделювання й наступне дозрівання судин, що приводить до залежності виживання судин від VEGF, на 11B - дані про зміну щільності судин у неонатальній сітківці мишей у присутності анти-NRP1^B, антитіла до VEGF або їхньої комбінації.

Докладний опис винаходу

Даний винахід відноситься до нових композицій і способів модуляції опосередковуваних NRP видів біологічної активності.

Визначення

Поняття «нейропелін» або NRP відноситься в цілому до нейропеліну-1 (NRP1), нейропеліну-2 (NRP2) і їх ізоформам і варіантам, описаним в Rossignol і ін., Genomics 70, 2000, сс. 211-222. Нейропеліни являють собою нетірозинкіназні рецептори масою 120-130 кДа. Існує безліч отриманих у результаті сплайсинга варіантів NRP-1 і NRP-2 і розчинних ізоформ. Основна структура нейропеліну складається з 5 доменів: три позаклітинних домена (a1a2, b1b2 і c), трансмембранний домен і цитоплазматичний (с) домен. Домен a1a2 гомологічний компонентам комплексу C1r і C1s (CUB), які в цілому містять чотири цистеїнових залишки, що утворюють два дисульфідних містки. Домен b1b2 гомологічний факторам коагуляції V і VIII. Центральну частину с-домена позначають як MAM через її гомологію з меприном, A5 і (-білками тірозинфо-

сфотазного рецептора. Домени a1a2 і b1b2 відповідальні за зв'язування з лігандом, а с-домен має вирішальне значення для гомодимеризації або гетеродимеризації (Gu і ін., J. Biol. Chem. 277, 2002, сс. 18069-18076; He і Tessier-Lavigne, Cell 90, 1997, сс. 739-751).

Поняття «опосередковувана нейропіліном біологічна активність» відноситься в цілому до фізіологічних або патологічних подій, у яких нейропілін-1 і/або нейропілін-2 відіграє помітну роль. Види активності являють собою (але, не обмежуючись ними) таку активність, як забезпечення спрямованості аксона в процесі ембріонального розвитку нервової системи або регенерації нейронів, ангіогенез (включаючи моделювання судин), онкогенез і метастазування пухлин.

Поняття «антитіло» у даному описі використовується в найбільш широкому смислі й, зокрема, відноситься до моноклональних антитіл (включаючи повнорозмерні (зрілі) моноклональні антитіла), поліклональним антитілам, мультиспецифічним антитілам (наприклад биспецифічним антитілам) і фрагментам антитіл, у тому випадку, якщо вони мають необхідну біологічну активність.

Поняття «моноклональне антитіло» у контексті даного опису відноситься до антитіла, отриманого з популяції практично гомогенних антитіл, тобто вхідні в популяцію індивідуальні антитіла ідентичні за винятком можливих мутацій, що зустрічаються в природних умовах, які можуть бути присутніми у невеликих кількостях. Моноклональні антитіла є високоспецифічними і являють собою антитіла до одного антигенного сайту. Крім того, на противагу препаратам загальноприйнятих антитіл (поліклональних), які включають різні антитіла до різних детермінантів (епітопам), мішенню кожного моноклонального антитіла є тільки одного детермінанта антигену. Прикметник «моноклональне» свідчить про те, що антитіло отримане із практично гомогенної популяції антитіл, при цьому не передбачається, що воно повинне бути отримане за допомогою якого-небудь конкретного методу. Наприклад, моноклональні антитіла, які можна застосовувати згідно із даним винаходом, можна одержувати за допомогою методу на основі гібридом, уперше описаного Kohler і ін., Nature, 256, 1975, с. 495, або їх можна конструювати методами рекомбінантної ДНК (див. наприклад, US 4816567). «Моноклональні антитіла» можна виділяти також з фагових бібліотек антитіл за допомогою методик, описаних, наприклад, в Clackson і ін., Nature, 352, 1991, сс. 624-628 і в Marks і ін., J. Mol. Biol., 222, 1991, сс. 581-597.

Моноклональні антитіла в контексті даного опису включають, зокрема «химерні» антитіла (імуноглобуліни), у яких частина важкого й/або легкого ланцюга ідентична або гомологічна відповідним послідовностям антитіл, отриманим з конкретних видів, або належить до конкретних класів або підкласів антитіл, а інша ділянка ланцюга(ів) ідентична або гомологічна відповідним послідовностям антитіл, отриманим з інших видів, або належить до інших класів або підкласів антитіл, включаючи фрагменти таких антитіл, у випадку, якщо вони мають необхідну біологічну активність

(US 4816567; і Morrison і ін., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 1984, сс. 6851-6855).

«Гуманізовані» форми антитіл тварин крім людини (наприклад, миші) являють собою химерні антитіла, які включають мінімальну послідовність, отриману з імуноглобуліну тварини крім людини. Основна частина гуманізованих антитіл представлена людськими імуноглобулінами (антитіло-реципієнт), у яких залишки з гіперваріабельної ділянки реципієнта замінені залишками з гіперваріабельної ділянки інших видів крім людини (антитіло-донор), таких як миша, щур, кролик або примати крім людини, що володіють необхідною специфічністю, афінністю й потенціалом. У деяких випадках залишки каркасної ділянки (FR) людського імуноглобуліну замінюють відповідними залишками з інших видів крім людини. Крім того, гуманізовані антитіла можуть включати залишки, які не присутні в антитілі-реципієнті або в антитілі-донорі. Ці модифікації здійснюються із метою додаткового вдосконалення характеристик антитіла. У цілому, гуманізоване антитіло повинне включати практично повністю щонайменше одну, а, як правило дві, варіабельних ділянки, у яких всі або практично всі гіперваріабельні петлі відповідають петлям зазначених імуноглобулінів інших тварин крім людини, а всі або практично всі FR відповідають послідовності імуноглобуліну людини. Гуманізоване антитіло необов'язково може включати також щонайменше частину константної ділянки (Fc) імуноглобуліну, як правило, людського імуноглобуліну. Додаткові більше докладні дані див. в Jones і ін., Nature, 321, 1986, сс. 522-525; Reichmann і ін., Nature, 332, 1988, сс. 323-329 і в Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2, 1992, сс. 593-596.

«Залежне від виду антитіло» являє собою антитіло, що володіє більше вираженою афінністю до зв'язування з антигеном з одних видів ссавців, чим з гомологом антигену з інших видів ссавців. Як правило, антитіло, що залежить від виду, «зв'язується специфічно» з людським антигеном (тобто характеризується афінністю до зв'язування (значення Kd), не вище, ніж приблизно 1×10^{-7} М, переважно не вище, ніж приблизно 1×10^{-8} і більш переважно не більш ніж приблизно 1×10^{-9} М), але характеризується афінністю до зв'язування з гомологом антигену з інших видів ссавців крім людини щонайменше приблизно в 50 разів або щонайменше приблизно в 500 разів або щонайменше приблизно в 1000 разів більше слабкої в порівнянні з афінністю до зв'язування з людським антигеном. Залежне від виду антитіло може ставитися до кожного із зазначених вище типів антитіл, але переважно являє собою гуманізоване або людське антитіло.

В контексті даного опису поняття «мутант антитіла, мутантне антитіло» або «варіант антитіла» відноситься до варіанта амінокислотної послідовності залежного від виду антитіла, у якому модифікований один або кілька амінокислотних залишків залежного від виду антитіла. Для таких мутантів обов'язково характерна менш чим 100% ідентичність або подібність послідовності з послідовністю залежні від виду антитіла. У кращому варіанті здійснення винаходу амінокислотна послідовність

мутанта антитіла щонайменше на 75% ідентична або подібна до амінокислотної послідовності варіабельної ділянки важкого або легкого ланцюга залежного від виду антитіла, більш переважно щонайменше на 80%, більш переважно щонайменше на 85%, більш переважно щонайменше на 90% і найбільше переважно щонайменше на 95%. Ідентичність або подібність щодо зазначеної послідовності визначають у контексті даного опису як відсоток амінокислотних залишків у розглянутій послідовності (кандидат¹-кандидатові-кандидату-послідовності-кандидаті), ідентичних (тобто цей же залишок) або подібних (тобто амінокислотний залишок із цієї ж групи з позицій загальних властивостей бічного ланцюга, див. нижче) залишкам залежні від виду антитіла, після лінеаризації послідовностей і інтродукції при необхідності проломів для досягнення максимального відсотка ідентичності послідовності. Ні N-кінцеві, ні C-кінцеві, ні внутрішні подовження, делеції або інсерції в послідовності антитіла поза варіабельної ділянки не повинні розглядатися як впливають на ідентичність чи подібність послідовності.

«Виділене антитіло» являє собою антитіло, що ідентифіковане й відділено від і/або виділено з компонента його природного оточення. Забруднювачами в його природному оточенні є продукти, які можуть робити вплив при діагностичному або терапевтичному застосуванні антитіла, і вони можуть включати ферменти, гормони й інші, білкові або небілкові розчинені речовини. У кращих варіантах здійснення вирахування антитіло повинне бути очищене до (1) більше 95% у перерахуванні на масу антитіла, що визначають методом Лоурі, і найбільше переважно більше 99 мас. %, до (2) ступеня, достатнього для одержання щонайменше 15 залишків N-кінцевої або внутрішньої амінокислотної послідовності за допомогою секвінатора з обертовою чашкою або до (3) гомогенного стану по даним ДСН-ПААГ у що відновлюють або не відновлюють умовах при фарбуванні кумаси брильянтовым блакитним або переважно при фарбуванні сріблом. До виділеного антитіла відноситься антитіло, що перебуває *in situ* у рекомбінантній клітині, якщо в ній не є присутнім жоден компонент природного оточення антитіла. Однак, як правило, виділене антитіло повинне бути отримане з використанням щонайменше однієї стадії очищення.

В контексті даного опису поняття «варіабельна ділянка антитіла» відноситься до частин легких і важких ланцюгів молекул антитіла, які включають амінокислотні послідовності гіперваріабельних ділянок (Complementarity Determining Regions) (CDR; тобто CDR1, CDR2 і CDR3) і каркасних ділянок (Framework Regions) (FR). V_H позначає варіабельну ділянку важкого ланцюга. V_L позначає варіабельну ділянку легкого ланцюга. Відповідно до способів, пропонованих у даному винаході, амінокислотні положення, які відносяться до CDR і FR, можна визначати згідно Кеботу (Kabat і ін., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5-ої изд., з Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 і 1991). Нумерацію амінокислот антитіла або антигензв'язуючих фрагментів також здійснюють по Кеботу.

У контексті даного опису поняття «гіперваріабельні ділянки» (CDR; тобто CDR1, CDR2 і CDR3) відноситься до амінокислотних залишків варіабельної ділянки антитіла, присутність яких необхідно для зв'язування антигену. Кожна варіабельна ділянка, як правило, містить три CDR-ділянки, позначених як CDR1, CDR2 і CDR3. Кожна гіперваріабельна ділянка може містити амінокислотні залишки з «гіперваріабельної ділянки», як він визначений у Кеботу (тобто приблизно залишки 24-34 (L1), 50-56 (L2) і 89-97 (L3) у варіабельної ділянки легкого ланцюга й 31-35 (H1), 50-65 (H2) і 95-102 (H3) у варіабельної ділянки важкого ланцюга (Kabat і ін., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5-ої изд., з Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991) і/або залишки з «гіперваріабельної петлі» (тобто приблизно залишки 26-32 (L1), 50-52 (L2) і 91-96 (L3) у варіабельної ділянки легкого ланцюга й 26-32 (H1), 53-55 (H2) і 96-101 (H3) у варіабельної ділянки важкого ланцюга (Chothia і Lesk, *J. Mol. Biol.* 196, 1987, сс. 901-917). У деяких випадках гіперваріабельна ділянка може включати як амінокислоти CDR-ділянки згідно Кеботу, так і амінокислоти гіперваріабельної петлі. Наприклад, CDRH1 важкого ланцюга антитіла 4D5 включає амінокислоти від 26 до 35.

«Каркасні ділянки» (далі позначені як FR) являють собою залишки варіабельної ділянки, відмінні від залишків CDR. Кожна варіабельна ділянка, як правило, містить чотири FR, позначених як FR1, FR2, FR3 і FR4. Якщо CDR визначають згідно Кеботу, то залишки FR легкого ланцюга являють собою залишки, що приблизно відповідають положенням 1-23 (LCFR1), 35-49 (LCFR2), 57-88 (LCFR3) і 98-107 (LCFR4), залишки FR важкого ланцюга являють собою залишки, що приблизно відповідають положенням у важкому ланцюзі 1-30 (HCFR1), 36-49 (HCFR2), 66-94 (HCFR3) і 103-113 (HCFR4). Якщо CDR містять амінокислотні залишки з гіперваріабельних петель, то залишки FR являють собою залишки, що приблизно відповідають положенням у легкому ланцюзі 1-25 (LCFR1), 33-49 (LCFR2), 53-90 (LCFR3) і 97-107 (LCFR4), і залишки FR у важкому ланцюзі являють собою залишки, що приблизно відповідають положенням у важкому ланцюзі 1-25 (HCFR1), 33-52 (HCFR2), 56-95 (HCFR3) і 102-113 (HCFR4). У деяких випадках, коли CDR містять як амінокислотні залишки CDR, що відповідають визначенню Кеботу, так і амінокислотні залишки гіперваріабельної петлі, то залишки FR повинні бути відповідним чином скоректовані. Наприклад, коли CDRH1 включає амінокислоти H26-H35, то залишки FR1 важкого ланцюга відповідають положенням 1-25, а залишки FR2 положенням 36-49.

У контексті даного опису поняття «набір кодонів» відноситься до набору різних послідовностей нуклеотидних триплетів, застосовуваних для кодування необхідних варіантів амінокислот. Набір олігонуклеотидів який можна синтезувати, наприклад, за допомогою твердофазного синтезу, може включати послідовності, які представляють всі можливі комбінації нуклеотидних триплетів, одержуваних за допомогою набору кодонів, і які повинні

кодувати необхідну групу амінокислот. Стандартною формою позначення кодона є код IUB, що відомий у даній області й представлений у даному описі. Набір кодонів, як правило, позначають 3 заголовними буквами, написаними курсивом, наприклад, *NNK*, *NNS*, *XYZ*, *DVK* і т.п. Таким чином, поняття «невипадковий набір кодонів» у контексті даного опису відноситься до набору кодонів, що кодує відібрані амінокислоти, які частково, переважно повністю, задовольняють критеріям відбору амінокислот, представленим у даному описі. Синтез олігонуклеотидів з відібраної «виродженістю» нуклеотидів у певних положеннях, добре відомий у даній області, наприклад, можна використати TRIM-підхід (Knapprek і ін., *J. Mol. Biol.* 296, 1999, сс. 57-86); Garrard і Henner, *Gene* 128, 1993, с. 103). Такі набори олігонуклеотидів, що мають певні набори кодонів, можна синтезувати з використанням наявних у продажі синтезаторів нуклеїнових кислот (наприклад, що надходять у продаж від фірми Applied Biosystems, Фостер Сіті, шт. Каліфорнія), або їх можна створювати на комерційних умовах (наприклад, на фірмі Life Technologies, Роквілл, шт. Меріленд). При цьому синтезований набір олігонуклеотидів, що мають конкретний набір кодонів, повинен, як правило, включати безліч олігонуклеотидів з різними послідовностями, розходженнями, створеними за допомогою набору кодонів у повній послідовності. Олігонуклеотиди, застосовувані відповідно до винаходу, мають послідовності, які придатні для гібридизації з матрицею, що представляє собою нуклеїнову кислоту варіабельної ділянки, і можуть включати також, але не обов'язково, сайти, розпізнавані рестриктазами, придатні, наприклад, для цілей клонування.

«Fv-фрагмент» являє собою мінімальний фрагмент антитіла, що містить повний сайт розпізнавання антигену й антигензв'язуючий центр антитіла. Цей фрагмент складається з димера, що включає одну варіабельну ділянку важкого ланцюга й одну варіабельну ділянку легкого ланцюга, які пов'язані з допомогою міцної асоціації, що по своїй природі може бути ковалентним зв'язком, як, наприклад, у випадку scFv. Саме в цій конфігурації три CDR кожної варіабельної ділянки взаємодіють із певним антигензв'язуючим центром на поверхні V_L - V_H -димера. Усього шість CDR або їх пиднабор обумовлюють специфічність антитіла відносно зв'язування з антигеном. Однак навіть одна варіабельна ділянка (або половина Fv, що включає тільки три CDR, специфічних відносно антигену) має здатність розпізнавати антиген і зв'язуватися з ним, хоча й з більшою низькою афінністю в порівнянні з повним єднальним сайтом.

«Fab-фрагмент» містить варіабельну й константну ділянку легкого ланцюга й варіабельну ділянку, і першу константну ділянку (CH1) важкого ланцюга. F(ab')₂-фрагменти антитіла містять пари Fab'-фрагментів, які, як правило, ковалентно зв'язані між собою поблизу їх карбоксильних кінців залишками цистеїну шарнірної ділянки. У даній галузі відомі також інші хімічні зв'язки фрагментів антитіла.

«Одноланцюгові Fv»- або «scFv»-фрагменти антитіла включають V_H - та V_L -області антитіла, де

ці області присутні у вигляді одноланцюгового поліпептидного ланцюга. Як правило, Fv-поліпептид додатково включає поліпептидний линкер між V_H - і V_L -областями, що надає scFv-фрагменту будова, необхідна для зв'язування з антигеном. Огляд даних, дотичних scFv, див. в Pluckthin в: *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, том 113, під ред. Rosenbrugg і Moore, з Springer-Verlag, New York, сс. 269-315, 1994.

Поняття «подвійні антитіла» відноситься до невеликих фрагментів антитіла із двома антигензв'язуючими центрами, ці фрагменти містять варіабельну ділянку важкого ланцюга (V_H), пов'язану з варіабельною ділянкою легкого ланцюга (V_L) в одному і том же поліпептидному ланцюзі (V_H - V_L). За допомогою линкера, що є занадто коротким, щоб дозволити відбуватися спарюванню між двома ділянками одному ланцюзі, відбувається примусове спарювання ділянок з комплементарними ділянками іншого ланцюга й створюються два антигензв'язуючих центри. Подвійні антитіла більш докладно описані, наприклад, в EP 404097; WO 93/11161 і в Hollinger і ін. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, Поняття «лінійні антитіла» відноситься до антитіла, описаним в Zapata і ін., *Protein Eng.* 8(10), 1995, сс. 1057-1062. У цілому, ці антитіла містять пари розташованих у вигляді тандема Fd-сегментів (V_H - C_H1 - V_H - C_H1), які в сполученні з комплементарними поліпептидами легкого ланцюга утворюють пари антигензв'язуючих ділянок. Лінійні антитіла можуть бути біспецифічними або моноспецифічними.

У контексті даного опису поняття «бібліотека» відноситься до безлічі послідовностей антитіла або фрагментів антитіла (наприклад, поліпептидів, пропонованих у винаході) або інших нуклеїнових кислот, які кодують ці послідовності, послідовності розрізняються по комбінації варіантів амінокислот, які інтродують у зазначені послідовності за допомогою способів, пропонованих у винаході.

«Фагова презентація» являє собою метод, при використанні якого варіанти поліпептидів презентують у вигляді білків, злитих щонайменше із частиною оболочечного білка, на поверхні фага, наприклад, натчатого фага, часток. Можливість застосування фагової презентації заснована на тому факті, що більші бібліотеки рандомізованих варіантів білків можна швидко й ефективно сортувати відносно послідовностей, які зв'язуються з високою афінністю з антигеном-мішенню. Презентацію пептидних і фагових бібліотек можна використати для скринінгу мільйонів поліпептидів відносно їх здатності до специфічного зв'язування. Методи, засновані на використанні полівалентних фагових дисплейних бібліотек, застосовували для презентації невеликих довільних пептидів і невеликих білків за допомогою злиттів або з геном III, або геном VIII натчатого фага (див. Wells і Lowman, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3, 1992, сс. 355-362 і процитовані в цій публікації посилання). При використанні презентації моновалентними фагами бібліотеку білків або пептидів зливають із геном III або його фрагментом і експресують при невисокому рівні в присутності білка гена III дикого типу, у результаті чого фагові частки презентують одну копію злитих білків або не презентують ні однієї

копії. Пов'язані з авидністю ефекти знижуються в порівнянні з варіантом, заснованому на застосуванні полівалентного фага, оскільки сортування проводять на основі властивості ліганду афінності й застосовують фагмідні вектори, які полегшують маніпуляцію із ДНК (Lowman і Wells, *Methods: A companion to Methods in Enzymology* 3, 1991, сс. 205-0216).

«Фагміда» являє собою плазмідний вектор, що має бактеріальний сайт ініціації реплікації, наприклад, *ColE1*, і копію інтергенної області бактеріофага. Фагмиду можна застосовувати з будь-яким відомим бактеріофагом, включаючи нитковий бактеріофаг і лямбдоїдний бактеріофаг. Плазмід, як правило, містить також селектуємий маркер для здійснення відбору по ознаці стійкості до антибіотиків. Сегменти ДНК, клоновані в таких векторах, можна розмножувати у вигляді плазмід. Коли клітини, що несуть зазначені вектори, постачені всіма генами, які необхідні для виробництва фагових часток, механізм реплікації плазмід змінюється на круговий цикл для створення копій одного ланцюга плазмідної ДНК і впакування фагових часток. Фагміди можуть утворювати інфекційні або неінфекційні фагові частки. Під це поняття підпадають фагміди, які містять ген фагового оболочечного білка або його фрагмент, пов'язаний з геном гетерологічного поліпептиду у вигляді генного злиття, у результаті чого гетерологічний поліпептид презентується на поверхні фагової частки.

Поняття «фаговий вектор» відноситься до двухлітцюгової реплікативної форми бактеріофага, що містить гетерологічний ген і володіє здатністю до реплікації. Фаговий вектор несе фаговий сайт ініціації реплікації, що забезпечує реплікацію фага й формування фагових часток. Фаг переважно являє собою нитковий бактеріофаг, такий як фаг M13, f1, fd, Pf3 або їхні похідні або лямбдоїдний фаг, такий як фаг лямбда, 21, phi80, phi81, 82, 424, 434 і т.д. або їхні похідні.

У контексті даного опису поняття «доступне для розчинника положення» відноситься до положення амінокислотного залишку варіабельних ділянок важких і легких ланцюгів вихідного антитіла або антигензв'язуючого фрагмента, що визначають на основі структури, ансамблю структури і/або змодельованої структури антитіла або антигензв'язуючого фрагмента, у якості потенційно доступного для розчинника й/або контакту з молекулою, такий як специфічний для антитіла антиген. Ці положення як правило, присутні в CDR і на зовнішній частині білка. Доступні для розчинника положення антитіла або антигензв'язуючого фрагмента, як вони представлені в даному описі, можна визначати за допомогою кожного із цілого ряду алгоритмів, відомих у даній області. Переважно доступні для розчинника положення визначають із використанням координат тривимірної моделі антитіла, переважно за допомогою комп'ютерної програми, такий як програма *InsightII* (фірма *Accelrys*, Сан-Дієго, шт. Каліфорнія). Доступні для розчинника положення можна визначати також за допомогою відомих у даній області алгоритмів (наприклад, Lee і Richards, *J. Mol. Biol.* 55, 1971, с. 379 і Connolly, *J. Appl. Cryst.* 16, 1983, с. 548). Визна-

чення доступних для розчинника положень можна здійснювати за допомогою програмного забезпечення, придатного для моделювання білків, і отриманої інформації про тривимірну структуру антитіла. Програмне забезпечення, яке можна застосовувати для цих цілей, включає програмне забезпечення *SYBYL Biopolymer Module* (фірма *Tripos Associates*). Як правило й переважно, для роботи алгоритму (програми) необхідно, щоб користувач увів параметр розміру, «розмір» зонда, що використовують для розрахунку, установлюють на рівні приблизно 1,4 Å або менший радіуси. Крім того, описане визначення доступних для розчинника положень і група методів з використанням програмного забезпечення, які можна здійснювати за допомогою персональних комп'ютерів (*Pacios, Comput. Chem.* 18(4), 1994, сс. 377-386).

«Ангіогенний фактор або агент» являє собою фактора росту, що стимулює розвиток кровоносних судин, наприклад, підсилює ангіогенез, ріст ендотеліальних клітин, підвищує стабільність кровоносних судин і/або підсилює утворення й розвиток судин і т.д. Наприклад, до ангіогенних факторів відносяться (але, не обмежуючись ними) *VEGF* і представники сімейства *VEGF*, *PIGF*, сімейство *PDGF*, сімейство факторів росту фібробластів (*FGF*), ліганди *TIE* (ангіопетини), ефрини, *Del-1*, фактори росту фібробластів: кислотний (*aFGF*) і лужний (*bFGF*), фоллостатин, колонієутворюючий фактор гранулоцитів (*G-CSF*), фактор росту гепатоцитів (*HGF*)/фактор розсіювання (*SF*), інтерлейкін-8 (*IL-8*), лептин, мідкин, нейропільні, плацентарний фактор росту, отриманий із тромбоцитів фактор росту епітеліальних клітин (*PD-ECGF*), тромбоцитарний фактор росту, насамперед, *PDGF-BB* або *PDGFR-бета*, плейотрофин (*PTN*), програнулін, проліферин, фактор-альфа росту, що трансформує (*TGF-альфа*), фактор-бета росту, що трансформує (*TGF-бета*), фактор-альфа некрозу пухлини (*TNF-альфа*) і т.д. До них відносяться також фактори, що підсилюють загоєння ран, такі як гормон росту, інсуліноподібний фактор-І росту (*IGF-I*), *VIGF*, епідермальний фактор росту (*EGF*), *CTGF* і представники цього сімейства й *TGF-альфа* й *TGF-бета* (див., наприклад, *Klagsbrun і D'Amore, Annu. Rev. Physiol.* 53, 1991, сс. 217-239; *Streit і Detmar, Oncogene* 22, 2002, сс. 3172-3179; *Ferrara і Alitalo, Nature Medicine* 5(12), 1999, сс. 1359-1364; *Tonini і ін., Oncogene* 22, 2003, сс. 6549-6556 (наприклад, у таблиці 1 перераховані відомі ангіогенні фактори); і *Sato, Int. J. Clin. Oncol.* 8, 2003, сс. 200-206).

Поняття «антиангіогенний агент» або «інгібітор ангіогенезу» відноситься до низькомолекулярної субстанції, полинуклеотиду, поліпептиду, виділеному білку, рекомбинантному білку, антитілу або кон'югатам або злитим білкам, які інгібують або безпосередньо, або побічно ангіогенез, утворення й розвиток судин або небажану проникність судин. Варто розуміти, що до антиангіогенних агентів відносяться агенти, які зв'язують й блокують ангіогенну активність ангіогенного фактора або його рецептора. Наприклад, антиангіогенний агент являє собою антитіло або іншого антагоніста ангіогенного агента, як він визначений вище, напри-

клад, антитіла до VEGF-A або рецептора VEGF-A (наприклад, KDR-рецептору або Fit-1-рецептору), антитіла-інгібітори PDGFR, такі як Gleevec™ (имітиніба мезилат). До антиангіогенних агентів відносяться також нативні інгібітори ангіогенезу, наприклад, ангіостатин, ендостатин і т.д. (див., наприклад, Klagsbrun і D'Amore, *Annu. Rev. Physiol.* 53, 1991, сс. 217-239; Streit і Detmar, *Oncogene* 22, 2003, сс. 3172-3179 (наприклад, у таблиці 3 представлені дані про антиангіогенну терапію злоякісної меланоми; Ferrara і Alitalo, *Nature Medicine* 5(12), 1999, сс. 1359-1364; Tonini і ін., *Oncogene* 22, 2003, сс. 6549-6556 (наприклад, у таблиці 2 перераховані відомі антиангіогенні фактори) і Sato, *Int. J. Clin. Oncol.* 8, 2003, сс. 200-206 (наприклад, у таблиці 1 перераховані антиангіогенні агенти, застосовувані в клінічних випробуваннях).

Поняття «VEGF» і «VEGF-A» у контексті даного опису відносяться до фактора, що складається з 165 амінокислот, росту судинних ендотеліальних клітин і родинним складають із 121, 189 і 206 амінокислот факторам росту судинних ендотеліальних клітин, як описано в Leung і ін., *Science*, 246, 1989, с. 1306 і в Housck і ін., *Mol. Endocrin.*, 5, 1991, с. 1806, а також до зустрічаючихся в природних умовах його аллельним і процесованим формам. Поняття «VEGF» відноситься також до VEGF з видів крім людини, таким як миші, щури або примати. Іноді VEGF з конкретних видів позначають як hVEGF у випадку людського VEGF, mVEGF у випадку мишачого VEGF і т.д. Поняття «VEGF» відноситься також до вкорочених форм поліпептиду, що містить амінокислоти 8-109 або 1-109 з 165 амінокислот людського фактора росту судинних ендотеліальних клітин. У контексті даного опису можна ідентифікувати будь-які такі форми VEGF, які при посиленні на них позначають, наприклад, як «VEGF (8-109)», «VEGF (1-109)» або «VEGF₁₆₅». Амінокислотні положення в «укороченому» нативному VEGF нумерують згідно нативної послідовності VEGF. Наприклад, амінокислоту в положенні 17 (метіонін) в укороченому нативному VEGF позначають також як амінокислоту в положенні 17 (метіонін) у нативному VEGF. Зкорочений нативний VEGF володіє афінністю до зв'язування з KDR- і Fit-1-рецепторами, порівнянної з нативним VEGF.

«Антитіло до VEGF» позначає антитіло, що зв'язується з VEGF з достатньої афінністю й специфічністю. Краще антитіло до VEGF, пропонуване у винаході, можна застосовувати як терапевтичний агент, мішенню якого є VEGF і який впливає на захворювання або стани, пов'язані з активністю VEGF. Як правило, антитіло до VEGF не повинне зв'язуватися з іншими гомологами VEGF, такими як VEGF-B або VEGF-C, а також з іншими факторами росту, такими як PIGF, PDGF або bFGF. Кращим антитілом до VEGF є моноклональне антитіло, що зв'язується з тим же епітопом, що й моноклональне антитіло до VEGF A4.6. 1, що продукується гібридомой ATCC HB 10709. Більше краще антитіло до VEGF являє собою рекомбінантне гуманізоване моноклональне антитіло до VEGF, створене відповідно до методу, описаному в Presta і ін., *Cancer Res.* 57, 1997, сс. 4593-4599,

включаючи (але, не обмежуючись ним) антитіло, відоме за назвою бевацизумаб (bevacizumab, BV; Avastin®).

Антитіло до VEGF «бевацизумаб (BV)», відоме також як «rhUMat VEGF» або «Avastin®», являє собою рекомбінантне гуманізоване моноклональне антитіло до VEGF, створене відповідно до методу, описаному в Presta і ін., *Cancer Res.* 57, 1997, сс. 4593-4599. Воно містить мутантні каркасні ділянки людського Ig1 і антигензв'язуючі гіперваріабельні ділянки мишачого моноклонального антитіла до hVEGF A.4.6.1, що блокує зв'язування людського VEGF з його рецепторами. Приблизно 93% амінокислотної послідовності бевацизумаба, включаючи більшу частину каркасних ділянок, одержують із людського Ig1, а приблизно 7% послідовності одержують із мишачого антитіла A4.6.1. Бевацизумаб має молекулярну масу приблизно 149000 Та і є глікозильованим.

Поняття «антагоніст VEGF» відноситься до молекули, що має здатність нейтралізувати, блокувати, інгібувати, анулювати, знижувати або впливати на види активності VEGF, включаючи зв'язування з одним або декількома рецепторами VEGF. Антагоністи VEGF являють собою антитіла до VEGF і їх антигензв'язуючі фрагменти, молекули рецепторів і похідні, які специфічно зв'язуються з VEGF, перешкоджаючи його зв'язуванню з одним або декількома рецепторами, антитіла до рецепторів VEGF і антагоністи рецепторів VEGF, такі як низькомолекулярні інгібітори тирозинкінази VEGFR.

Поняття «лікування» відноситься як до терапевтичного лікування, так і до профілактичних або превентивних мір. Пацієнти, які мають потребу в лікуванні, включають пацієнтів, які вже мають порушення, і тих, у яких варто попереджати появу порушення.

Поняття «порушення» означає будь-який стан, який можна полегшувати за допомогою лікування антитілом. Наприклад, воно застосовно до стану ссавців, у яких виявлений аномальний ангіогенез (надлишковий, невідповідний або неконтрольований ангіогенез) або проникність судин або до стану, що має потребу в профілактиці. До нього відносяться хронічні й гострі порушення або захворювання, включаючи такі патологічні стани, які провокують розвиток у ссавця розглянутого порушення. У контексті даного опису прикладами підлягаючому лікуванню порушень є (але, не обмежуючись ними) злоякісні й доброякісні пухлини; нелейкозні й лімфоїдні злоякісні захворювання; порушення, що зачіпають нейрони, глію, астроцити, гіпоталамус і інші залози, макрофаги, епітелій, струму й бластодерму; і запальні, ангіогенні й імунологічні порушення.

Аномальний ангіогенез має місце, коли ріст нових кровоносних судин є або надлишковим, або недостатнім, або невідповідним (наприклад, локалізація, час або початок ангіогенезу є небажаними з медичної позиції), при хворобливому стані або стані, що приводить до хворобливого стану. Надлишковий, недостатній або неконтрольований ангіогенез має місце, коли відбувається ріст нових кровоносних судин, що приводить до погіршення хворобливого стану або викликає хворобливий

стан, наприклад, при раку, насамперед при васкуляризованих щільних пухлинах і метастатичних пухлинах (включаючи рак ободочної кишки, рак легені (насамперед недрібноклітинний рак легені) або рак передміхурової залози), при захворюваннях, які викликаються неоваскуляризацією ока, насамперед при пов'язаній з діабетом сліпоті, ретинопатіях, насамперед при діабетичній ретинопатії або пов'язаній з віком дегенерації жовтої плями (AMD), псоріазі, псоріатическом артриті, гемангіобластоми, такий як гемангіома; при запальних хворобах бруньок, таких як гломерулонефрит, насамперед мезангіопроліферативний гломерулонефрит, гемолитический уремічний синдром, діабетична нефропатія або гіпертензивний нефросклероз; при різних запальних захворюваннях, таких як артрит, насамперед ревматоїдний артрит, запальне захворювання кишечника, псоріаз, саркоидоз, артеріальний артеріосклероз, і при захворюваннях, виникаючих після трансплантації, ендометріозі або хронічній астмі, і при більш ніж 70 інших станах. Нові кровоносні судини можуть жити уражені хворобою тканини, руйнувати здорову тканину, а у випадку раку нові судини можуть дозволяти пухлинним клітинам проникати в кровоток і заселяти інші органи (метастази пухлини). Недостатній ангиогенез має місце, коли відбувається неадекватний ріст кровоносних судин, що приводить до погіршення хворобливого стану, наприклад, при таких захворюваннях, як захворювання коронарної артерії, «удар» і вповільнене загоєння ран. Крім того, виразки, «удари» і серцеві приступи можуть бути результатом відсутності ангиогенезу, необхідного в нормі для природного загоєння ран. Даний винахід відноситься до лікування пацієнтів, які мають ризик розвитку вищевказаних захворювань.

Інші пацієнти, які є кандидатами для лікування антитілами або поліпептидами, пропонуваними у винаході, страждають або мають ризик розвитку таких станів, як аномальна проліферація фіброваскулярної тканини, рожеві вугри, синдром придбаного імунodefіциту, закупорка артерій, атрофический кератит, пов'язані з бактеріями виразки, хвороба Бехчета, стерпні кров'ю пухлини, обструктивне захворювання сонної артерії, хороїдальна неоваскуляризація, хронічне запалення, хронічне відшарування сітківки, хронічний увеїт, хронічне запалення склоподібного тіла (витрит), стан, пов'язаний із тривалим носінням контактних лінз, відторгнення трансплантата роговиці, неоваскуляризація роговиці, неоваскуляризація трансплантата роговиці, хвороба Крона, хвороба Ілза, епідемічний кератокон'юнктивит, пов'язані із грибами виразки, інфекції, пов'язані з герпесом простим, інфекції, пов'язані із що оперізує герпесом, синдроми гіперв'язкості, саркома Капоши, лейкоз, ліпідна дегенерація, хвороба Дайма, крайовий кератоліз, виразка Мурена, пов'язані з мікробами інфекції, відмінні від витівки, міопія, хвороба ока, пов'язана з неоваскуляризацією, уроджені ямки на диску зорового нерва, синдром Ослера-Вебера (хвороба Рандю-Вебера Ослера), остеоартрит, хвороба Педжета, запалення ресничного кружка (pars plana), пемфігоїд, филектенулез, поліартрит,

ускладнення після лазерного опромінення, інфекції, викликувані найпростішими, захворювання, викликуване Pseudoxanthoma elasticum, сухий кератит птеригія, радіальна кератотомія, неоваскуляризація сітківки, ретинопатія немовлят, реторентальна фіброплазія, саркоїд склерит, анемія серпоподібних еритроцитів, синдром Шегрена, щільні пухлини, хвороба Штаргардта, хвороба Стивенса-Джонсона, верхній лимбіческий кератит, сифіліс, системна червона волчанка, крайова дегенерація Терри, токсоплазмоз, травма, пухлини саркоми Юинга, пухлини необластоми, пухлини остеосаркоми, пухлини ретинобластоми, пухлини рабдіоміосаркоми, неспецифічний виразковий коліт, закупорка вен, дефіцит вітаміну А і саркоїдоз Вегенера, небажаний ангиогенез, асоційований з діабетом, паразитарними хворобами, аномальним загоєнням ран, гіпертрофією після хірургічного втручання, ушкодження або травми, інгібуванням росту волось, інгібуванням овуляції й формуванням жовтого тіла, інгібуванням імплантації й інгібуванням розвитку ембріона в матці.

Терапію з використанням антиангіогенних агентів можна застосовувати в цілому для лікування відторгнення трансплантата, запалення легень, нефротического синдрому, прееклампсії, перикардального випоту, наприклад, асоційованого з перикардитом, і плеврального випоту, захворювань і порушень, що характеризуються небажаною проникністю судин, наприклад, набряку, асоційованого з пухлинами головного мозку, асцитів, асоційованих зі злоскісним захворюванням, синдромом Мейгса, запаленням легені, нефротичним синдромом, перикардальним випотом, плевральним випотом, проникністю, асоційованою з серцево-судинними захворюваннями, такими як стан після інфаркту міокарда й «удару» і т.п.

Інші залежні від ангиогенезу захворювання, до яких відноситься даний винахід, являють собою ангиофіброму (аномальний стан кровоносних судин, що характеризується схильністю до кровотечі), неоваскулярну глаукому (розростання кровоносних судин в оці), артеріовенозні мальформації (аномальна взаємодія між артеріями й венами), переломи, що не зростаються (переломи, які не гояться), атеросклеротичні бляшки (затвердіння артерій), піогену гранулому (загальне ушкодження шкіри, що складає із кровоносних судин), склеродерму (форма захворювання сполучної тканини), гемангіому (пухлина, що складається із кровоносних судин), трахому (основна причина сліпоти в країнах третього миру), гемофілічні суглоби, судинні адгезії й гіпертрофічні фляки (аномальне формування рубця).

Поняття «рак» і «злоскісний» відносяться або описують фізіологічний стан у ссавців, що, як правило, характеризується неконтрольованим ростом клітин. Приклади раку включають (але, не обмежуючись ними) карциному, лімфому, бластоми, саркому й лейкоз. Більше конкретні приклади таких видів раку включають рак лускатих клітин, рак легень (включаючи дрібноклітинний рак легені, недрібноклітинний рак легені, аденокарциному легень й плоскоклітинний рак легень), перитонеальний рак, рак клітин печінки, рак шлунка (вклю-

чаючи шлунково-кишковий рак), рак підшлункової залози, гліобластома, рак шийки матки, рак яєчника, рак печінки, рак сечового міхура, гепатому, рак молочної залози, рак ободочної кишки, ректальний рак, колоректальний рак, карциному ендометрія або матки, карциному слинних залоз, рак нирки або ренальний рак, рак печінки, рак передміхурової залози, вульварний рак, рак щитовидної залози, печіночну карциному й різні типи раку голови й шиї, а також В-клітинну лімфому (включаючи низкою ступеня злоскісності/фолікулярну не-ходжкінську лімфому; NHL малих лімфоцитів (SL); середнього ступеня злоскісності/фолікулярну NHL; середнього ступеня злоскісності дифузійну NHL; високозлоскісну імунобластну NHL; високозлоскісну лімфобластну NHL; високозлоскісну дрібноклітинну небластомерну NHL; масову NHL; лімфому клітин мантиї; зв'язану зі СНІДом лімфому; і Вальденстрема макроглобулінемічну пурпуру; хронічний ліфоїдний лейкоз (CLL); гострий лімфобластний лейкоз (ALL); лейкоз волосяних клітин; хронічний мієлобластний лейкоз; і посттрансплантаційний лімфопроліферативний синдром (PTLD), а також аномальну проліферацію судин, асоційовану з факіоматозом, набряком (наприклад, асоційованим з пухлинами головного мозку), і синдром Мейгса.

Поняття «антинеопластична композиція» відноситься до композиції, яку можна застосовувати для лікування раку, що містить щонайменше одну терапевтичну діючу речовину, наприклад, «протираковий» агент. Прикладами терапевтичних агентів (протиракових агентів) є (але, не обмежуючись ними), наприклад, хімотерапевтичні агенти, інгібітори росту, цитотоксичні агенти, агенти, застосовувані в променевій терапії, антиангіогенні агенти, апоптозні агенти, антитулінові агенти й інші агенти, призначені для лікування раку, такі як антитіла до HER-2, антитіла до CD20, антагоніст епідермального фактора росту (EGFR) (наприклад, інгібітор тірозинкінази), інгібітор HER1/EGFR (наприклад, ерлотиніб (Tarceva™), інгібітори тромбозитарного фактора росту (наприклад, Gleevec™ (імаїнібі мезилат)), інгібітор COX-2 (наприклад, целекоксиб), інтерферони, цитокіни, антагоністи (наприклад, антитіла, що нейтралізують), які зв'язуються з однією або декількома з наступних мішеней: Erb2-, Erb3-, Erb4-, PDGFR-бета-, Bly-, APRIL-, BCMA- або VEGF-рецептор(и), TRAIL/Apo2, і інші біологічно активні й органічні хімічні агенти й т.д. Під обсяг винаходу підпадають також їхні комбінації.

Поняття «цитотоксичний агент» у контексті даного опису відноситься до субстанції, що інгібує або перешкоджає функції клітин і/або викликає руйнування клітин. Мається на увазі, що поняття включає радіоактивні ізотопи (наприклад, ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y і ^{186}Re), хімотерапевтичні агенти й токсини, такі, що володіють ферментативною активністю, як токсини бактеріального, грибового, рослинного або тваринного походження, або їхні фрагменти.

«Хімотерапевтичний агент» являє собою хімічну сполуку, що застосовують для лікування раку. Приклади хімотерапевтичних агентів включають алкілюючі агенти, такі як тіотепу й циклофосфамід

CYTOXAN®; алкілсульфонати, такі як бусульфан, імпросульфан і піпосульфан; азириди, такі як бензодопа, карбохуон, метуредопа й уредопа; етиленіміни й метиламеламіни, включаючи алтретамін, триетиленмеламін, триетиленфосфорамід, триетилентіофосфорамід і триметиллолмеламін; ацетогеніни (насамперед буллатацин і буллатацинон); камптотецин (включаючи синтетичний аналог топотекан); бріостатин; каллистатин; CC-1065 (включаючи його синтетичні аналоги адозелесин, карзелесин і бизелесин); криптофіцини (насамперед криптофіцин 1 і криптофіцин 8); доластатин; дуокарміцин (включаючи синтетичні аналоги KW-2189 і CB1-TM1); елеутеробін; панкреатистатин; саркодиктиин; спонгистатин; азотні аналоги гірчичного газу, такі як хлорамбуцил, хлорнафазин, хлорфосфамід, естрамусти, іфосфамід, мехлоретамін, гідрохлорид оксиду мехлоретаміна, мелфалан, новембіхсин, фенестерин, преднимустин, трофосфамід, урациловий аналог гірчичного газу; нітрозсечовини, такі як кармусти, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин і ранимусти; антибіотики, такі як енедіїнові антибіотики (наприклад, каліхеаміцин, насамперед каліхеаміцин гама II і каліхеаміцин омега1 (див., наприклад, Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33, 1994, ss. 183-186); динеміцин, включаючи динеміцин А; біфосфонати, такі як хлоронат; еспераміцин; а також неокарциностаїновий кремофор і родинні хромопротейнові енедіїнові хромофори, що володіють антибіотичними властивостями), аклаціномізин, актиноміцин, аутраміцин, азасерин, блеоміцини, кактиноміцин, карабіцин, карминоміцин, карзинофилін, хромоміцини, дактиноміцин, даунорубіцин, деторубіцин, 6-діаза-5-оксо-L-норлейцин, доксорубіцин ADRIAMYCIN® (включаючи морфолінодоксорубіцин, ціанморфолінодоксорубіцин, 2-пирролодоксорубіцин і дезоксидоксорубіцин), епірубіцин, езорубіцин, ідарубіцин, марцелломіцин, митоміцини, такі як митоміцин С, мікофенольну кислоту, ногаламіцин, оливоміцини, пепломіцин, потфіроміцин, пуроміцин, хеломіцин, родорубіцин, стрептонігрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, зорубіцин; антиметаболіти, такі як метотрексат і 5-фторурацил (5-ФУ); аналоги фолієвої кислоти, такі як денотерин, метотрексат, птероптерин, триметрексамт; пуринові аналоги, такі як флударабін, 6-меркаптопурин, тиаміприн, тiogуанин; піримідинові аналоги, такі як анцитабін, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабін, дидезоксиуредин, доксифлуридин, еноцитабін, флоксуридин; андрогени, такі як калустерон, дромостанолонпропіонат, епітіостанол, мепітіостан, тестостерон; антиадренергетики, такі як аміноглутетимід, митотан, трилостан; замінник фолієвої кислоти, такий як фролінова кислота; ацеглатон; альдофосфамід-дглікозид; амінолевулінову кислоту; енілурацил; амсакрин; бестрабуцил; бисантрен; едотраксамт; дефосфамін; демеколцин; діазихон; елфорнітин; еліптінію ацетат; епотилон; етоглюцид; галію нітрат; гідроксисечовину; лентинан; лонідаїнін; майтансіноїди, такі як майтансин і ансамітоцини; митогуазон; митоксантрон; мопіданмол; нитраерин; пентостатин; фенамет; пирарубіцин; лосокса-

нотрон; подофиллинову кислоту; 2-етилгідрозид; прокарбазин; полісахаридний комплекс PSK® (фірма JHS Natural Products, Еуген, шт. Орегон); ризоксан; ризоксин; сизофран; спірогерманий; тенуазонову кислоту; тріазихон; 2,2',2''-трихлортриетиламін; трихотецени (насамперед токсин Т-2, верракурин А, роридин А и ангуїдин); уретан; виндесин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид («Ага-С»); циклофосфамід; тиотепа; таксоиди, наприклад, паклітаксел TAXOL® (фірма Bristol-Myers Squibb Oncology, Принстон, шт. Нью-Джерсі), ABRAXANETM (не утримуюча кремофор створена на основі альбуміну композиція паклітаксела з розмірами часток порядку нанометра) (фірма American Pharmaceutical Partners, Шаумберг, шт. Іллінойс) і доцетаксел TAXOTERE® (фірма Rhone-Poulenc Rorer, Ентони, Франція); хлоранбуцил; гемцитабин GEMZAR®, 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; аналогі платини, такі як цисплатин і карбоплатин; винбластин; платину; етопозид (VP-16); ифосфамід; митоксантрон; винкристин; винорелбін NAVELBINE®, новантрон; тенипозид; едатрексат; дауноміцин; аміноптерин; кселоду; ібандронат; іринотекан (Camptosar, CPT-11) (включаючи схему лікування іринотеканом у сполученні з 5-ФУ й леуковорином); інгібітори PKC-альфа, Raf, H-Ras, EGFR (наприклад, ерлотиніб (Tarceva™)) і VEGF-A, які знижують клітинну проліферацію, і фармацевтично прийнятні солі, кислоти або похідні кожного із зазначених вище сполук.

Під це визначення підпадають також антигормональні агенти, які мають здатність регулювати або інгібувати дії гормонів на пухлині, їхніми прикладами є антиестрогени й селективні модулятори рецептора естрогену (SERM), включаючи, наприклад, тамоксифен (у тому числі тамоксифен NOLVADEX®), ралоксифен, дролоксифен, 4-гідрокситамоксифен, тріоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон і торемифен FARESTON®, інгібітори ароматази, які інгібують фермент ароматазу, що регулює продукування естрогена в наднирниках, такі, наприклад, як 4(5)-імідазоли, аміноглутетимід, мегестерола ацетат MEGASE®, Ексеместан AROMASIN®, форместан, фадрозол, ворозол RIVISOR®, летрозол FEMARA® і анастрозол ARIMIDEX®; а також анти-андрогени, такі як флутамід, нилутамід, бикалутамід, леупролід і гозерелін; а також троксацитабін (1,3-диоксолановий аналог нуклеозиду цитозину); антисмислові олігонуклеотиди, насамперед інгібуючі експресію генів шляхів передачі сигналу, які беруть участь у проліферації прикріплених клітин, таких, наприклад, як PKC-альфа, Raf і H-Ras; рибозими, такі як інгібітор експресії VEGF (наприклад, рибозим ANGIOZYME®) і інгібітор експресії HER2; вакцини, такі як застосовувані в генній терапії, на-

приклад, вакцина ALLOVECTIN®, вакцина LEUVECTIN® і вакцина VAXID®; PROLEUKIN® rIL-2; інгібітор топоізомерази 1 LURTOTECAN®; ABARELIX® rmRH; вінорелбін і еспераміцини (див. U.S. 4675187); і фармацевтично прийнятні солі, кислоти або похідні кожного з перерахованих агентів.

Поняття «проліки» у контексті даного опису означає попередник або похідне фармацевтично активної субстанції, які менш цитотоксичні для пухлинних клітин у порівнянні з вихідним лікарським засобом і мають здатність активуватися або перетворюватися в більше активну в порівнянні з вихідною формою за допомогою ферментів (див., наприклад, Wilman в: «Prodrugs in Cancer Chemotherapy», Biochemical Society Transactions, 14, 615-ий симпозіум у Белфасті, 1986, сс. 375-382; і Stella і ін. в: «Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery», Directed Drug Delivery, під ред. Borchardt і ін., з Humana Press, 1985, сс. 247-267). Проліки, пропоновані у винаході, включають (але, не обмежуючись ними) фосфатвміщуючі проліки, тиофосфатвміщуючі проліки, сульфатвміщуючі проліки, пептидвміщуючі проліки, модифіковані D-амінокислотою проліки, глікозильовані проліки, лактамвміщуючі проліки, проліки, що містять необов'язково заміщений феноксиацетамід, або проліки, що містять необов'язково заміщений фенилацетамід, 5-фторцитозин- і інші 5-фторуридинвміщуючі проліки, які можуть перетворюватися в більше активну цитотоксическую вільну лікарську форму. Приклади цитотоксических лікарських засобів, які можуть утворювати похідні у вигляді проліки для застосування відповідно до винаходу, включають (але, не обмежуючись ними) описані вище хіміотерапевтичні агенти.

«Виділена» молекула нуклеїновою кислоти являє собою молекулу нуклеїновою кислоти, що ідентифікована й відділена щонайменше від однієї молекули нуклеїнової кислоти-домішки, з якою вона звичайно зв'язана в природному джерелі нуклеїнової кислоти антитіла. Виділена молекула нуклеїнової кислоти відрізняється від тієї форми або набору, у яких вона перебуває в природних умовах. Таким чином, виділені молекули нуклеїнової кислоти відрізняються від молекул нуклеїнової кислоти, що існують у клітинах у природних умовах. Однак виділена молекула нуклеїнової кислоти включає молекулу нуклеїнової кислоти, що перебуває в клітинах, у яких у нормі відбувається експресія антитіла, наприклад, у випадку, якщо молекула нуклеїнової кислоти має локалізацію в хромосомі, відмінну від її локалізації в клітинах у природних умовах.

Виразження «контролюючі послідовності» відноситься до послідовностей ДНК, необхідним для експресії функціонально зв'язаної послідовності, що кодує, у певному організмі-хазяїні. Придатні для прокаріот контролюючі послідовності являють собою, наприклад, промотор, необов'язково операторну послідовність і сайт зв'язування рибосоми. Як відомо, в еукаріотичних клітинах присутні промотори, сигнали поліаденилювання й енхансери.

Нуклеїнова кислота «функціонально зв'язана», якщо вона перебуває у функціональному зв'язку з іншою нуклеотидною послідовністю. Наприклад, ДНК, що кодує предпослідовність або секреторну лідерну послідовність, функціонально пов'язана із ДНК, що кодує поліпептид, якщо вона Експресується у вигляді предбелка, що бере участь у секреції поліпептиду; промотор або енхансер функціонально пов'язаний з послідовністю, що кодує, якщо він впливає на транскрипцію послідовності; сайт зв'язування рибосоми функціонально пов'язаний з послідовністю, що кодує, якщо він розташований так, що може полегшувати трансляцію. Як правило, «функціонально зв'язаний» позначає, що зв'язані послідовності ДНК є суміжними, а у випадку секреторної лідерної послідовності є суміжними й перебувають у фазі зчитування. Однак енхансери не обов'язково повинні бути суміжними. Зв'язування здійснюється шляхом вбудовування лігуванням у придатні сайти рестрикції. Якщо такі сайти не існують, то відповідно до відомої практики застосовують синтетичні олігонуклеотидні адаптори або лінкери.

У контексті даного опису поняття «клітина», «клітинна лінія» і «клітинна культура» використовують взаємозамінно, і вони всі включають також потомство. Таким чином, поняття «трансформанти» і «трансформовані клітини» включають, насамперед, клітини, які є об'єктом винаходу, і виведені з них культури поза залежністю від кількості переносів. Варто розуміти також, що все потомство може не є точно ідентичним по складу ДНК через навмисні або випадкові мутації. Під обсяг винаходу підпадає мутантне потомство, що має такою ж функцію або біологічною активність, які відібрані в процесі скринінгу для вихідної трансформованої клітини. З контексту даного опису повинні бути очевидні варіанти, для яких можливі інші визначення.

Варіанти здійснення винаходу

Виробництво антитіл до NRP1

Даний винахід відноситься до нових антитіл до NRP1. У наступних розділах більш докладно описані приклади методів створення антитіл.

Нові антитіла до NRP1 одержують із використанням антигену NRP1, отриманого з різних видів ссавців. Переважно антиген являє собою людський NRP1 (hNRP1). Однак як антиген-мішень можна використати NRP з інших видів, таких як мишачий NRP1 (mNRP1). Антигени NRP з різних видів ссавців можна виділяти із природних джерел. В інших варіантах здійснення винаходу антиген створюють рекомбінантно або одержують за допомогою інших методів синтезу, відомих у даній області.

Відібрані антитіла, як правило, повинні володіти досить вираженою афінністю до зв'язування з антигеном NRP1. Наприклад, зв'язування антитіла з hNRP1 може характеризуватися значенням K_d не більш ніж приблизно 5нМ, переважно не більш ніж приблизно 2нМ і більш переважно не більш ніж приблизно 500пМ. Афінність антитіл можна визначати, наприклад, на основі аналізу резонансу поверхневого плазмона (такого як BIAcore-аналіз, описаний у прикладах); твердофазного імуофер-

ментного аналізу (ELISA); і конкурентних аналізів (наприклад, PIA).

Крім того, біологічну активність антитіла можна визначати за допомогою інших аналізів, наприклад, призначених для оцінки ефективності як терапевтичних агентів. Такі аналізи відомі в даній області й залежать від антигену-мішені й призначення антитіла. Їхніми прикладами є аналіз інгібування HUVEC (ендотеліальні клітини пупкової вени людини) (описаний нижче в прикладах); аналізи інгібування росту пухлинних клітин (описані, наприклад, в WO 89/06692); аналізи антитіло-обумовленої клітиннозалежної цитотоксичності (ADCC) і комплементзалежної цитотоксичності (CDC) (US 5500362); і аналізи агоністичної активності або гематопоезу (див. WO 95/27062).

Для скринінгу антитіл, які зв'язуються з конкретним епітопом антигену, що представляє інтерес, можна застосовувати загальноприйнятий аналіз перехресного блокування, описаний наприклад в: *Antibodies, A Laboratory Manual*, під ред. Harlow і David Lane, з Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. В альтернативному варіанті для рішення питання про те, чи зв'язується антитіло із являючим інтерес епітопом, можна використати епітопне картування, наприклад, описане в Champe і ін., *J. Biol. Chem.* 270, 1995, сс. 1388-1394.

Створення нових антитіл до NRP1 з фагових бібліотек синтетичних антитіл

Кращим варіантом здійснення винаходу є спосіб одержання й відбору нових антитіл до NRP1 за допомогою підходу, заснованого на використанні унікальної фагової дисплейної бібліотеки (фагової презентації). Цей підхід передбачає створення фагових бібліотек синтетичних антитіл з використанням як матриця однієї каркасної ділянки, створення достатньої розмаїтості у варіабельних ділянках, презентацію поліпептидів з різноманітними варіабельними дялками, відбір перспективних антитіл (антитіл-кандидатів), які володіють високою афінністю до антигену-мішені, тобто NRP1, і виділення відібраних антитіл.

Більше докладний опис методу фагової презентації можна виявити, наприклад, WO 03/102157, опублікованої 11 грудня 2003 р.

Відповідно до одного з об'єктів винаходу бібліотеки антитіл, застосовувані у винаході, можна одержувати шляхом мутації доступних для розчинника й/або положень, що характеризуються високою розмаїтістю, щонайменше в одному з CDR варіабельної ділянки антитіла. Можна змінювати шляхом мутації деякі або всі CDR за допомогою способів, представлених у даному описі. Відповідно до деяких варіантів здійснення винаходів може виявитися кращим створювати розмаїтість бібліотек антитіл шляхом мутацій положень в CDRH1, CDRH2 і CDRH3 з одержанням однієї бібліотеки або шляхом мутацій положень в CDRL3 і CDRH3 з одержанням однієї бібліотеки, або шляхом мутацій положень CDRL3 і CDRH1, CDRH2 і CDRH3 з одержанням однієї бібліотеки.

Можна створювати бібліотеку варіабельних ділянок антитіла, наприклад, що має мутації доступних для розчинника й/або положень, що характеризуються високою розмаїтістю, в CDRH1,

CDRH2 і CDRH3. Можна створювати іншу бібліотеку, що має мутації в CDRL1, CDRL2 і CDRL3. Ці бібліотеки можна застосовувати в сполученні один з одним для створення єднальних агентів, що володіють необхідної афінністю. Наприклад, після одного або декількох циклів селекції бібліотек важких ланцюгів відносно зв'язування з антигеном-мішенню, бібліотекою легких ланцюгів можна замінити популяцію агентів, що зв'язуються, важких ланцюгів з метою підвищення афінності сполучних агентів.

Переважаю бібліотеку створюють шляхом заміни вихідних амінокислот на варіанти амінокислот в CDRH3-ділянці варіабельної ділянки послідовності важкого ланцюга. Отримана бібліотека може містити безліч послідовностей антитіл, де розмаїтість послідовностей насамперед характерно для CDRH3-ділянки послідовності важкого ланцюга. Відповідно до одного з об'єктів винаходу бібліотеку створюють у контексті послідовності гуманізованого антитіла 4D5 або послідовності амінокислот каркасної ділянки послідовності гуманізованого антитіла 4D5. Переважаю бібліотеку створюють шляхом заміни щонайменше амінокислотних залишків (ак) 95-100 важкого ланцюга на амінокислоти, кодуємі набором кодонів *DVK*, де набір кодонів *DVK* застосовують для кодування набору варіантів амінокислот для кожного із зазначених положень. Прикладом олігонуклеотидного набору, який можна застосовувати для створення зазначених заміни, є послідовність (*DVK*)₇. У деяких варіантах здійснення винаходу бібліотеку створюють шляхом заміни залишків 95-100 ак на амінокислоти, кодуємі наборами кодонів *DVK* і *NNK*. Прикладом олігонуклеотидного набору, який можна застосовувати для створення зазначених заміни, є послідовність (*DVK*)₆ (*NNK*). В іншому варіанті здійснення винаходу бібліотеку створюють шляхом заміни залишків 95-100 ак на амінокислоти, кодуємі наборами кодонів як *DVK*, так і *NNK*. Прикладом олігонуклеотидного набору, який можна застосовувати для створення зазначених заміни, є послідовність (*DVK*)₅ (*NNK*). Іншим прикладом олігонуклеотидного набору, який можна застосовувати для створення зазначених заміни, є послідовність (*NNK*)₆. Інші приклади придатних олігонуклеотидних послідовностей фахівцеві у даній галузі може визначити на основі представлених у даному описі критеріїв.

В іншому варіанті здійснення винаходу різні конструкції CDRH3 застосовують для виділення високоафінних сполучних агентів і для виділення сполучних агентів для різних епітопів. Довжина CDRH3, створеного в цій бібліотеці становить від 11 до 13 амінокислот, хоча можна створювати ділянки, довжина яких відрізняється від зазначеної. Розмаїтість H3 можна розширювати за допомогою наборів кодонів *NNK*, *DVK* і *NVK*, а також у вигляді більше обмеженої розмаїтості на N і/або C-кінці.

Розмаїтість можна створювати в CDRH1 і CDRH2. Розмаїтість CDRH1 і H2 створюють за допомогою описаної стратегії, що забезпечує спрямований перенос до популяції миметиків антитіл, що зустрічаються в природних умовах, з модифікацією, що складається в тому, що фокус

розмаїтості більш точно відповідає розмаїтості, що зустрічається в природних умовах, у порівнянні з раніше описаним підходом.

Для урізноманітнення в CDRH3 можна конструювати безліч бібліотек з різною довжиною H3 і потім поєднувати їх для пошуку сполучних агентів до антигенів-мішеней. Безліч бібліотек можна поєднувати й сортувати з використанням відбору на твердій підкладці й методів сортування в розчині, як це описано раніше й буде представлено нижче в даному описі. Можна застосовувати цілий ряд стратегій сортування. Наприклад, одним з варіантів є сортування на мішені, пов'язаної із твердою підкладкою з наступним сортуванням у відношенні мітки, що може бути присутнім на злитому поліпептиді (наприклад, мітка анти-*g*) і потім здійснювати наступне сортування на мішені, пов'язаної із твердою підкладкою. В іншому варіанті бібліотеки можна сортувати спочатку на мішені, пов'язаної із твердою поверхнею, потім елюювані сполучні агенти сортувати на основі зв'язування в рідкій фазі (фазі розчину) з концентраціями, що знижуються, антигену-мішені. Застосування комбінацій різних методів сортування сприяє мінімізації відбору тільки володіють високим рівнем експресії послідовностей і сприяє відбору ряду різних високоафінних клонів.

З бібліотек можна виділяти сполучні агенти, що володіють високою афінністю до антигену-мішені, тобто NRP1. Обмежуюча розмаїтість в H1/H2-ділянці знижує виродженість приблизно в 10⁴-10⁵ разів і дозволяє одержувати більшу розмаїтість H3 для створення володіючих високою афінністю сполучних агентів. Застосування бібліотек з різним типом розмаїтості в CDRH3 (наприклад, з використанням *DVK* або *NVT*) забезпечує виділення сполучних агентів, які можуть зв'язуватися з різними епітопами антигенів-мішеней.

Афінність зв'язувальних речовин, виділених з об'єднаних описаних вище бібліотек, можна додатково підвищувати шляхом створення обмеженої розмаїтості в легкому ланцюзі. Відповідно до цього варіанта здійснення винаходу розмаїтість легкого ланцюга створюють за допомогою: в CDRL1 - амінокислоту в положенні 28 кодуємі RDT; амінокислоту в положенні 29 кодуємі RKT; амінокислоту в положенні 30 кодуємі RVW; амінокислоту в положенні 31 кодуємі ANW; амінокислоту в положенні 32 кодуємі THT; необов'язково амінокислоту в положенні 33 кодуємі CTG; в CDRL2 - амінокислоту в положенні 50 кодуємі KBG; амінокислоту в положенні 53 кодуємі AVC; і необов'язково амінокислоту в положенні 55 кодуємі GMA; в CDRL3 - амінокислоту в положенні 91 кодуємі TMT або SRT або ними обома; амінокислоту в положенні 92 кодуємі DMC; амінокислоту в положенні 93 кодуємі RVT; амінокислоту в положенні 94 кодуємі NHT; і амінокислоту в положенні 96 кодуємі TWT або YKG або обома.

В іншому варіанті здійснення винаходу створюють бібліотеку або бібліотеки з розмаїтістю в CDRH1-, CDRH2- і CDRH3-ділянках. У цьому варіанті здійснення винаходу розмаїтість в CDRH3 створюють із використанням H3-ділянок різної довжини й з використанням насамперед наборів ко-

донів XYZ і NNK або NNS. Бібліотеки можна створювати з використанням індивідуальних або згрупованих олігонуклеотидів або олігонуклеотиди можна поєднувати з одержанням піднабору бібліотек. Відповідно до цього варіанта здійснення винаходу бібліотеки можна сортувати відносно мішені, пов'язаної із твердою підкладкою. Клони, виділені в результаті декількох циклів сортування, можна піддавати скринінгу відносно специфічності й афінності за допомогою ELISA. Для оцінки специфічності клони можна піддавати скринінгу відносно необхідних антигенів-мішеней, а також інших, що не представляють собою мішень антигенів. Агенти, що зв'язуються з антигеном-мішенню NRP1, потім можна піддавати скринінгу у відношенні афінності з використанням оцінки конкурентного зв'язування в розчині за допомогою ELISA або за допомогою конкурентного спот-аналізу. Сполучні агенти, що характеризуються високою афінністю, можна виділяти з бібліотеки за допомогою наборів кодонів XYZ, одержання яких описане вище. Зазначені сполучні агенти можна легко з високим виходом одержувати у вигляді антитіл або антигензв'язуючих фрагментів антитіл у клітинній культурі.

У деяких варіантах здійснення винаходу може вимагатися створення бібліотек з більше широкою розмаїтістю довжин CDRH3-ділянки. Наприклад, може виявитися бажаним створення бібліотек, у яких CDRH3-ділянки складаються приблизно з 7-19 амінокислот.

Відповідно до зазначених варіантів здійснення винаходу, сполучні агенти, що характеризуються високою афінністю, виділені із зазначених бібліотек, легко одержувати з високим виходом у культурах бактеріальних і еукаріотичних клітин. Можна створювати вектори, призначені для простого видалення послідовностей, таких як gD-мітки, компоненти послідовностей вірусного оболонкового білка, і/або для додавання послідовностей константних ділянок для забезпечення одержання з високим виходом повнорозмірних антитіл або антигензв'язуючих фрагментів.

Бібліотеку, що несе мутації в CDRH3, можна поєднувати з бібліотекою, що містить варіантні версії інших CDR, наприклад, CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1 і/або CDRH2. Так, наприклад, в одному з варіантів здійснення винаходу бібліотеку CDRH3 поєднують із бібліотекою CDRL3, створеної в контексті послідовності гуманізованого антитіла 4D5, що має варіанти амінокислот у положеннях 28, 29, 30, 31 і/або 32, з використанням попередньо певних наборів кодонів. В іншому варіанті здійснення винаходу бібліотеку, що несе мутації в CDRH3, можна поєднувати з бібліотекою, що містить варіанти CDRH1 і/або CDRH2 варіабельних ділянок важкого ланцюга. В одному з варіантів здійснення винаходу бібліотеку CDRH1 створюють за допомогою послідовності гуманізованого антитіла 4D5, що має варіанти амінокислот у положеннях 28, 30, 31, 32 і 33. Бібліотеку CDRH2 можна створювати за допомогою послідовності гуманізованого антитіла 4D5, що має варіанти амінокислот у положеннях 50, 52, 53, 54, 56 і 58, з

використанням попередньо визначених наборів кодонів.

Мутантні антитіла до NRP1

Нове антитіло до NRP1, створене на основі фагових бібліотек, можна додатково модифікувати для одержання мутантних антитіл, що володіють поліпшеними фізичними, хімічними або біологічними властивостями в порівнянні з батьківським антитілом. Якщо застосовуваний аналіз являє собою аналіз біологічної активності, то мутантне антитіло переважно має біологічну активність в обраному аналізі, що щонайменше в 10 разів перевищує, переважно щонайменше в 50 перевищує й іноді щонайменше в 100 або 200 разів перевищує біологічну активність батьківського антитіла, установлену за допомогою такого ж аналізу. Наприклад, мутантне антитіло до NRP1 переважно володіє афінністю до зв'язування з NRP1, щонайменше в 10 разів більше сильної, переважно щонайменше в 20 разів більше сильної, більш переважно щонайменше в 50 разів більше сильної й іноді щонайменше в 100 або 200 разів більше сильної, чим афінність до зв'язування батьківського антитіла до NRP1.

Для створення мутантного антитіла інтродукують одну або кілька амінокислотних змін (наприклад, замін) у гіперваріабельні ділянки батьківського антитіла. В альтернативному або додатковому варіанті в батьківське антитіло можна інтродукувати одну або кілька змін (наприклад, замін) залишків каркасної ділянки, що приводить до поліпшення афінності до зв'язування мутантного антитіла з антигеном з інших видів ссавців. Прикладами залишків каркасної ділянки, придатних для модифікації, є залишки, які нековалентно безпосередньо зв'язуються з антигеном (Amit і ін., Science 233, 1986, сс. 747-753); взаємодіють/впливають на конформацію CDR (Chothia і ін., J. Mol. Biol. 196, 1987, сс. 901-917); і/або беруть участь в області контакту V_L-V_H (EP 239400B1). У конкретних варіантах здійснення винаходу модифікація одного або декількох зазначених залишків каркасної ділянки приводить до підвищення афінності до зв'язування антитіла з антигеном з інших видів ссавців. Наприклад, у зазначеному варіанті здійснення винаходу можна змінювати від приблизно 1 до приблизно 5 залишків каркасної ділянки. Іноді це може виявитися достатнім для одержання мутантного антитіла, придатного для застосування в доклінічних дослідках, навіть без зміни якої-небудь гіперваріабельної ділянки. Однак, як правило, мутантне антитіло повинне містити також зміна(и) гіперваріабельної ділянки. Залишки гіперваріабельної ділянки, які змінюють, можна змінювати довільно, особливо, коли вихідна афінність до зв'язування батьківського антитіла є такою, що довільно отримане мутантне антитіло можна легко відбирати шляхом скринінгу.

Однією з коштовних процедур одержання мутантних антитіл є «мутагенез на основі сканування аланіну» (Cunningham і Wells, Science, 244, 1989, сс. 1081-1085). Відповідно до цього методу один або кілька залишків гіперваріабельної ділянки замінюють на залишок(и) аланіну або поліаланіну, роблячи тим самим вплив на взаємозв'язок аміно-

кислот з антигеном з іншого виду ссавця. Той(ті) залишок(і) амінокислот гіперваріабельної ділянки, для яких установлена функціональна чутливість до заміні, потім піддають удосконаленню шляхом інтродукції додаткових або інших мутацій у сайтах, у яких роблять заміну. Таким чином, у той час як сайт, у який інтродукують варіант амінокислотної послідовності, є визначеним, не потрібно, щоб природа мутації *per se* була визначена. Несучі ala мутанти, отримані таким чином, піддають скринінгу

у відношенні їхньої біологічної активності з використанням представленого в даному описі аналізу.

Як правило, інтродукцію змін варто починати з консервативної заміни, такий як представлена нижче під заголовком «кращі заміни». Якщо такі заміни приводять до зміни біологічної активності (наприклад, афінності до зв'язування), то потім інтродукують більше істотні заміни, позначені як «прикладні заміни» у наведеній нижче таблиці, або інші заміни, описані нижче при посиланні на клас амінокислот, і потім продукти піддають скринінгу.

Кращі заміни

Вихідний залишок	Приклади заміні	Кращі заміни
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; asp; lys; arg	gln
Asp (D)	glu;	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; phe; ile	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	tyr
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; норлейцин	leu

Для досягнення ще більш істотних модифікацій біологічних властивостей антитіл здійснюють вибір заміні, які в значній мірі розрізняються по їхньому впливу на підтримку (а) структури каркаса поліпептиду в області заміни, наприклад, складчастості або спіральної конформації, (б) заряду або гідрофобності молекули в сайті-мішені або (в) розміру бічного ланцюга. Залишки, що зустрічаються в природних умовах, підрозділяють на групи на основі загальних властивостей бічних ланцюгів:

(1) гідрофобні: норлейцин, met, ala, val, leu, ile;
(2) нейтральні гідрофільні: cys, ser, thr, asn, gln;

(3) кислі: asp, glu;
(4) основні: his, lys, arg;
(5) залишки, які впливають на орієнтацію ланцюга: gly, pro; i

(6) ароматичні: trp, tyr, phe.

Неконсервативні заміни передбачають заміну представника одного із цих класів на представника іншого класу.

В іншому варіанті здійснення винаходу сайти, обрані для модифікації, піддавали дозріванню афінності за допомогою фагової презентації (див. вище).

Молекули нуклеїнових кислот, що кодують мутантні амінокислотні послідовності, одержують за допомогою різних методів, відомих у даній галузі.

Ці методи являють собою (але, не обмежуючись ними) мутагенез із використанням олігонуклеотидів (або сайтспрямований), ПЦР-мутагенез і касетний мутагенез раніше отриманої мутантної або немутантної версії батьківського антитіла. Кращим методом одержання мутантів є сайтспрямований мутагенез (див., наприклад, Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 1985, с.488).

У конкретних варіантах здійснення винаходу в мутанта антитіла повинен бути заміщений тільки один залишок гіперваріабельної ділянки. В інших варіантах здійснення винаходу заміщені двоє або більша кількість залишків гіперваріабельної ділянки батьківського антитіла, наприклад зроблене від приблизно 2 до приблизно 10 заміні залишків гіперваріабельної ділянки.

Як правило, мутант антитіла з поліпшеними біологічними характеристиками повинен мати амінокислотну послідовність, що щонайменше на 75% ідентична або подібна амінокислотній послідовності варіабельної ділянки важкого або легкого ланцюга батьківського антитіла, більш переважно щонайменше на 80%, більш переважно щонайменше на 85%, більш переважно щонайменше на 90% і найбільше переважно щонайменше на 95%. Ідентичність або подібність щодо зазначеної послідовності визначають як відсоток амінокислотних залишків у розглянутій послідовності (послідовно-

сті-кандидаті), ідентичних (тобто цей же залишок) або подібних (тобто амінокислотний залишок із цієї ж групи з позицій загальних властивостей бічного ланцюга, див. вище) залишкам батьківського антитіла, після лінеаризації послідовностей і інтродукції при необхідності проломів для досягнення максимального відсотка ідентичності послідовності. Ні N-кінцеві, ні C-кінцеві, ні внутрішні подовження, делеції або інсерції в послідовності антитіла поза варіабельної ділянки не повинні розглядатися як такі, що впливають на ідентичність або подібність послідовності.

Після одержання мутанта антитіла визначають біологічну активність молекули щодо батьківського антитіла. Як відзначалося вище, цей метод може включати визначення афінності до зв'язування й/або інших видів біологічної активності антитіла. У кращому варіанті здійснення винаходу панель мутантів антитіла одержують і піддають скринінгу у відношенні афінності до зв'язування з антигеном, таким як NRP1 або його фрагмент. Одне або кілька мутантних антитіл, обраних за допомогою такого початкового скринінгу, необов'язково піддають одному або декільком додатковим аналізам біологічної активності для підтвердження того, що мутантне(і) антитіло(а) з підвищеною афінністю до зв'язування можна дійсно застосовувати, наприклад, для доклінічних досліджень.

Відібраний(і) у такий спосіб мутант(и) антитіла можна піддавати додатковим модифікаціям, що, як правило, залежить від передбачуваного застосування антитіла. Такі модифікації можуть являти собою додаткову зміну амінокислотної послідовності, злиття з гетерологічним(ми) поліпептидом(ами) й/або ковалентні модифікації, описані нижче. Відносно змін амінокислотної послідовності, то приклади її модифікацій наведені вище. Наприклад, кожної із залишків цистеїну, що не беруть участі у підтримці відповідної конформації мутантного антитіла, також може бути замінений, як правило серином, з метою підвищення стійкості молекули до окислювання й попередження аномального перехресного зшивання. І навпаки, цистеїновий(і) зв'язок(и) можна вводити в антитіло для підвищення його стабільності (особливо, якщо антитіло являє собою фрагмент антитіла, такий як Fv-фрагмент). Інший тип амінокислотного мутанта має змінену схему глікозилювання. Для досягнення цього можна вилучати шляхом делеції один або декілька вуглеводних фрагментів, що є присутнім в антитілі, й/або додавати один або декілька сайтів глікозилювання, які в нормі не присутні в антитілі. Глікозилювання антитіл, як правило, відбувається за допомогою або N-зв'язування, або Про-зв'язування. N-зв'язування передбачає приєднання вуглеводного фрагмента до бічного ланцюга залишку аспарагіну. Трипептидні послідовності аспарагін-х-серин і аспарагін-х-треонін, де X позначає будь-яку амінокислоту крім проліну, являють собою розпізнавані послідовності, призначені для ферментативного приєднання вуглеводного фрагмента до бічного ланцюга аспарагіну. Так, присутність будь-який їх цих трипептидних послідовностей у поліпептиді створює потенційний сайт глікозилювання. О-зв'язане глікозилювання перед-

бачає приєднання одного із цукрів, таких як N-ацетилгалактозамін, галактоза або ксилоза, до гідроксиамінокислоті, найбільше часто до серину або треоніну, хоча можна застосовувати також 5-гідроксипролін або 5-гідроксилізін. Введення додаткових сайтів глікозилювання в антитіло можна здійснювати шляхом такої зміни амінокислотної послідовності, що приводить до того, що вона містить одну або декілька описаних вище трипептидних послідовностей (для сайту N-глікозилювання). Зміна також може являти собою додавання або заміну одного або декількох залишків серину або треоніну в послідовності вихідного антитіла (для сайтів О-глікозилювання).

Вектори, клітини-хазяї й методи рекомбінації

Антитіло до NRP1, пропоноване у винаході, можна одержувати рекомбінантно з використанням загальнодоступних методів і матеріалів.

Для рекомбінантного одержання антитіла до NRP1 кодуєчу його нуклеїнову кислоту виділяють і вбудовують у реплікований вектор для додаткового клонування (ампліфікація ДНК) або для експресії. ДНК, що кодує антитіло, легко виділяти або синтезувати за допомогою загальноприйнятих методик (наприклад, з використанням олігонуклеотидних зондів, які мають здатність специфічно зв'язуватися із ДНК, що кодує важкі й легкі ланцюги антитіла). Доступним є цілий ряд векторів. Вектори звичайно містять (але, не обмежуючись ними) один або декілька з наступних компонентів: сигнальну послідовність, сайт ініціації реплікації, один або кілька маркерних генів, енхансерний елемент, промотор і послідовність термінатора транскрипції.

(I) Компонент, що представляє собою сигнальну послідовність

Антитіло, пропоноване у винаході, можна одержувати за допомогою рекомбінації не тільки індивідуально, але також у вигляді поліпептиду, злитого з гетерологічним поліпептидом, що переважно являє собою сигнальну послідовність або інший поліпептид, що несе специфічний сайт розщеплення на N-кінці зрілого білка або поліпептиду. Обрана гетерологічна сигнальна послідовність переважно являє собою послідовність, що розпізнається й процесується (тобто розщеплюється сигнальною пептидазою) клітиною-хазяїном. Для прокаріотичної клітини-хазяїна, що не розпізнає й не процесує нативну сигнальну послідовність антитіла, сигнальну послідовність заміняють сигнальною послідовністю прокаріотичного організму, обраної, наприклад, із групи, що включає лідерні послідовності лужної фосфатази, пеніцилінази, Ipp або термостабільного ентеротоксину II. Для секреції із дріжджів нативну сигнальну послідовність можна замінити, наприклад, на лідерну послідовність інвертази дріжджів, лідерну послідовність α -фактора (включаючи лідерні послідовності α -фактора *Saccharomyces* і *Kluyveromyces*) або лідерну послідовність лужної фосфатази, лідерну послідовність глюкоамілази *C. albicans*) або сигнальну послідовність, описану в WO 90/13646. Для експресії в клітинах ссавців можна застосовувати сигнальні послідовності ссавців, а також вірусні

секреторні лідерні послідовності, наприклад, сигнальна послідовність у вірусу герпеса простого.

ДНК такої ділянки-попередника лігують у рамці зчитування із ДНК, що кодує антитіло.

(II) Компонент, що представляє собою сайт ініціації реплікації

Як експресійні, так і клонуючі вектори містять нуклеотидну послідовність, що дозволяє вектору реплікуватися в одній або декількох обраних клітинах-хазяїнах. Як правило, у клонуючих векторах така послідовність являє собою послідовність, що дозволяє вектору реплікувати незалежно від хромосомної ДНК хазяїна, і вона включає сайти ініціації реплікації або автономно репліковані послідовності. Такі послідовності добре відомі для різних бактерій, дріжджів і вірусів. Сайт ініціації реплікації із плазмиди pBR322 придатний для більшості грамнегативних бактерій, сайт ініціації плазмиди 2μ придатний для дріжджів, а різні вірусні сайти ініціації реплікації (OB40, вірусу поліоми, аденовірусу, VSV (вірус везикулярного стоматиту) або BPV (вірус папіломи великої рогатої худоби)) придатні для клонуючих векторів у клітинах ссавців. Як правило, компонент, що представляє собою сайт ініціації реплікації, не потрібно для експресійних векторів на основі послідовностей ссавців (як правило, можна застосовувати сайт ініціації OB40, оскільки він містить ранній промотор).

(III) Компонент, що представляє собою селектуємий ген

Експресійні й клонуючі вектори, як правило, можуть містити селектуємий ген, також позначуваний як селектуємий маркер. Як правило, селектуємі гени кодують білки, які (а) обумовлюють стійкість до антибіотиків або інших токсинів, таким як ампіцилін, неоміцин, метотрексат або тетрациклін, (б) доповнюють дефіцит ауксотрофності або (в) поповнюють живильні речовини, що мають вирішальне значення, які не надходять із комплексних середовищ, наприклад ген, що кодує D-аланінрацемазу для *Bacilli*.

Одним із прикладів схеми селекції є застосування лікарського засобу для припинення росту клітини-хазяїна. Ті клітини, які успішно трансформовані гетерологічним геном, продукують білок, що надає стійкість до лікарського засобу, і в результаті виживають при використанні такого режиму селекції. Прикладами лікарських засобів, застосовуваних для такої домінантної селекції, є неоміцин, мікофенольна кислота й гігромацин.

Іншими прикладами прийнятних селектуємих маркерів для клітин ссавців є маркери, які дозволяють ідентифікувати клітини, компетентні відносно здатності поглинати нуклеїнову кислоту, що кодує антитіло, такі як DHFR (дигідрофолатредуктаза), тімідинкіназа, металотіонеїн-I і -II, переважно гени металотіонеїну приматів, аденозиндеаміназа, орнітиндекарбоксилаза й т.д.

Наприклад, клітини, трансформовані селектуємим геном DHFR, спочатку ідентифікують шляхом культивування всіх трансформантів у культуральному середовищі, що містить метотрексат (Mtx), конкурентний антагоніст DHFR. Прийнятною клітиною-хазяїном, коли застосовують DHFR дико-

го типу, є лінія клітин яєчника китайського хом'ячка (CHO) з дефіцитом активності DHFR.

В іншому варіанті клітини-хазяї (насамперед хазяї дикого типу, які містять ендогенну DHFR), трансформовані або котрансформовані послідовностями ДНК, що кодують антитіло, білок DHFR дикого типу й інший селектуємий маркер, такий як аміноглікозид-3'-фосфотрансфераза (APH), можна відбирати по росту клітин у середовищі, що містить селектуємий агент для селектуємого маркера, наприклад, аміноглікозидний антибіотик, такий як, канаміцин, неоміцин або G418 (див. U.S. 4965199).

Прийнятний для застосування в дріжджах селектуємий ген являє собою ген *trp1*, що є присутнім в отриманій із дріжджів плазмиді YRp7 (Stinchcomb і ін., *Nature*, 282, 1979). Ген *trp1* є селектуємим маркером для мутантного штаму дріжджів, позбавленого здатності рости в середовищі з додаванням триптофану, наприклад штаму ATCC 44076 або PEP4-1 (Jones, *Genetics*, 85, 1977, с. 12). У результаті цього наявність пов'язаного з *trp1* ушкодження генома дріжджової клітини-хазяїна забезпечує ефективне оточення для виявлення трансформації по росту у відсутності триптофану. Аналогічно цьому штаму дріжджів з дефіцитом *Leu1* (ATCC 20,622 або 38,626) доповнюються відомими плазмідами, що несуть ген *Leu2*.

Крім того, вектори, отримані з кільцевої плазмиди pKD1 розміром 1,6 мкм, можна застосовувати для трансформації дріжджів р. *Kluveromyces*. Крім того, для *K. lacti* описана Експресійна система для напівпромислового одержання рекомбінантного телячого хімозину (Van den Berg, *Bio/Technology* 8, 1990, с. 135). Описані також мультікопійні експресійні вектори для секреції зрілого рекомбінантного людського сироваткового альбуміну за допомогою промислових штамів *Kluveromyces* (Fleeg і ін., *Bio/Technology* 9, 1991, сс. 968-975).

IV Компонент, що представляє собою промотор

Експресійні й клонуючі вектори, як правило, містять промотор, що розпізнається організмом-хазяїном і функціонально пов'язаною з нуклеїновою кислотою, що кодує антитіло. Промотори, які придатні для застосування в прокаріотичних клітинах-хазяїнах, являють собою промотор *rho*, промоторні системи β-лактамази й лактози, промоторні системи лужної фосфатази, триптофану (*trp*) і гібридні промотори, такі як промотор *tac*. Однак можна застосовувати також інші відомі бактеріальні промотори. Промотори, призначені для застосування в бактеріальних системах, містять також послідовність Шайна-Дальгарно (S.D.), функціонально пов'язану із ДНК, що кодує антитіло.

Відомі також промоторні послідовності, придатні для еукаріот. Фактично всі гени еукаріотичних організмів мають багату АТ ділянку, локалізовану на відстані приблизно 25-30 пар основ проти ходу транскрипції від сайту ініціації транскрипції. Виявлена також інша послідовність, розташована на відстані 70-80 основ від сайту початку транскрипції багатьох генів, що представляє собою CNCAAT-ділянку, у якій N може означати будь-який нуклео-

тид. На 3'-кінці більшості генів еукаріотичних організмів перебуває послідовність ААТААА, що може являти собою сигнал для додавання полі-А-хвоста до 3'-кінця послідовності, що кодує. Всі ці послідовності можна вбудовувати в еукаріотичні експресійні вектори.

Приклади промоторних послідовностей, які можна застосовувати в дріжджових клітинах-хазяїнах, включають промотори 3-фосфогліцераткінази або інших гліколітичних ферментів, таких як ендолаза, гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа, гексокіназа, піруватдекарбоксилаза, фосфоглюкокіназа, глюкозо-6-фосфатізомераза, 3-фосфогліцератмутаза, піруваткіназа, тріозофосфатізомераза, фосфоглюкозоізомераза й глюккіназа.

Інші промотори дріжджів, які являють собою індукційбельні промотори, що мають додаткову перевагу, пов'язані із транскрипцією, що контролюється умовами росту, є промоторні ділянки алкогольдегідрогенази 2, ізоцитохрома С, кислоти фосфатази, ферментів, що розщеплюють, пов'язаних з метаболізмом азоту, металтіонеїну, гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази й ферментів, відповідальних за утилізацію мальтози й галактози. Крім того, прийнятні вектори й промотори, які можна застосовувати при експресії в дріжджах, описані в EP 73657. У сполученні із промоторами дріжджів доцільно застосовувати також енхансери дріжджів.

Транскрипцію антитіла з векторів у клітинах ссавців-хазяїнах контролює, наприклад за допомогою промоторів, отриманих з геномів вірусів, таких як вірус полііоми, вірус віспи птахів, аденовірус (такий як аденовірус 2), вірус папіломи великої рогатої худоби, вірус саркоми птахів, цитомегаловірус, ретровірус, вірус гепатиту В и найбільше переважно вакуолізуючий мавпячий вірус 40 (ОВ40), з гетерологічних промоторів ссавців, наприклад промотору актину або промотору імуноглобуліну, і із промоторів теплового шоку за умови, що такі промотори сумісні із системами клітини-хазяїна.

Ранній і пізній промотори вірусу ОВ40 легко одержувати у вигляді рестрикційного ОВ40-фрагмента, що містить також сайт ініціації реплікації вірусу ОВ40. Негайно-ранній промотор людського цитомегаловірусу легко одержувати у вигляді рестрикційного HindIII Е-фрагмента. Система, призначена для експресії ДНК у хазяїв-ссавців за допомогою бичачого вірусу папіломи, описана в U.S. 4419446. Модифікація цієї системи описана в U.S. 4601978 (див. також в Reyes і ін., Nature 297, 1982, сс. 598-601 дані про експресію кДНК людського β -інтерферону в мишачих клітинах під контролем промотору тімідинкінази вірусу герпеса простого). В іншому варіанті як промотор можна застосовувати довгий кінцевий повтор вірусу саркоми Рауса.

(V) Компонент, що представляє собою енхансер

Транскрипцію ДНК, що кодує антитіло, пропонується в даному винаході, у вищих еукаріотичних організмах часто підвищують шляхом вбудовування у вектор енхансерної послідовності. Відомі ба-

гато які енхансерні послідовності генів ссавців (генів глобіну, еластази, альбуміну, α -фетопротеїну й інсуліну). Однак, як правило, застосовують енхансер вірусу еукаріотичної клітини. Прикладами є енхансер ОВ40, розташований на вилученій стороні сайту ініціації реплікації (пари основ 100-270), енхансер раннього промотору цитомегаловірусу, енхансер полііоми, розташований на вилученій стороні сайту ініціації реплікації, і енхансери аденовірусів (див. також в Yaniv, Nature 297, 1982, сс. 17-18 відомості про енхансерні елементи, призначені для активації еукаріотичних промоторів). Енхансер можна вбудовувати шляхом сплайсинга у вектор в 5'- або 3'-положення щодо послідовності, що кодує, антитіла, але переважно його поміщають у сайт, розташований в 5'-напрямку щодо промотору.

(VI) Компонент, що представляє собою термінатор транскрипції

Експресійні вектори, використовувані в еукаріотичних клітинах-хазяїнах (клітини дріжджів, грибів, комах, рослин, тварин, людей або вміщуюче ядро клітини інших багатоклітинних організмів), повинні містити також послідовності, необхідні для термінації транскрипції й стабілізації мРНК. Такі послідовності звичайно одержують із 5'- і іноді з 3'-нетрансльованих ділянок еукаріотичних або вірусних ДНК або кДНК. Ці ділянки містять нуклеотидні сегменти, транскрибовані у вигляді поліаденильованих фрагментів у нетрансльованій ділянці мРНК, що кодує антитіло. Одним із придатних як термінатор транскрипції компонентів є ділянка поліаденилювання бичачого гормону росту (див. WO94/11026 і описаний у ній експресійний вектор).

(VII) Селекція й трансформація клітин-хазяїв

Згідно із даним описом прийнятними клітинами-хазяїнами для клонування або експресії ДНК у векторах, є описані вище клітини прокариот, дріжджів або вищих еукаріот. Прийнятними для цієї мети прокариотами є (але, не обмежуючись ними) еукаріотичні бактерії (еубактерії), такі як грамнегативні або грампозитивні організми, наприклад, сім. Enterobacteriaceae, такі як Escherichia, наприклад, E. coli, Enterobacter, Erwinia, Klebsiella, Proteus, Salmonella, наприклад, Salmonella typhimurium, Serratia, наприклад, Serratia marcescens, і Shigella, а також Bacilli, такі як B. subtilis і B. licheniformis (наприклад, штам B. licheniformis 41P, описаний в DD 266710, опублікованої 12 квітня 1989 р.), Pseudomonas, такі як P. aeruginosa, і Streptomyces. Одним із кращих для клонування хазяїном є штам E. coli 294 (ATCC 31,446), хоча можна застосовувати й інші штами, такі як E. coli B, E. coli X1776 (ATCC 31,537) і E. coli W3110 (ATCC 27,325). Ці приклади дані з метою ілюстрації і їх не слід розглядати, як обмежуючі обсяг винаходу.

Крім прокариотичних організмів як хазяїнів для клонування або експресії векторів, які кодують антитіла, можна використати еукаріотичні мікроорганізми, такі як нитчаті гриби або дріжджі. Найбільш часто застосовуваним нижчим еукаріотичним мікроорганізмом-хазяїном є Saccharomyces cerevisiae або звичайні пекарські дріжджі. Однак широко доступні багато представників інших родів,

видів і штамів, такі як *Schizosaccharomyces pombe*; хазяї із сем. *Kluyveromyces*, такі, наприклад, як *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12,424), *K. bulgaricus* (ATCC 16,045), *K. wickerhamii* (ATCC 24,178), *K. waltii* (ATCC 56,500), *K. drosophilae* (ATCC 36,906); *K. thermotolerans* і *K. marxianus*; *Yarrowia* (EP 402226); *Pichia pastoris* (EP 183070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces*, такі як *Schwanniomyces occidentalis*; і нитчаті гриби, такі, наприклад, як *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* і хазяї р. *Aspergillus*, такі як *A. nidulans* і *A. niger*, і їх можна застосовувати згідно із даним винаходом.

Клітини-хазяї, які можна використати для експресії глікозильованого антитіла, одержують із багатоклітинних організмів. Прикладами клітин безхребетних є клітини комах, а також можна застосовувати клітини рослин. Були виявлені численні бакуловірусні штами і їхні варіанти й відповідні придатні для них як хазяїнів клітини комах-хазяїв, таких як *Spodoptera frugiperda* (гусениця), *Aedes aegypti* (комар), *Aedes albopictus* (комар), *Drosophila melanogaster* (плодова муха) і *Bombyx mori* (шовковичний хробак). Широко відомі різноманітні штами вірусів, які можна використати для трансфекції, наприклад варіант L-1 NPV *Autographa californica* і штам NPV *Bombyx mori* Bm-5, і такі віруси можна застосовувати згідно із даним винаходом як віруси, насамперед для трансфекції клітин *Spodoptera frugiperda*. Як хазяїнів можна використати культури рослинних клітин бавовнику, кукурудзи, картоплі, сої, петунії, томатів і тютюну.

Проте, найбільший інтерес представляють клітини хребетних і в цей час розмноження клітин хребетних у культурі (культура тканини) стало стандартною процедурою. Прикладами придатних як хазяїнів ліній клітин ссавців є лінія клітин нирки мавпи CV1, трансформована за допомогою OB40 (COS-7, ATCC CRL 1651); лінія клітин нирки ембріона людини (293 або клітини лінії 293, субкльоновані з метою вирощування в суспензійній культурі, Graham і ін., *J. Gen. Virol.*, 36, 1977, с. 59); клітини нирки дитинчати хом'ячка (BHK, ATCC CCL 10); клітини яєчника китайського хом'ячка-DHFR (CHO, Urlaub і ін., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 1980, с. 4216); клітини Сертолі миші (TM4, Mather, *Biol. Reprod.*, 23, 1980, сс. 243-251); клітини нирки мавпи (CV1, ATCC CCL 70); клітини нирки африканської зеленої мавпи (VERO-76, ATCC CRL-1587); клітини карциноми шийки матки людини (HELA, ATCC CCL 2); клітини нирки собаки (MDCK, ATCC CCL 34); клітини печінки бичачого щура (BRL 3A, ATCC CRL 1442); клітини легені людини (W138, ATCC CCL 75); клітини печінки людини (Hep G2, HB 8065); клітини пухлини молочної залози миші (MMT 060562, ATCC CCL51); клітини TRI (Mather і ін., *Ann als N.Y. Acad. Sci.*, 383, 1982, сс. 44-68); клітини MRC 5; клітини FS4 і лінія клітин гепатоми людини (Hep G2).

Клітини-хазяї трансформують за допомогою описаних вище експресійних або клонуючих векторів з метою виробництва антитіла й культивують у придатних живильних середовищах відповідним чином модифікованих для вбудовування індукуючих промоторів, відбору трансформантів або ампліфікації генів, що кодують необхідні послідовності.

ліфікації генів, що кодують необхідні послідовності.

(VIII) Культивування клітин-хазяїв

Клітини-хазяї, які використовують для одержання антитіла, пропонованого в даному винаході, можна культивувати в різних середовищах. Для культивування клітин-хазяїв можна використати наявні в продажі середовища, такі як середовище Хама F10 (фірма Sigma), мінімальне підтримуюче середовище (MEM, фірма Sigma), RPMI-1640 (фірма Sigma) і модифіковане по методу Дульбекко середовище Голка (DMEM, фірма Sigma). Крім того, як середовища для культивування клітин-хазяїв можна використати будь-які із середовищ, які описані в Ham і ін., *Meth. Enz.*, 58, 1979, с. 44; Barnes і ін., *Anal. Biochem.*, 102, 1980, с. 255; в U.S. 4767704, 4657866, 4927762, 4560655 або 5122468; в WO 90/03430, WO 87/00195; або в U.S. Re. 30985. Кожне із цих середовищ при необхідності можна доповнювати гормонами й/або іншими факторами росту (такими як інсулін, трансферин або епідермальний фактор росту), солями (такими як хлорид натрію, кальцій, магній і фосфат), буферами (такими як HEPES), нуклеотидами (такими як аденозин і тимідин), антибіотиками (такими як лікарський засіб гентаміцин (GENTAMYCIN™)), мікроелементами (тобто неорганічними сполуками, які звичайно присутні в кінцевих концентраціях, що перебувають у мікромолярному діапазоні) і глюкозою або еквівалентним джерелом енергії. Фахівцям в даній галузі повинно бути очевидно, що можна включати також будь-які інші необхідні добавки у відповідних концентраціях. Умови культивування, такі як температура, значення pH і т.п., являють собою умови, які використалися раніше для клітин-хазяїв, відібраних для експресії, і вони повинні бути очевидні фахівцям в даній галузі.

(IX) Очищення антитіл

При використанні методів рекомбінації антитіло може продукуватися усередині клітини, у периплазматичному просторі або безпосередньо виділятися в середовище. Якщо антитіло продукується усередині клітини, то на першій стадії видаляють, наприклад, за допомогою центрифугування або ультрафільтрації, що складає з окремих часток дебрис, або з клітин-хазяїв, або з лізованих фрагментів. В Carter і ін., *BioTechnology*, 10, 1992, сс. 163-167 описаний метод виділення антитіл, секретованих у периплазматичний простір *E. coli*. У цілому, метод полягає в наступному: клітинну масу у вигляді пасти піддають відтаванню приблизно протягом 30 хв у присутності ацетату натрію (pH 3,5), ЕДТК і фенолметилсульфонілфториду (ФМСФ). Клітинний дебрис можна видаляти центрифугуванням. Якщо антитіло секретується в середовище, супернатанти таких експресійних систем, як правило, спочатку концентрують за допомогою наявного в продажі фільтра для концентрування білків, наприклад пристрою для ультрафільтрації типу Amicon або Millipore Pellicon. На кожній з попередніх стадій для інгібування протеолізу можна додавати інгібітор протеази, такий як ФМСФ, а для попередження збільшення небажаних домішок можна додавати антибіотики.

Композицію антитіла, отриману із клітин, можна очищати, наприклад, хроматографією на гідроксилпатиті, гель-електрофезом, діалізом і афінною хроматографією, при цьому кращим методом очищення є афінна хроматографія. Можливість застосування протеїну А в якості афінного ліганда залежить від виду й ізотипа будь-якого Fc-фрагмента імуноглобуліну, що присутствуют в антитілі. Протеїн А можна використати для очищення антитіла, основою яких є людські важкі $\gamma 1$ -, $\gamma 2$ - або $\gamma 4$ -ланцюга (Lindmark і ін., J. Immunol. Meth., 62, 1983, сс. 1-13). Протеїн G рекомендується для застосування для всіх мишачих ізотипів і для людського $\gamma 3$ -ланцюга (Guss і ін., EMBO J., 5, 1986, сс. 1567-1575). Як матриця, з якої зв'язується афінний ліганд, найбільше часто застосовують агарозу, однак можна використати й інші матриці. Стійкі до механічних впливів матриці, такі як скло або полі(стиролдивініл)бензол з певним розміром пор, дозволяють досягати більше високих швидкостей потоку й більше короткого часу процесу в порівнянні з характеристиками, що досягають при використанні агарози. Якщо антитіло містить C_H3-домен, то для очищення можна використати смола типу Bakerbond ABX™ (фірма J.T. Baker, Філіппсбург, шт. Нью-Джерсі). Залежно від антитіла, що підлягає виділенню, можна застосовувати також інші методи очищення білка, такі як фракціонування на іонообмінній колонці, осадження етанолом, РХВР зі зверненою фазою, хроматографія на силікагелі, хроматографія на гепарині-SEPHAROSE™, хроматографія на аніоно- або катионообмінній смолі (наприклад на колонку з поліаспартамовою кислотою), хроматофокусування, ДСН-ПААГ і осадження сульфатом амонію.

Після кожної з попередніх стадій очищення суміш, що містить антитіло, що представляє інтерес, і домішки, можна піддавати хроматографії, заснованої на гідрофобній взаємодії, при низькому значенні рН із використанням буфера для елюції, що має значення рН приблизно від 2,5 до 4,5, хроматографію переважно здійснюють при низьких концентраціях солей (наприклад, з використанням приблизно 0-0,25М солей).

Фармацевтичні композиції

Терапевтичні композиції антитіла наготовлюють із метою їхнього зберігання шляхом змішання антитіла, що має необхідний ступінь чистоти, з неіонізуючими фармацевтично прийнятними носіями, ексципієнтами або стабілізаторами (Remington's Pharmaceutical Sciences, під ред. A. Osol, 1980) у формі ліофілізованих композицій або водних розчинів. Прийнятні носії, ексципієнти або стабілізатори повинні бути нетоксичними для реципієнтів у використовуваних дозах і концентраціях, вони включають буфери, такі як фосфатний, цитратний буфери, а також буфери на основі інших органічних кислот; антиоксиданти, включаючи аскорбінову кислоту й метіонін; консерванти (такі як хлорид октадецилдиметилбензил амонію; хлорид гексаметонію; хлорид бензалконію; хлорид бензетонію; фенол; бутиловий або бензиловий спирт; алкілпарабени, такі як метил- або пропілпарабен; катехол; резорцинол; циклогексанол; 3-пентанол і мета-крезол); поліпептиди з низькою

молекулярною масою (що містять менш приблизно 10 залишків); білки, такі як сироватковий альбумін, желатин або імуноглобуліни; гідрофільні полімери, такі як полівінілпиролідон; амінокислоти, такі як гліцин, глутамін, аспарагін, гістидин, аргінін або лізин; моносахариди, дисахариди й інші вуглеводи, включаючи глюкозу, манозу або декстрини; хелатуючі агенти, такі як ЕДТК; цукри, такі як сахароза, маніт, трегалоза або сорбіт; солеутворюючі протиіони, такі як натрій; вміщуючі метал комплекси (наприклад, комплекси Zn-білок); і/або неіонізуючі поверхнево-активні речовини, такі як TWEEN®, PLURONICS® або поліетиленгліколь (ПЕГ).

Композиції, пропоновані у винаході, можуть містити також більше однієї діючої речовини, якщо це необхідно для конкретного підлягаючого лікуванню показання, переважно речовини з додатковими видами активності, які не роблять негативного впливу один на одного. Наприклад, може виявитися бажаним додатково включати імунодепресант. Такі молекули повинні бути присутніми у комбінації в кількостях, ефективних для рішення поставленого завдання.

Діючі речовини можна включати також у мікрокапсули, наприклад, отримані за допомогою методів коацервації або межфазної полімеризації, наприклад у гідроксипропілметилцелюлозні або желатинові мікрокапсули й полі(метилметакрилатні) мікрокапсули відповідно, у колоїдні системи введення лікарського засобу (наприклад у ліпосоми, альбумінові мікросфери, мікроемulsії, наночастинки й нанокапсули) або в макроемульсії. Такі методи описані в Remington's Pharmaceutical Sciences, під ред. A. Osol, 1980.

Композиції, призначені для застосування *in vivo*, повинні бути стерильними. Це легко може бути досягнуте шляхом фільтрації через стерильні фільтруючі мембрани.

Можна наготовлювати композиції із пролонгованим вивільненням. Прийнятними прикладами композицій із пролонгованим вивільненням є напівпроникні матриці із твердих гідрофобних полімерів, що містять антитіло, при цьому матриці можуть являти собою продукт, що має певну форму, наприклад, плівки або мікрокапсули. Приклади матриць, які можна використати для пролонгованого вивільнення, включають поліефіри, гідрогелі (наприклад, полі(2-гідроксиетилметакрилат) або полі(вініловий спирт), полілактиди (U.S. 3773919), співполімери L-глутамінової кислоти й γ -етил-L-глутамату, співполімери етилену й вінілацетату, що не піддаються розкладанню, співполімери молочної кислоти й гліколевої кислоти, що розкладаються, такі як LUPRON DEPOT® (призначені для ін'єкції мікросфери, що складаються із співполімера молочної кислоти й гліколевої кислоти й ацетату леупроліду), і полі-D(-)-3-гідроксимасляну кислоту. У той час як такі полімери як співполімери етилену й вінілацетату й молочної кислоти-гліколевої кислоти, можуть забезпечувати вивільнення молекули протягом 100 днів, певні гідрогелі вивільняють білки протягом більше короткого проміжку часу. Коли капсульовані антитіла зберігаються в організмі протягом тривалого часу, може

відбуватися їхня денатурація або агрегація в результаті того, що вони піддаються дії вологості при температурі 37°C, що приводить до зниження біологічної активності й може приводити до зміни імуногенності. Можна створювати раціональні стратегії для стабілізації залежно від механізму цього процесу. Наприклад, якщо має місце механізм агрегації, що, як встановлено, обумовлений утворенням межмолекулярного S-S-зв'язку через тіо-дисульфідну заміну, то для досягнення стабілізації можна модифікувати сульфгідрильні залишки, здійснювати ліофілізацію з кислих розчинів, контролювати вміст води за допомогою відповідних добавок і створювати специфічні композиції полімерних матриць.

Терапевтичне застосування

Мається на увазі, що антитіло, пропонуване в даному винаході, можна застосовувати для лікування ссавця. Відповідно до одного з варіантів здійснення винаходу антитіло вводять ссавцеві крім людини, наприклад, для одержання даних доклінічних дослідів. Прикладами ссавців крім людини, яких можна піддавати обробці, є примати крім людини, собаки, кішки, гризуни й інші ссавці, яких використовують при здійсненні доклінічних дослідів. З використанням зазначених ссавців можна здійснювати моделювання на тваринні захворювання, що підлягає лікуванню за допомогою антитіла, що представляє інтерес. У кожному із зазначених варіантів здійснення винаходу на ссавці можна проводити дослідження з використанням зростаючих доз. Якщо антитіло являє собою антитіло до NRP1, то його можна вводити, наприклад, хазяїнові-гризунові, в організмі якого створена модель щільної пухлини.

У додатковому або альтернативному варіанті антитіло застосовують для лікування людини, наприклад, пацієнта, що страждає захворюванням або порушенням, на яке введення антитіла може робити сприятливу дію.

Даний винахід відноситься до антиангіогенної ракової терапії, нової стратегії лікуванні раку, спрямованої на інгібування розвитку кровеносних судин пухлини, що необхідно для доставки живильних речовин, які необхідні для підтримки росту пухлини. Оскільки ангіогенез бере участь, як у первинному, так і в її метастазуванні, антиангіогенне лікування, пропонуване у винаході, може інгібувати неопластичний ріст пухлини, попереджати також розвиток метастазів пухлини у вторинні ділянки, що дозволяє руйнувати пухлини за допомогою інших терапевтичних агентів. Прикладами раку, що підлягає лікуванню, є (але, не обмежуючись ними) карцинома, лімфома, бластома, саркома й лейкоз. Більше конкретні приклади таких видів раку включають рак лускатих клітин, рак легені (включаючи дрібноклітинний рак легені, недрібноклітинний рак легені, аденокарциному легені й плоскоклітинний рак легені), перитонеальний рак, рак клітин печінки, рак шлунка (включаючи шлунково-кишковий рак), рак підшлункової залози, гліобластоми, рак шийки матки, рак яєчника, рак печінки, рак сечового міхура, гепатому, рак молочної залози, рак ободочної кишки, ректальний рак, колоректальний рак, карциному ендометрію

або матки, карциному слинних залоз, рак нирки або ренальний рак, рак печінки, рак передміхурової залози, вульварний рак, рак щитовидної залози, печіночну карциному й різні типи раку голови й шиї, а також В-клітинну лімфому (включаючи низкою ступеня злоякісності/фолікулярну неходжкінську лімфому; NHL малих лімфоцитів (SL); середнього ступеня злоякісності/фолікулярну NHL; середнього ступеня злоякісності дифузійну NHL; високозлоякісну імунобластну NHL; високозлоякісну лімфобластну NHL; високозлоякісну дрібноклітинну небластомерну NHL; масову NHL; лімфому клітин мантиї; зв'язану зі СНІДом лімфому; і Вальденстрема макроглобулінемічну пурпуру; хронічний ліфоїдний лейкоз (CLL); гострий лімфобластний лейкоз (ALL); лейкоз волоскових клітин; хронічний мієлобластний лейкоз; і посттрансплантаційний лімфопроліферативний синдром (PTLD), а також аномальну проліферацію судин, асоційовану з факіоматозом, набряком (наприклад, асоційованим з пухлинами головного мозку) і синдромом Мейгса. Більш конкретно, типи раку, які можна лікувати в допомогою антитіла, пропонуваних у винаході, являють собою рак молочної залози, коло-ректальний рак, ректальний рак, недрібноклітинний рак легені, неходжкінську лімфому, рак почкових клітин, рак передміхуровий залози, рак печінки, рак підшлункової залози, саркому Капоши, карциноїдну пухлину, рак голови й шиї, меланому, рак яєчника, мезотеліому й розсіяну мієлому. Найбільше переважно спосіб, пропонуваний у винаході, застосовують для лікування в людей коло-ректального раку.

Мається на увазі, що при застосуванні для лікування різних захворювань, таких як пухлини, антитіла, пропонувані у винаході, можна поєднувати з іншими терапевтичними агентами, придатними для лікування таких же або аналогічних захворювань. При застосуванні для лікування раку антитіла, пропонувані в даному винаході, можна сполучити із загальноприйнятими протираковими шляхами лікування, такими як хірургічне втручання, променева терапія, хіміотерапія або їхні комбінації.

У конкретних об'єктах винаходу інші терапевтичні агенти, які можна застосовувати для спільної терапії раку в сполученні з антитілом, пропонувані у винаході, включають антиангіогенні агенти. Ідентифіковано цілий ряд антиангіогенних агентів, вони відомі в даній галузі й включають агенти, перераховані в Carmeliet і Jain, 2000.

В одному з об'єктів винаходу антитіло, пропонуване у винаході, застосовують у сполученні з антагоністом VEGF або антагоністом рецептора VEGF, такими як антитіла до VEGF, варіанти VEGF, фрагменти розчинного рецептора VEGF, аптамери, здатні блокувати VEGF або VEGFR, що нейтралізують антитіла до VEGFR, інгібітори тірозинкінази VEGFR і їхньої комбінації. В альтернативному або додатковому варіанті пацієнтові можна вводити спільно два або більшу кількість антитіла до NRP1. У більшє кращому варіанті здійснення винаходу антитіло до NRP1^A або антитіло до NRP1^B, пропонуване у винаході, застосовують у сполученні з антитілом до VEGF для одержання

адитивної або синергетичної дії. Кращими антитілами до VEGF є антитіла, які зв'язуються з тим же епітопом, що й антитіло до hVEGF A4.6.1. Більше краще антитіло до VEGF являє собою бевасизумаб або ранибизумаб.

У деяких об'єктах винаходу інші терапевтичні агенти, які застосовують у сполученні з антитілом, пропонованим у винаході, являють собою агоніст інших факторів, що беруть участь у рості пухлини, таких як EGFR, Erb2 (який називають також Her2) Erb3, Erb4 або TNF. Краще антитіло до NRP1, пропоноване у винаході, можна застосовувати в сполученні з низькомолекулярними інгібіторами тирозинкіназних рецепторів (RTKI), мішенню яких є один або декілька тирозинкіназних рецепторів, таких як рецептори VEGF, рецептори FGF, рецептори EGF і рецептори PDGF. У даній галузі відома значна кількість низькомолекулярних RTKI, що мають терапевтичне значення, включаючи (але, не обмежуючись ними) ваталаниб (PTK787), ерлотиніб (TARCEVA®), OSI-7904, ZD6474 (ZACTIMA®), ZD6126 (ANG453), ZD 1839, субінітиніб (SUTENT®), семаксаниб (SU5416), AMG706, AG 013736, імітиніб (GLEEVEC®), MLN-518, CEP-701, PKC-412, лапатиніб (GSK572016), VELCADE®, AZD2171, сорафеніб (NEXAVAR®), XL880 і CHIR-265.

Антитіло до NRP1, пропоноване у винаході, або індивідуально, або в сполученні із другим терапевтичним агентом (таким як антитіло до VEGF) можна застосовувати також у сполученні з одним або декількома хіміотерапевтичними агентами. У пропонованих у винаході способах комбінованої терапії можна застосовувати різні хіміотерапевтичні агенти. Наведений як приклад і не обмежуючий обсяг винаходу перелік хіміотерапевтичних агентів наведений у даному описі в розділі «Визначення».

Коли антитіло до NRP1 спільно вводять із другим терапевтичним агентом, то другий терапевтичний агент можна вводити першим перед антитілом до NRP1. Однак можна застосовувати також одночасне введення й уводити спочатку антитіло до NRP. Прийнятними дозами терапевтичного агента є дози, у яких його застосовують у цей час, або завдяки спільній дії (синергізм) можна знижувати дози агента й антитіла до NRP1.

Для профілактики або лікування хвороби відповідні дози антитіла повинні залежати від типу захворювання, що підлягає лікуванню, серйозності й перебігу хвороби, від того, чи вводять антитіло в превентивних або лікувальних цілях, що передують терапії, історії хвороби пацієнта й відповіді на антитіло, і вони призначаються лікарем. Антитіло можна вводити пацієнтові в процесі однієї або декількох серій лікування.

Залежно від типу й серйозності захворювання в якості початкової можливої дози антитіла для введення пацієнтові застосовують дозу приблизно від 1 мкг/кг до 50 мг/кг (наприклад, від 0,1 до 20 мг/кг), що використовують, наприклад, у вигляді однократної дози або у вигляді декількох роздільних доз, або вводять шляхом безперервної інфузії. Типова добова доза може варіюватися від приблизно 1 мкг/кг до приблизно 100 мг/кг залежно від зазначених вище факторів. У випадку повторних

введення протягом декількох днів або більше тривалого періоду часу залежно від стану лікування продовжують до досягнення необхідного рівня супресії симптомів хвороби. Однак можна використати інші схеми введення лікарського засобу. У кращому варіанті антитіло, пропоноване у винаході, вводять кожні 2-3 тижня в дозі, що становить від приблизно 5 до 15 мг/кг. Більш переважно таку схему введення лікарського засобу застосовують у сполученні з хіміотерапією як першочергова терапія для лікування метастатичного колоректального раку. У деяких об'єктах винаходу хіміотерапевтичний режим передбачає використання традиційного переривчастого введення високих доз. У деяких об'єктах винаходу хіміотерапевтичний агент вводять у більше низьких дозах і більш часто без переривання схеми застосування («метрономна хіміотерапія»). Успіх терапії, пропонованої у винаході, можна легко оцінювати за допомогою загальноприйнятих методів і аналізів.

Композицію антитіла варто включати в препаративну форму, розділяти на дози й уводити відповідно до належної медичної практики. Розглянувши в цьому зв'язку фактори включають конкретне порушення, яке лікують, конкретного хворого, що підлягає лікуванню, клінічний стан індивідуального пацієнта, причини порушення, області введення агента, метод введення, режим застосування й інші фактори, відомі практикуючим медичним працівникам. Поняття «терапевтично ефективна кількість» відноситься до кількості антитіла, яку варто вводити, керуючись зазначеними обставинами, і являє собою мінімальну кількість, необхідну для попередження, полегшення симптомів або лікування розглянутого захворювання або порушення. Антитіло не обов'язково, але в ряді випадків включають у препаративну форму в сполученні з одним або декількома агентами, застосовуваними в цей час для попередження або лікування розглянутого порушення. Ефективна кількість зазначених інших агентів залежить від кількості антитіла в препаративній формі, типу порушення або лікування й інших зазначених вище факторів. Їх, як правило, застосовують у тих же дозах і за допомогою шляхів введення, які зазначені вище, або в кількості, що становить приблизно від 1 до 99% від звичайно застосовуваних доз. Як правило, полегшення або лікування захворювання або порушення включає зниження одного або декількох симптомів або медичних проблем, асоційованих із захворюванням або порушенням. У випадку раку терапевтично ефективна кількість лікарського засобу повинна привести до одного або до комбінації наступних результатів: зниження кількості ракових клітин; зменшення розміру пухлини; інгібування (тобто зниження до певного ступеня й припинення) інфільтрації ракових клітин у периферичні органи; інгібування метастазування пухлини; інгібування певною мірою росту пухлини; і/або полегшення певною мірою одного або декількох симптомів, асоційованих з раком. Залежно від ступеня, у якій лікарський засіб може попереджати ріст і/або знищувати існуючі ракові клітини, воно може бути цитостатичними й/або цитотоксичними. У деяких варіантах здійснення винаходу композицію, про-

поновану у винаході, можна застосовувати для попередження виникнення або повторного прояву захворювання або порушення в індивідуума або ссавця.

Шляхи застосування в нетерапевтичних цілях

Антитіла, пропоновані у винаході, можна застосовувати як агенти для очищення афінною хроматографією. У цьому процесі антитіла іммобілізують на твердій підкладці, такій як смола Сефадекс (Sephadex) або фільтрувальний папір, за допомогою методів, відомих у даній галузі. Іммобілізоване антитіло приводить у контакт зі зразком, що містить антиген, що підлягає очищенню, і потім підкладку промивають прийнятним розчинником, що може видаляти практично весь матеріал у зразку за винятком підлягаючому очищенню антигену, що зв'язаний з іммобілізованим антитілом. І, нарешті, підкладку промивають іншим прийнятним розчинником, таким як гліциновий буфер із рН 5,0, що дозволяє відокремлювати антиген від антитіла.

Антитіла, пропоновані в даному винаході, можна застосовувати також для діагностичних аналізів, наприклад, для виявлення експресії антигену, що представляє інтерес, в конкретних клітинах, тканинах або сироватці.

Для діагностичного застосування антитіла, як правило, мітять за допомогою фрагмента, що виявляється. Численні доступні мітки, можна, як правило, групувати по наступних категоріях:

(а) радіоактивні ізотопи, такі як ^{35}S , ^{14}C , ^{125}I , ^3H і ^{131}I . Антитіло можна мітити радіоактивним ізотопом за допомогою методів, описаних, наприклад, в: *Current Protocols in Immunology*, т. 1 і 2, під ред. Coligen і ін., 1991, з Wiley-Interscience, New York, New York, Pubs., і радіоактивність можна оцінювати за допомогою сцинтиляційного лічильника;

(б) флуоресцентні мітки, з яких доступними є хелати рідко-земельних металів (хелати європію) або флуоресцеїн і його похідні, родамін і його похідні, дансил, лиссамін, фікоеритин і техасовий червоний (Texas Red). Флуоресцентні мітки можна кон'югувати із антитілом за допомогою методів, описаних, наприклад, в *Current Protocols in Immunology*, вище. Флуоресценцію можна оцінювати кількісно за допомогою флуориметру;

(в) відомі різні ферментно-субстратні мітки й в U.S. 4275149 представлений огляд деяких з них. Фермент, як правило, каталізує хімічну зміну хромогенного субстрату, що можна вимірювати за допомогою різних методів. Наприклад, фермент може каталізувати зміну кольору субстрату, що можна оцінювати спектрофотометрично. В іншому варіанті фермент може змінювати флуоресцентність або хемілюмінесценцію субстрату. Методи, призначені для кількісної оцінки зміни флуоресценції, описані вище. У результаті хімічної реакції хемілюмінесцентний субстрат стає чутливим до збудження електронами й може випромінювати світло, що можна оцінювати (наприклад, за допомогою хемілюмінометру), або стає донором енергії для флуоресцентного акцептора. Прикладами ферментативних міток є люциферази (наприклад, люцифераза світляка й бактеріальна люцифераза; U.S. 4737456), люцеферин, 2,3-

дигідрофалазиндіони, малатдегідрогеназа, уреаз, пероксидаза, така як пероксидаза із хрому (HRPO), лужна фосфатаза, β -галактозидаза, глюкоамілаза, лізоцим, оксидази сахаридів (наприклад, глюкозооксидаза, галактозооксидаза й глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа), оксидази гетероциклічних сполук (такі як урекази й ксантиноксидази), лактопероксидаза, мікропероксидаза й т.п. Методи кон'югації ферментів з антитілами описані в O'Sullivan і ін., *Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay*, в: *Methods in Enzym.*, під ред. J. Langone і Van Vunakis, з Academic press, New York, 73, 1981, сс. 147-166.

Прикладами комбінацій фермент-субстрат є, наприклад:

(I) пероксидаза із хрому (HRPO) і Н-пероксидаза як субстрат, де Н-пероксидаза окисляє попередник барвника (наприклад, ортофенілдиамін (OPD) або гідрохлорид 3,3',5,5'-тетраметилбензидину (TMB));

(II) лужна фосфатаза (ЩФ) і пара-нітрофенілфосфат як хромогенний субстрат; і

(III) β -D-галактозидаза (β -D-Gal) і хромогенний субстрат (наприклад, пара-нітрофеніл- β -D-галактозидаза) або флуорогенний субстрат 4-метилумбеллиферил- β -D-галактозидаза.

Фахівцям у даній області відомі численні інші комбінації фермент-субстрат (див. загальний огляд в U.S. 4275149 і 4318980).

У деяких випадках мітку кон'югують з антитілом опосередкованим чином. Фахівцям в даній галузі відомі шляхи досягнення цієї мети. Наприклад, антитіло можна кон'югувати із біотином і будь-якою міткою із зазначених вище трьох категорій можна кон'югувати із авідіном, і навпаки. Біотин зв'язується вибірково з авідіном і в результаті мітку можна кон'югувати із антитілом зазначеним опосередкованим чином. В іншому варіанті для здійснення опосередкованої кон'югації мітки з антитілом антитіло кон'югується з невеликим гаптенем (наприклад, дигоксином) і одну з міток зазначених вище різних типів кон'югують з антитілом до гаптenu (наприклад, антитілом до дигоксину). Таким шляхом здійснюють опосередковану кон'югацію мітки з антитілом.

В іншому варіанті здійснення винаходу антитіло не потрібно мітити і його присутність можна виявляти за допомогою міченого антитіла, з яким зв'язується антитіло.

Антитіла, пропоновані в даному винаході, можна застосовувати в будь-якому відомому методі аналізу, такому як конкурентні аналізи зв'язування, прямі й непрямі сендвич-аналізи й аналізи на основі імунопреципітації (Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, з CRC Press, Inc., 1987, сс. 147-158).

Конкурентні аналізи зв'язування засновані на здатності міченого стандарту конкурувати з аналізованим тестуємим чином за зв'язування з обмеженою кількістю антитіла. Кількість антигену в тестуємому зразку зворотно пропорційно кількості стандарту, що зв'язується з антитілами. Для полегшення визначення кількості зв'язаного стандарту антитіла, як правило, не солюбілізують до або після

ля конкурентного зв'язування, у результаті стандартне й аналізоване антитіло, пов'язане з антитілами, можна легко відокремлювати від незв'язаного стандартного й аналізованого антитіла, що залишилися.

Сендвич-аналізи передбачають застосування двох антитіл, кожне з яких має здатність зв'язуватися з різною імуногенною ділянкою або епітопом білка, що потрібно виявляти. При здійсненні сендвич-аналізу тестуємий аналізований зразок зв'язують із першим антитілом, що іммобілізовано на твердій підкладці, а потім друге антитіло зв'язують із аналізованим зразком, одержуючи тим самим нерозчинний комплекс, що складається із трьох частин (див., наприклад, U.S. 4376110). Саме друге антитіло можна мітити виявляємим фрагментом (прямі сендвич-аналізи) або його можна оцінювати за допомогою антитіла до імуноглобуліну, що мітять виявляємим фрагментом (непрямий сендвич-аналіз). Наприклад, одним з типів сендвич-аналізу є ELISA, у якому фрагмент, що виявляється, являє собою фермент.

Для здійснення імуногістохімії зразок пухлини може бути свіжоодрержаним або замороженим, або може бути залитий у парафін і фіксований за допомогою консерванту, такого, наприклад, як формалін.

Антитіла можна застосовувати також для діагностичних аналізів *in vivo*. Як правило, антитіло мітять за допомогою радіонукліду (такого як ^{111}In , ^{99}Tc , ^{14}C , ^{131}I , ^{125}I , ^3H , ^{32}P або ^{35}S) або барвники для того, щоб пухлину можна було локалізувати за допомогою імуносцинтиграфії.

В одному з варіантів здійснення винаходу спосіб виявлення NRP1 у біологічному зразку (наприклад, тканини, крові, сироватці, цереброспінальної рідини) або приготовленому біологічному зразку, може передбачати стадію приведення в контакт антитіла, пропонованого в даному винаході, зі зразком і оцінку зв'язування антитіла до NRP1 з NRP1 у зразку або визначення кількості антитіла до NRP1, пов'язаного з NRP1 у зразку. В іншому варіанті здійснення винаходу спосіб виявлення NRP1 в об'єкта дослідження передбачає стадію введення антитіла, пропонованого у винаході, об'єкту дослідження й оцінку зв'язування антитіла до NRP1 з NRP1 в організмі об'єкта дослідження або визначення кількості антитіла до NRP1, пов'язаного з NRP1, в організмі об'єкта дослідження (наприклад, людини, миші, кролика, щура й т.д.).

Діагностичні набори

Для зручності антитіло, пропоноване в даному винаході, може входити до складу набору, наприклад, його можна впаковувати в сполученні з реагентами в попередньо певних кількостях разом з інструкцією зі здійснення діагностичного аналізу. Якщо антитіло мітять за допомогою ферменту, але до складу набору повинні входити субстрати й кофактори, необхідні для ферменту (наприклад, попередник субстрату, що дає хромофор, що виявляє, або флуорофор). Крім того, у нього можуть входити інші добавки, такі як стабілізатори, буфери (наприклад, буфер, що блокує або буфер для лізису) і т.п. Відносні кількості різних реагентів можуть варіюватися в широких межах для одержання

концентрацій у розчині реагентів, у значній мірі оптимізованих для необхідної чутливості аналізу. Зокрема, реагенти можуть перебувати у вигляді сухих порошків, як правило, ліофілізованих, включаючи ексципієнти, які при розчиненні повинні привести до утворення розчину реагенти з відповідною концентрацією.

Вироби

Наступним варіантом здійснення винаходу є виріб, що містить продукти, застосовувані для лікування описаних вище порушень. Виріб являє собою контейнер і етикетку. Прийнятними контейнерами є, наприклад, банки, пухирці, шприци й лабораторні пробірки. Контейнери можна виготовляти з різних матеріалів, таких як скло або пластмаса. Контейнер містить композицію, ефективну для лікування конкретного стану, і може мати стерильний вхідний канал (наприклад, контейнер може являти собою пакет для внутрішньовенного розчину або пухирець, оснащений пробкою, яку можна проколуювати за допомогою голки для підшкірних ін'єкцій). Діюча речовина в композиції являє собою антитіло. Етикетка, що перебуває на контейнері або поміщена в нього, містить дані про те, що композицію можна застосовувати для зазначеного стану. Крім того, виріб може додатково містити другий контейнер з фармацевтично прийнятним буфером, таким як забуферений фосфатом фізіологічний розчин, розчин Рингера й розчин декстрози. Крім того, він може включати інші продукти, необхідні з комерційної точки зору й з погляду споживача, зокрема, інші буфери, розріджувачі, фільтри, голки й шприци, і листівку-вкладиш в упакованні з інструкцією із застосування.

Нижче винахід проілюстрований за допомогою прикладів, які дані тільки з метою ілюстрації здійснення на практиці даного винаходу й не обмежують його обсяг. Зміст всіх процитованих в описі патентів і наукової літератури спеціально у всій повноті включено в даний опис як посилання.

Приклади

Приклад 1. Одержання антитіл до NRP1

А. Створення фагових бібліотек антитіл

У даній галузі відомі різні методи створення бібліотек антитіл, які презентуються на фагі або презентуються за допомогою інших технологій. Одною з переваг таких бібліотек у порівнянні із загальноприйнятими технологіями на основі гібридом є те, що вони добре пристосовані для створення міжвидових функціональних антитіл, оскільки дозволяють здійснювати *in vitro* селекцію й скринінг без інтродукції імунної толерантності (Smith, Science 228, 1986, ss. 1315-1317; Bradbury i Marks, J Immunol Methods 290, 2004, ss. 29-49).

У цілому, розроблено два типи комбінаторних бібліотек антитіл, які відрізняються джерелом спектра (популяції) антитіл. До теперішнього часу більшість бібліотек являють собою бібліотеки «антитіл, що зустрічаються в природних умовах», у яких використовують популяції, що зустрічаються в природних умовах, як джерело її розмаїтості, при цьому гени у вигляді матричної РНК імуноцитів з несенсибілізованих або імунізованих тварин або людей ампліфікують і клонують у векторі для фагової презентації або іншій технології презентації,

такий як презентація рибосомою або дріжджовими клітинами. Антитіла, що зустрічаються в природних умовах, як правило, мають кілька каркасних ділянок, які в сполученні з послідовностями CDR варіабельних ділянок і отриманими в результаті рекомбінації легким ланцюгом і важким ланцюгом створюють розмаїтість бібліотеки. Розмір бібліотеки визначає характеристики бібліотек, оскільки розмір популяції звичайно істотно перевищують розмір бібліотеки. З іншого боку, синтетична бібліотека являє собою нову лінію бібліотеки, у якій розмаїтість створюють і вбудовують у бібліотеку за допомогою синтетичної ДНК. Можна використати один або безліч каркасних ділянок. Для бібліотеки на основі однієї каркасної ділянки джерело розмаїтості залежить тільки від виродженості синтетичної ДНК, сконструйованої для створення різноманітних CDR-петель. Як розмаїтість, так і розмір бібліотек мають вирішальне значення для характеристик бібліотеки, які можна оцінювати по афінності антитіл, виявлених з використанням бібліотек (Knappik і ін., *J. Mol. Biol.* 296, 2000, сс. 57-86; Sheets і ін., *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 1998, сс. 6157-6162; de Haard і ін., *J. Biol. Chem.* 274, 1999, сс. 18218-18230).

Шляхом інтродукції штучної розмаїтості в доступні для розчинника положення в гіперваріабельних ділянках (CDR) варіабельної ділянки важкого ланцюга Lee зі співавторами розробили фагову дисплейну бібліотеку синтетичних антитіл на основі однієї людської каркасної ділянки (VL_{каппа} I, VH_{підгрупа III}) (Sidhu і ін., *J. Mol. Biol.* 338, 2004, сс. 299-310; Lee і ін., *J. Mol. Biol.* 340, 2004, сс. 1073-1093; Carter і ін., *Proc Natl Acad Sci USA*, 89, 1992, сс. 4285-4289). Така «VH-бібліотека» призначена для презентації бівалентного антигензв'язуючого фрагмента (Fab'2) і в ній використовуються постачені хвостом кодони для імітації розмаїтості, що зустрічається в природних умовах, характерного для людського імуноглобуліну (Lee і ін., *J. Immunol Methods* 284, 2004, сс. 119-132). Якщо VH-бібліотека дозволяє одержувати гарні результати при оцінці афінності й функції виведених антитіл, то можна створювати в бібліотеці додаткові модифікації, необхідні для створення функціональних антитіл до певних представляючих інтерес антигенів-мішеней. Відомі в цей час тринуклеотиди, призначені для синтезу олігонуклеотидів, дозволяють підвищувати розмаїтість амінокислот без збільшення розмаїтості ДНК. У такий спосіб створена, як описано в даному винаході, нова «VH/VL-бібліотека», у якій високо варіабельні положення в CDR-L3 одержали додаткову розмаїтість, оскільки CDR-H3 і CDR-L3 формують внутрішню сферу антигензв'язуючого центра (Mian і ін., *J. Mol. Biol.* 217, 1991, сс. 133-151).

Матеріали й методи

Створювали несенсибілізовану матрицю VH/VL бібліотеки з консенсусними CDR-L1, -L2, -L3, -H1 і -H2 за допомогою сайтнаправленого мутагенезу з використанням олігонуклеотидів на фагміді p0350-4 зі стоп колонами на CDR-H3 і використали для бівалентної презентації на поверхні часток бактеріофага M13 (Lee і ін., *J. Mol. Biol.*, 340, 2004, сс. 1073-1093). Фагові дисплейні

бібліотеки конструювали за допомогою мутагенезу, описаного в Kunkel (Kunkel і ін., *Methods Enzymol* 204, 1991, сс. 125-139), для цієї мети створювали суміші мутагенних олігонуклеотидів для інтродукції мутацій у створені сайти в CDR-L3, -H1, -H2 і -H3 і репарації стоп-кодонів CDR-H3. Реакційними сумішами для мутагенезу (~10 мкг ДНК) трансформували шляхом електропорації клітини *E. coli* SS320 (~10¹¹ клітин) відповідно до відомого методу (Sidhu і ін., 2004).

Результати

Представлена в даному описі VH/VL-бібліотека заснована на використанні виведеної з Herceptin® каркасної ділянки VL_{каппа} I і VH_{підгрупа III}, що застосовували для VH-бібліотеки, для якої встановлена здатність ефективно презентуватися на бактеріофагу, ефективно експресується в *E. coli* і яку можна швидко перетворювати в повнорозмірний Ig, ефективно експресуючийся в клітинах ссавців (Lee і ін., *J. Mol. Biol.* 340, 2004, сс. 1073-1093; Carter і ін., *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 1992, сс. 4285-4289). Бібліотеки презентувалися на поверхні фага у вигляді бівалентного Fab (Fab'2), злитого з фаговим оболонковим білком P3. Така бівалентна презентація призначена для збільшення видимих афінностей до зв'язування з імобілізованими антигенами й сприяє підвищенню виходу рідких або володіючих низкою афінністю фагових клонів антитіл.

Для того, щоб уникнути можливих помилок, пов'язаних з виведеними з Herceptin® послідовностями CDR, що зберігаються в легкому ланцюзі VH-бібліотеки, консенсусні послідовності CDR каппа I інтродукували в матрицю VH/VL-бібліотеки. Консенсусні залишки CDR визначали шляхом відбору амінокислот, що найбільше часто зустрічаються, що є присутніми у людських антитілах, що зустрічаються в природних умовах. Аналогічно цьому стоп-кодони, застосовувані раніше у важкому ланцюзі VH-бібліотеки для гарантії мутагенезу у всіх трьох CDR, заміняли консенсусними послідовностями підгрупи III в CDR-H1 і CDR-H2. Консенсусні послідовності CDR представлені амінокислотами, що найбільше часто зустрічаються в кожному положенні. CDR-H3 відіграє основну роль у розпізнаванні антигену, тому кілька стоп-кодонів були замінені в H3 для гарантії того, що функціональна активність клонів антитіл з бібліотек буде відрізнятися друг від друга (Xu і ін., *Immunity* 13, 2002, сс. 37-45). Присутність людських консенсусних послідовностей CDR, як очікується, повинне дозволити частково мутантним варіантам (у які замінені не всі необхідні CDR) презентуватися й зберігати потенційну здатність до зв'язування. При такому підході VH/VL-конструкція має перевагу з погляду підвищення співвідношення функціональних фагових клонів антитіл у бібліотеці. Застосовувані послідовності CDR являли собою SSSYL для CDR-L1 (положення 28-33), GASSRA для CDR-L2 (положення 50-55), YYSSPL для CDR-L3 (положення 91-96), FTFSSYAMS для CDR-H1 (положення 27-35) і RISPSSGGSTY для CDR-H2 (положення 50-58) і WXXXRPXXMDY для CDR-H3 (положення 95-102, X позначає стоп-кодон), які представлені в таблиці

I. У таблиці I показана також перевага кожного положення в людських антитілах.

Розмаїтість в VH/VL-бібліотеці інтродукували в піднабір положень CDR на основі високої доступності для розчинника й/або особливо високої варіабельності в послідовностях, що зустрічаються в природних умовах, антитіл. Інтродуковані положення, обрані для мутагенезу й введення розмаїтості, представлені в таблиці II. Наприклад, в CDR-H1 для введення розмаїтості були обрані положення 27, 28, 30, 31, 32, 33 і 34. При створенні VH/VL-бібліотеки вироджені олігонуклеотидні кодони або тринуклеотиди використали для введення розмаїтості в кожне положення, так, щоб у ньому були представлені амінокислоти, що найбільше часто зустрічаються. Наприклад, в CDR-H1 (положення 30) на частку серіну доводиться приблизно 50% розмаїтості, що зустрічається в природних умовах, тому використали суміш тринуклеотидів (XI), що кодує приблизно 52% серіну й 2,5% інших амінокислот крім цистеїну.

CDR-H3 и CDR-L3 формують центр антигензв'язуючої ділянки и тому більш за все часто відбуваються контакти з антигеном в комплексах антитіло-антиген з відомою структурою (Chothia и др., Nature 342, 1989, сс. 877-883). Вільно обирали п'ять залишків в CDR-L3 (таблиця II) з найбільш високою варіабельністю. В цілому, CDR-H3 характеризується високим різноманіттям з позицій довжини, послідовності й структури, та він являє собою собою основний компонент різноманіття в антитілах, котрі зустрічаються в природних умовах (Xu и Davis, Immunity 13, 2000, сс. 37-45; Wu й ін., Proteins 16, 1993, 1-7). Так, було сконструйовано 12 підбібліотек з різними довжинами CDR-H3, варіюючими від 9 до 20 амінокислот. Сумарно ws підбібліотеки охоплювали приблизно 90% різноманіття варіації довжин CDR-H3 в зустрічаючихся

в природних умовах антитілах. Синтезували олігонуклеотиди, кодуючі CDR-H3, з використанням тринуклеотидних кодонов. Це дозволило при створенні винаходу легко видаляти цистеїн (котрий рідко зустрічається в CDR-H3) та підвищувати рівні гліцину, тирозину и серіну, найбільш часто зустрічаючихся залишків а CDR-H3 (Mian й ін., J. Mol. Biol. 217, 1991, сс. 133-151). Кодон X7, котрий являє собою тринуклеотидну суміш, кодуючу примерно по 15,6% серіну, тирозину и гліцину, та 3,1% кожної з решти амінокислот крім цистеїну, використовували для кодного положення в CDR-H3 (теоретичні розрахунки для усіх тринуклеотидів суміші). Застосовували також різні комбінації тринуклеотидів для відбору положень в CDR-H1, H2, H3 и L3. Як видно з таблиці II й доповнень до таблиці I, кодони XI-X6 кодують високий процент серіну, тирозину або гліцину. XI кодує 52,5% серіну, X2 52,5% тирозину, X3 10% тирозину, гліцину или серіну, X4 28,8% гліцину, X5 19,2% тирозину, гліцину или серіну и X6 20% тирозину або серіну. Було встановлено, что фагова VH/VL-бібліотека антитіл може презентувати приблизно 10^{10} варіантів.

Таблиця I. Консенсусна послідовність CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1 і CDR-H2 у матриці VH/VL-бібліотеки. Консенсусні залишки CDR визначали шляхом відбору амінокислот, що найбільше часто зустрічаються, що є присутніми в антитілах, що зустрічаються в природних умовах. Показано поширеність (частота зустрічальності) (%) кожного залишку в людських антитілах, що розраховували після лінеаризації приблизно 1600 послідовностей людських легких ланцюгів і 3500 послідовностей людських важких ланцюгів у базі даних Кебота (Kabat і ін., J. Mol. Biol., 252, 1977, сс. 6609-6616)ю

Таблиця I

Консенсусна послідовність CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1 і CDR-H2 у матриці VH/VL-бібліотеки

CDR	Положення	Залишки	Частота зустрічальності в антитілах, що зустрічаються в природних умовах (%)
CDR-L1	28	S	33
	29	I	40
	30	S	55
	31	S	44
	32	Y	67
	33	L	94
CDR-L2	50	G	25
	51	A	79
	52	S	95
	53	S	36
	54	R	60
	55	A	45
CDR-L3	91	Y	54
	92	Y	23
	93	S	46
	94	S	24
	95	P	80
	96	L	22

CDR-H1	27	F	45
	28	T	54
	29	F	73
	30	S	68
	31	S	50
	32	Y	64
	33	A	22
CDR-H2	34	M	46
	35	S	34
	50	R	17
	51	I	84
	52	S	26
	52a	P	29
	53	S	24
	54	G	37
	55	G	53
	56	S	28
	57	T	56
	58	Y	32

Таблиця II. Створена розмаїтість CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 і CDR-H3 в VH/VL-бібліотеці. Представлено положення CDR, довільно обрані для CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 і CDR-H3, з консенсусними залишками в матриці бібліотеки. Створена розмаїтість представлена або групою залишків, кодуємих кодоном, що має хвіст виродженням, (курсив), або 19 амінокислотами крім цистеїну, кодуємих сумішами тринуклеотидних кодонів (жир-

ний текст), так, щоб відсоток типів амінокислот, кодуємих у кожному положенні, був близький або перевищував 50% типів амінокислот, представлених у базі даних. Для кожного конкретного положення всі 19 амінокислот крім цистеїну інтродуквали з використанням сумішей тринуклеотидних кодонів з різним зсувом убік Tyr (Y), Gly (G) і Ser (S).

Таблиця II

Створена розмаїтість CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 і CDR-H3 в VH/VL-бібліотеці

CDR	Положення	Створені розмаїтості					Відсоток щодо розмаїтості, що зустрічається в природних умовах
		Кодон	Кодуємі залишки (%):				
			Y	G	S	Інші (без Cys)	
CDR-L3	Y91	TAC MGG	100	-	-	-	77
	Y92	X5	19,2	19,2	19,2	R/S(50) 2,5	100
	S93	X1	2,5	2,5	52,5	2,5	100
	S94	X6	20	3,3	20	3,3	100
	L96	NTC	-	-	-	F/I/L/V(25)	45
CDR-H1	F27	TWC	50	-	-	F(50)	65
	T28	ASC	-	-	50	T(50)	90
	S30	ASC	-	-	50	T(50)	86
	Y31	X1	2,5	2,5	52,5	2,5	100
	Y32	X2	52,5	2,5	2,5	2,5	100
	A33	X7	15,6	15,6	15,6	3,1	100
	M34	ATS	-	-	-	V/I(50)	67
CDR-H2	R50	X3	5	5	5	5	100
	S52	X6	20	3,3	20	3,3	100
	P52a	CCT	-	-	-	P(100)	100
		X7	15,6	15,6	15,6	3,1	
	S53	X7	15,6	15,6	15,6	3,1	100
	G54	RRC	-	-	25	D/G/N(25)	81
	S56	DMT	16,6	-	16,6	A/D/N/T(16,6)	81
	Y58	DAC	33,3	-	-	D/N(33,3)	70

CDR-H3	95	X4	3,8	28,8	3,8	3,8	100
	96	X4	3,8	28,8	3,8	3,8	100
	97~100k	(X7)4~15	15,6	15,6	15,6	3,1	98
	100l	X7	15,6	15,6	15,6	3,1	100
	100m	<i>GBT</i>	-	33,3	-	A/V(33,3)	89
		<i>TTC</i>	-	-	-	F(100)	
		<i>ATG</i>	-	-	-	M(100)	
	101	<i>GAT</i>	-	-	-	D(100)	92
	102	<i>TAC</i>	100	-	-	-	67
		<i>GTC</i>	-	-	-	V(100)	

Б. Створення виведених з фага моноклональних антитіл до NRP1

Матеріали й методи

Сортування й скринінг бібліотеки для ідентифікації антитіл до NRP1

Людські й мишачі конструкції NRP1 (1-641 ак) клонували в експресійному векторі ссавців і експресували в CHO-клітинах. Укорочену форму NRP-1, тобто a1a2- і b1b2-домени, експресували в бакуловтусах. 96-лункові імунологічні планшети NUNC фірми Maxisorp сенсibiliзували протягом ночі при 4°C антигеном-мішенню (10 мкг/мл) і блокували протягом 1 год при кімнатній температурі за допомогою блокуючого фага буфера ЗФР (ЗФР і 1% БСА й 0,05% Твін 20). До вміщуючим антиген планшетах додавали фагові бібліотеки антитіл і інкубували протягом ночі при КТ. Наступного дня сенсibiliзовані антигеном планшети промивали 10 разів ЗФТ (ЗФР із 0,05% Т-20) і зв'язаний фаг елюювали 50мМ HCl і 500мМ NaCl протягом 30 хв і нейтралізували рівним обсягом 1М Трис-основи, рН 7,5. Виділений фаг ампліфікували в клітинах E.coli лінії XL-1 Blue. Під час наступних циклів селекції інкубацію фагової бібліотеки антитіла із сенсibiliзованими антигеном планшетами знижували до 2-3 год, і строгість умов промивання планшета поступово збільшували.

Аналіз афінності до зв'язування, специфічності антитіл і аналіз антитіл за допомогою проточної цитометрії

Значення IC₅₀ фагових антитіл (антитіл, отриманих з фагової бібліотеки) визначали за допомогою конкурентного аналізу зв'язування фага з використанням ELISA, відповідно до описаного методу (Lee і ін., J. Mol. Biol. 340, 2004, сс. 1073-1093). Криві, що характеризують конкурентне зв'язування, апроксимували за допомогою програми для підбора кривих на основі чотирьохпараметричного нелінійного регресійного аналізу (Kaleidagraph, Synergy Software) для визначення значень IC₅₀, які розраховували у вигляді концентрації антигену, що знаходить у розчині у зв'язаному стані, при якій на 50% інгібувалося зв'язування презентуемого фагом антитіла з іммобілізованим антигеном.

Потім у клонів, що представляють інтерес, змінювали формат на Ig шляхом клонування VL- і VH-ділянки індивідуальних клонів в LPG3- і LPG4-векторі відповідно (Carter і ін., Proc Natl Acad Sci U S A 89, 1992, сс. 4285-4289), піддавали короткочасної експресії в клітинах ссавців і очищали на колонках із протеїном А. Для оцінки афінності до

зв'язування антитіл до NRP1 у вигляді Ig використали резонанс поверхневого плазмона (SPR) і пристрій типу BIAcore™-3000. Антитіла до NRP1 у вигляді Ig зшивали з активованими біосенсорними чипами типу CM5 для досягнення приблизно 500 одиниць відповіді (RU), з наступною блокадою непрореагувавших груп за допомогою 1М етаноламіну. Для кінетичних вимірів дворазові серійні розведення нейропіліну (від 0,7 до 500нМ) ін'єкували в ЗФРТ-буфері при 25°C зі швидкістю потоку 30 мкл/хв. Швидкості реакції асоціації (k_{on}) і швидкості реакції дисоціації (k_{off}) розраховували за допомогою простої ленгмюровської моделі зв'язування 1:1 (BIAcore Evaluation Software, версія 3.2). Константу рівноваги дисоціації (Kd) розраховували як відношення k_{off}/k_{on}.

Для дослідів по оцінці специфічності зв'язування 10 мкг/мл Ig у ЗФРТ-буфері інкубували з 2 мкг/мл сенсibiliзованих антигеном 96-ямкових планшетів фірми Maxisorp протягом щонайменше 1 год і планшети промивали ЗФТ-буфером. Зв'язані антитіла виявляли за допомогою кон'югатів антитіла до людського HRP, реакцію проводили в присутності ТМВ як субстрат протягом приблизно 5 хв, реакцію припиняли, додаючи 1М H₃PO₄, і аналізували спектрофотометрично при довжині хвилі 450 нм.

Для аналізу методом проточної цитометрії HUVES-клітини відбирали з колб із культурами тканини за допомогою буфера для дисоціації клітин. Диссоційовані клітини промивали в ЗФР і ресуспендували в ЗФР, що містить 2% фетальної телячої сироватки (FACS-буфер). Клітини інкубували з 10 мкг/мл антитіл до NRP1 або контрольного антитіла (до Ig) в FACS-буфері на льоді протягом 30 хв. Потім клітини промивали двічі в ЗФР і офарблювали в FACS-буфері козячим антитілом до людського Ig у вигляді PE-Fab'₂, тобто Fc-специфічним антитілом, на льоді протягом 30 хв. Після дворазового відмивання за допомогою ЗФР клітини ресуспендували в 200 мкл FACS-буфера й аналізували методом проточної цитометрії (FACS-калібр, фірма Benton Dickenson, Mountain View, шт. Каліфорнія) з використанням програмного забезпечення Cell-Quest.

Результати

Дванадцять VH/VL-підбібліотек піддавали окремо пеннінгу відносно іммобілізованих CHO-клітин, експресуючих білок hNRP1 (a1a2b1b2)-Fc, у першому циклі селекції. Елюювані фаги з кожної підбібліотеки ампліфікували й потім поєднували для здійснення другого циклу селекції. Оскільки як

антиген використали hNRP1-Fc, після першого циклу пеннінгу об'єднаний у пул фаг попередньо адсорбували з надлишком не стосовного до досліджуваного питання злитого Fc-білка для мінімізації витягу фагових антитіл до Fc. Після четвертого циклу пеннінгу в 95 випадково відібраних клонів оцінювали здатність специфічно зв'язуватися з NRP1. 90% клонів виявилися позитивними відносно зв'язування hNRP1, а 40% позитивних клонів зв'язувалися як з людським, так і з мишачим NRP1.

Ці фагові клони секвенували й 10 унікальних клонів відбирали для додаткової характеристики. Всі вони зв'язувалися як з людським, так і з мишачим NRP1, значення IC₅₀ становило менш 70 нМ при аналізі за допомогою фагового ELISA. Зв'язування клону YW64.3 з людськ і мишачим NRP1 характеризувалося значеннями IC₅₀ 0,5 і 3,4 нМ відповідно (таблиця III). Послідовності 10 клонів

характеризують конструкцію VH/VL-бібліотеки з різними довжинами CDR-H3 і різними змінами розподілу в CDR-H1, CDR-H2 і CDR-L3, але при цьому ще зберігаються деякі консенсусні послідовності CDR з матриці бібліотеки. Клони 64.3 і 64.29 мають зміни у всіх чотирьох CDR і також характеризуються найбільш високими афінностями до зв'язування, як з людським, так і з мишачим NRP1 (таблиця III).

Таблиця III. Часткові послідовності CDR і афінність до зв'язування (IC₅₀ фага) антитіл до NRP1.

Представлені тільки амінокислотні послідовності CDR у довільних положеннях 11 різних фагових клонів, які спочатку ідентифіковані в VH/VL-бібліотеці. Афінності до hNRP1 і mNRP1 у вигляді значень IC₅₀ оцінювали за допомогою конкурентного фагового ELISA.

Таблиця III

Часткові послідовності CDR і афінність до зв'язування (IC₅₀ фага) антитіл до NRP1

Клон	Часткова послідовність CDR-L3 (91-96)	SEQ ID NO:	Часткова послідовність CDR-H1 (27-34)	SEQ ID NO:	Часткова послідовність CDR-H2 (50-58)	SEQ ID NO:	Часткова послідовність CDR-H3 (95-102)	SEQ ID NO:	IC ₅₀ (нМ)	
									mNRP1	hNRP1
YW64.3	YMSVPI	7	FSFSSEPI	18	SITGKNGYY	29	WGKKVYG----MDV	40	3,4±0,9	0,48±0,02
YW64.4	YYSSPL	8	FTFSSYAM	19	SIAGSGGY	30	WGGSNGS G---FDY	41	35±9,6	24±7,4
YW64.14	YYSSPL	9	YSFSSHMM	20	SIYPPGGYY	31	WGSRSPPG----MDV	42	11±3,4	5,2±0,9
YW64.23	YYSSPL	10	FTFSSYAM	21	TIIPHGGYY	32	WAKRSYG----MDV	43	46±21	47±14
YW64.28	YYSSPL	11	FTFSSYAM	22	WISPLNGYY	33	WGRRYIG----MDV	44	7,9±1	1,2±0,2
YW64.29	RYSVPI	12	FTFSSYQL	23	SIF-SGGYY	34	YGNHV-----MDV	45	9,9±4,2	2,7±0,1
YW64.30	YYSSPL	13	FTFSSYAM	24	SISRGDGY	35	WAGGSA-----MDV	46	60±11	50±19
YW64.47	YYSSPL	14	FTFSQYSI	25	TIYPFGGY	36	FGQSYYG GSYAMDV	47	67±25	21±6
YW64.53	YYSSPL	15	FTFTSRTM	26	SIS-SGGYY	37	WESYYG-----MDV	48	16±2,9	4±0,6
YW64.55	YYSSPL	16	FTFSSYAM	27	SIYSTGGYY	38	WGYPG-----MDV	49	17±5,8	3,9±1
YW107.4	YYSSPL	17	FTFSSYAM	28	QISPAGGYN	39	ELPYRYM SKV-MDV	50	38±20	6,1±1

Варіанти hNRP1 з укороченими доменами використали для ідентифікації епітопу, що зв'язується, для зазначених клонів і всі варіанти картували у відношенні a1a2-домена hNRP1. Для відбору фагових антитіл, які зв'язуються з b1b2-доменом NRP1 і потенційно блокують зв'язування VEGF, при створенні винаходу використали новий процес пеннінгу з використанням експресуемого в бакуловіруси (b1b2)-His hNRP1 як іммобілізованого антигену. Після 4 циклів відбору був ідентифікований тільки один унікальний клон YW 107.4, що зв'язувався як з людським, так і з мишачим NRP1. Зв'язування YW 107.4 з людським і мишачим NRP1 характеризувалося значеннями IC₅₀ 6 і 38 нМ при оцінці за допомогою фагового ELISA (таблиця III).

Характеристика відібраного антитіла до NRP1 у вигляді Ig - Формат відібраних зазначених у таблиці III клонів антитіл до NRP1 змінювали на повнорозмірний людський Ig1, Експресували в CHO-клітинах і очищали для додаткової характеристики.

Клони фагових антитіл до NRP1 YW64.3 і YW107.4 специфічно зв'язувалися з людськ і мишачим NRP1 і не зв'язувалися з людським або мишачим NRP-2, Erb2-ECD або BCA (Фіг. 1A). Кожне з інших 8 фагових антитіл мало подібну специфічність. За даними, отриманим за допомогою резонансу поверхневого плазмона, іммобілізований Ig клонів YW64.3 і YW 107.4 не взаємодіє із цими антигенами в концентраціях аж до 500 нМ. Однак і YW64.3 і YW107.4 зв'язувалися з людським NRP1, що характеризувалася значеннями K_d 0,9 і 5 нМ, а також з мишачим NRP1, що характеризувалася значеннями K_d 7,8 і 11 нМ відповідно. Хоча ці антитіла відбирали за допомогою іммобілізованого на планшеті антигену, FACS-аналіз продемонстрував, що всі очищені Ig зв'язувалися також з HUVEC-клітинами, які ендогенно експресують hNRP1 (наприклад, YW64.3 і YW 107.4, що проілюстровано на Фіг. 1B).

В. Дозрівання афінності антитіл до NRP1

Клон YW107.4 зв'язувався з b1b2-доменом як людського, так і мишачого NRP1, що характеризувався значенням IC_{50} фага 6 і 38 нМ відповідно (таблиця III). Для підвищення ефективності *in vivo* цей клон піддавали процесу дозрівання афінності за допомогою людського NRP1-His.

Матеріали й методи

Для створення матриці бібліотеки, призначеної для здійснення процесу дозрівання афінності клону YW107.4, спочатку за допомогою мутагенезу по Kunkel видаляли лейцинову «застібку-блискавку» GCN4 батьківської фагміди для одержання моновалентно презентуючого Fab-формату. В CDR-L3 включали стоп-кодон. Для дозрівання афінності використали стратегію м'якої рандомізації, що дозволяла інтродукувати частоту мутацій на рівні приблизно 50% у відібрані положення шляхом синтезу мутагенної ДНК із 70-10-10-10 сумішами основ кращих нуклеотидів дикого типу (Gallor *et al.*, J Med Chem 37, 1994, сс. 1233-1251). Створювали три різних бібліотеки з рандомізацією комбінацій CDR-петель, тобто L1/L2/L3, L3/H1/H2 і L3/H3, за допомогою м'якої рандомізації відібраних залишків у положеннях 28-32 CDR-L1, 50 і 53-55 CDR-L2, 91, 92, 93, 94 і 96 CDR-L3, 28-35 CDR-H1, 50-58 CDR-H2 і 95-100 CDR-H3.

Для відбору клонів з дозрілою афінністю фагові бібліотеки піддавали сортуванню на планшеті протягом першого циклу й у фазі розчину протягом інших чотирьох циклів відповідно до методу, описаному в Lee *et al.*, J. Mol. Biol. 340, 2004, сс. 1073-1093. У першому циклі сортування на планшеті три бібліотеки додавали окремо в сенсibilізований hNRP1 планшет протягом 1 год при 37°C. Після цього здійснювали чотири цикли сортування у фазі розчину для підвищення ефективності заснованого на визначенні афінності відбору з використанням наступної строгості, що підвищується, відбору: цикл 2 (5 нм біотинільований hNRP1), цикл 3 (1 нм біотинільований hNRP1), цикл 4 (0,5 нм біотинільований hNRP1 і 250 нм небіотинільований hNRP1-конкурент, при 37°C протягом 1 год) і цикл 5 (0,5 нм біотинільований hNRP1 і 500 нм небіотинільований hNRP1-конкурент, при 37°C протягом 3 год). У процесі відбору використали також реакцію без біотинільованого hNRP1, і вона служила для оцінки фонового зв'язування фага для розрахунку збагачення, отриманого при кожному циклі пеннінгу.

Після 5 циклів пеннінгу для швидкого скринінгу володіючих високою афінністю клонів застосовували конкурентний одноточковий фаговий ELISA, заснований на використанні великої кількості вихідного матеріалу (Sidhu *et al.*, J. Mol. Biol. 338, 2004, сс. 299-310). Для подальшої характеристики відбирали клони з більше низьким рівнем абсорбції при 450 нм у присутності 5 нм hNRP1 у порівнянні з варіантом у відсутності hNRP1.

Результати

Три різні комбінації CDR, тобто L1/L2/L3, L3/H1/H2 і L3/H3, використали як мішені для рандомізації на основі стратегії «м'якої рандомізації», що дозволяє зберігати особливість послідовностей дикого типу, оскільки одночасно мутації піддається тільки 50% положень (Gallor *et al.*, J Med Chem 37,

1994, сс. 1233-1251). Для дозрівання афінності моновалентний Fab презентували на фагі частіше, ніж бівалентний Fab, для зниження авідності в процесі селекції. У кожній підбібліотеці стоп-кодон інтродукували в CDR-L3. Стратегію, засновану на селекції по швидкості дисоціації (k_{off}) (див. розділ «Методи») застосовували для підвищення афінності YW107.4, оскільки цей клон уже володів високою константою швидкості асоціації ($2,2 \times 10^5$), але константа швидкості дисоціації ($1,1 \times 10^{-3}$) свідчить про відносно швидку дисоціацію (таблиця V).

У першому циклі селекції всі бібліотеки, отримані в результаті м'якої рандомізації CDR, піддавали пеннінгу у відношенні іммобілізованого hNRP1, для наступних циклів використали стратегію сортування у фазі розчину для обмеження концентрації мішені й підвищення ефективності заснованої на афінності селекції. Концентрацію біотинільованого hNRP1 поступово знижували з 5 до 0,5 нм і додавали 500-кратний надлишок небіотинільованого hNRP1 для конкуренції зі сполучними агентами зі швидкою дисоціації. Суміш інкубували також при 37°C протягом проміжку часу, що становить аж до 2 год.

Для L1/L2/L3-бібліотеки виявлене істотне збагачення після циклу 5. Довільно відбирали 96 клонів, секвенували й потім визначали рівні їх афінності. Виділяли 23 унікальних клони фага й очищали для додаткової характеристики. Більшість клонів володіли підвищеною афінністю до hNRP1, що визначали за допомогою фагового конкурентного ELISA. При створенні винаходу несподівано було встановлено, що афінність до mNRP1 також підвищувалася, незважаючи на те, що антиген не використовувався в процесі селекції, це дозволяє припустити, що клони зв'язувалися з консервативним епітопом. Відібрані клони мали від 4 до 7 замін у трьох CDR ланцюгів; положення 28 і 30 в CDR-L1 мали тенденцію замінюватися на тірозин і гістидин відповідно, а положення 92, 93 і 96 в CDR-L3 характеризувалися більшою розмаїтістю (таблиця IV).

У клонів, що характеризуються найвищою афінністю як до людського, так і до мишачого NRP1 (YW107.4.18, YW107.4.38, YW107.4.52, YW107.4.63, YW107.4.76a і YW107.4.87), змінювали формат і експресували їх у вигляді повнорозмірних антитіл. Всі шість Ig володіли підвищеною афінністю до hNRP1 і зберігали здатність до повної блокади зв'язування VEGF-A. Афінність до людського і мишачого NRP1 становила від 0,4 до 1,8 нм (таблиця V). Константа швидкості дисоціації клону YW107.4.87 поліпшувалася, що приводило до загального підвищення афінності приблизно в 10 разів як у відношенні людського, так і мишачого NRP1; не виявлено ніякого зв'язування з людським або мишачим NRP2 (Фіг. 2A). Клон YW107.4.87 мав також підвищену здатність до зв'язування з розташованим на клітинній поверхні NRP1 (Фіг. 2B).

Таблиця IV. CDR-послідовності й афінність до зв'язування (IC_{50} фага) для YW107.4-клонів з підвищеною афінністю. Представлено виведені амінокислотні послідовності YW107.4-клонів з дозрілою афінністю в рандомізованих положеннях

CDR легенив ланцюгів. Значення IC₅₀ презентуючих Fab фагов індивідуального клону у відношенні hNRP1 і mNRP1, отримані за допомогою конкурен-

тного фагового ELISA, застосовували для порівняння поліпшення афінності до YW107.4.

Таблиця IV

CDR-послідовності й афінність до зв'язування (IC₅₀ фага) для YW107.4-клонів з підвищеною афінністю

Клон	Часткова послідовність CDR-L1 (28-32)	SEQ ID NO:	Часткова послідовність CDR-L2 (50-55)	SEQ ID NO:	Часткова послідовність CDR-L3 (92-95)	SEQ ID NO:	IC ₅₀ (нМ)	
							mNRP1	hNRP1
YW107.4	SISSY	51	GASSRA	75	YSSPL	99	38±20	6,1±1
YW107.4.33a	YISSY	52	GASRRA	76	IGSPI	100	1,5±0,4	0,31±0,04
YW107.4.53	YISSY	53	GASRRE	77	LNSPL	101	1,7±0,1	0,30±0,02
YW107.4.66	YISSY	54	GASSRA	78	IVSPL	102	2,6±0,6	0,45±0,02
YW107.4.76a	YISSY	55	GASRRA	79	LRSPH	103	0,8±0,4	0,23±0,01
YW107.4.78	YISSY	56	GASSRE	80	LSSPI	104	1,7±0,2	0,30±0,02
YW107.4.85	YISSY	57	GASSGE	81	IISPI	105	4±0,7	0,44±0,06
YW107.4.51	RISSY	58	GASRRE	82	KLSPH	106	12±6	2±0,5
YW107.4.58	YISSY	59	GASSRA	83	KSSPR	107	3,5±1,5	0,73±0,28
YW107.4.42	WIHSY	60	GASSSA	84	YSSPL	108	1,2±2,2	0,81±0,09
YW107.4.59	RIHSY	61	GASSRA	85	YISPL	109	26±14	1,8±0,7
YW107.4.33b	YIHSY	62	GASRRA	86	YGTPI	110	7,8±2	0,58±0,07
YW107.4.54	PLHSY	63	GASSRA	87	YRSPL	111	2,7±1	0,84±0,05
YW107.4.63	YLSSY	64	GASSSE	88	ISVPL	112	0,8±0,1	0,15±0,01
YW107.4.38	YLSSY	65	GASSRA	89	LRSPI	113	1,4±0,3	0,28±0,01
YW107.4.18	YFSSY	66	GASTHE	90	IRSPL	114	1,1±0,3	0,21±0,02
YW107.4.52	YFSSY	67	GASTLA	91	IRSPL	115	1,1±0,3	0,22±0,04
YW107.4.87	YFSSY	68	GASSRA	92	LGSPH	116	1,5±0,2	0,21±0,04
YW107.4.55	LTHSY	69	GASSRA	93	YSSPL	117	2±2,4	0,93±0,05
YW107.4.20	RTHSY	70	GASSRA	94	YGSPH	118	33	0,45±0,06
YW107.4.12	YTHSY	71	GASSRA	95	YSSPI	119	3,4±0,6	0,10±0,02
YW107.4.17	YTHSY	72	GASSRA	96	YSSPV	120	6±1	0,24±0,02
YW107.4.41	WTHSY	73	GASRL	97	FISPH	121	5,5±2,3	0,43±0,07
YW107.4.76b	WVHSY	74	GASSRA	98	YGTPI	122	3,9±0,8	0,34±0,01

Таблиця V. Кінетичний аналіз зв'язування антитіла до NRP1 у вигляді Ig при 25°C. Афінності до зв'язування антитіл до NRP1 у вигляді Ig оцінювали за допомогою пристрою BIAcore-3000 з використанням Ig, іммобілізованого на біосенсе-

рному чипі, із застосуванням розведень hNRP1 або mNRP1 при здійсненні процесу при 25°C (див. розділ «Матеріал і методи»). Помилка кожного виміру K_d приблизно 25%.

Таблиця V

Кінетичний аналіз зв'язування антитіла до NRP1 у вигляді Ig при 25°C

Клон	Мишачий NRP1			Людський NRP1		
	k _{on} /10 ⁵ (M ⁻¹ s ⁻¹)		K _d (нМ)	k _{on} /10 ⁵ (M ⁻¹ s ⁻¹)	k _{off} /10 ⁻⁴ (с ⁻¹)	K _d (нМ)
YW64.3	0,6	4,5	7,8	1,3	1,2	0,9
YW107.4	1,4	15	11	2,2	11	5
YW107.4.18	1,4	2,9	2,1	1,8	1,8	1
YW107.4.38	0,84	2,7	3,2	0,94	1,7	1,8
YW107.4.52	1,3	1,6	1,2	1,4	1,3	0,9
YW107.4.63	1,6	1,3	0,8	1,8	1,5	0,8
YW107.4.76a	0,42	13	31	1,2	1,7	1,4
YW107.4.87	1,6	2	1,3	1,9	0,77	0,4

Приклад 2. Біологічна активність антитіл до NRP1

Послідовності антитіл YW64.3 і YW107.4.87 представлені на Фіг. 3. Для цілей даного опису й далі відносно активності антитіл до NRP1 позначення «YW64.3» і «анти-NRP^A», а також позначення «YW107.4.87» і «анти-NRP^B» використовують взаємозамінно.

Матеріали й методи
Клітинні культури

Клітини HUVEC, HUAEC і HMVEC одержували від фірми Cambrex і культивували в середовищі EGM-2 (фірма Cambrex). Культури клітин і тканин підтримували при 37°C в інкубаторі з 5% C_2 при відносній вологості 95%.

Аналізи колапсу DRG і гіпокампа

Аналіз колапсу на аксонах DRG мишей лінії E12.5 здійснювали відповідно до методу, описаному в He і Tessier-Lavigne, Cell 90, 1997, сс. 739-751. У цілому метод полягав у наступному: експлантати DRG поміщали на покриті ламініном 8-камерні предметні стекла (фірма Nunc) і культивували в середовищі N3-F12 у присутності 50 нг/мол NGF протягом ночі при 37°C в інкубаторі з 5% C_2 при відносній вологості 95%. Людський семафорин-3A (Sema3A) (заміна Met-1 на Val-771) клонували в еукаріотичному експресійному векторі pRK5, злитим з С-кінцевою гексагістидиновою міткою. Білок піддавали короточасної експресії в CHO-клітинах і очищали за допомогою афінної NiNTA-хроматографії. Застосовували N-кінцеве секвенування для підтвердження, що білок відповідає смугі з молекулярною масою 90 кДа при здійсненні ДСН-ПААГ з фарбуванням кумасси. Очищений Sema3A додавали з розрахунку ~8 нг/мол у присутності інгібіторів або без них і експлантати інкубували при 37°C протягом 30 хв для індукції колапсу. Для візуалізації точки росту фіксували в 4% ПФА (параформальдегід) і 15% сахарози, офарблювали родамін-паллоїдином (фірма Molecular Probes), розведеним у співвідношенні 1:40 у 3ФР протягом 30 хв, а потім промивали й поміщали в Fluoromount G (фірма Фішер). Для аналізу колапсу гіпокампа головний мозок мишей лінії E17 висікали в охолодженому 3ФР і наготовлювали за допомогою різачка для тканин (фірма Mcllwain) горизонтальні зрізи з товщиною зрізу 250 мкм. Потім з відібраних зрізів гіпокампа наготовлювали додаткові зрізи зубчастої звивини медіальної й нижньої поверхні півкулі великого мозку за допомогою тонких вольфрамових голок. Експлантати поміщали на покриті ламініном 8-камерні предметні стекла (фірма Nunc) і культивували в нейробазальному (Neurobasal) середовищі, доповненому B27 (фірма Gibco Life Technologies), протягом ночі при 37°C. Для індукції колапсу експлантати інкубували з контролем або антитілами до NRP1 (10 мкг/мл) у присутності кондиціонованого середовища трансфектованих «пустишкою» або трансфектованих Sema3F COS-клітин протягом 30 хв при 37°C.

Аналіз міграції клітин

Аналіз міграції клітин здійснювали з використанням модифікованого аналізу Boyden у камері, оснащеною 24-лунковою системою з розміром пор 8 мкм типу Falcon (фірма BD Biosciences). Планшети попередньо покривали ламініном (фірма Invitrogen) з розрахунку 8 мкг/мл протягом 16 год при 37°C і у верхній, і в нижній камері. Клітини лінії HUVEC (конфлюентність 80-90%) збирали шляхом обробки тріпсином, підраховували кількість, центрифугували й ресуспендували в середовищі EBM-2, доповненого 0,1% БСА, у концентрації 5×10^5 клітин/мол. Додавали 100 мкл клітин у верхню камеру транслункової системи. Інгібітори дода-

вали у верхню камеру із клітинами безпосередньо перед додаванням стимулів у нижню камеру (у більшості випадків 10 нг/мол VEGF), що містила 500 мкл середовища EBM-2, доповненого 0,1% БСА. Потім планшети витримували при 37°C протягом ночі. Для припинення досліду клітини на верхній поверхні мембрани видаляли за допомогою пористого тампона, а клітини на нижній поверхні фіксували метанолом і офарблювали зеленим цитоксом (Cytox green) (фірма Molecular Probes). Кількість клітин, які в результаті міграції виявилися на нижній поверхні мембрани, підраховували за допомогою флуоресцентного мікроскопа AxioPhot і результати аналізували за допомогою програми Image (NIH, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

Аналіз утворення відростків на гранулах

Покриті декстраном гранули-мікроносії типу Cytodex 3 (фірма Amersham Pharmacia) інкубували із клітинами лінії HUVEC на субконфлюентній стадії в концентрації 400 клітин на гранулу в 1 мл середовища EGM-2 протягом 4 год при 37°C в інкубаторі з 5% CO_2 з обережним струшуванням кожні 20 хв. Потім гранули переносили на матрац для культури тканини площею 25 см (фірма BD Biosciences) і інкубували в 5 мл середовища EGM-2 протягом 12-16 год при 37°C. Потім покриті клітинами лінії HUVEC гранули тричі промивали 1 мл EGM-2 і ресуспендували в присутності 2,5 мкг/мл фібриногену (фірма Sigma) у 3ФР із щільністю 200 гранул/мл. Переносили 0,5 мл розчину фібриногену/гранул в одну лунку 24-лункового планшета для культури тканини, що містить 0,625 од. тромбіну (фірма Sigma) для індукції згортання. Розчин фібриногену/гранул інкубували протягом 5 хв при кімнатній температурі, потім 20 хв при 37°C в інкубаторі з 5% CO_2 . Після завершення процесу згортання в кожну лунку додавали 1 мл EGM-2 і згусток урівноважували протягом 30 хв при 37°C. Зрізи видаляли й на верхню згустку поміщали 1 мл шкіряних фібробластів (Detroit 551) у концентрації 2000/мол у середовищі EGM-2. Потім у кожну лунку вносили різні антитіла й протягом 8 днів оцінювали зміна в середовищі кожні 2-3 дня. Одержували зображення гранул з 10-кратним дозволом за допомогою інвертного мікроскопа, і на кожному зображенні навколо гранули на відстані 100, 200 і 300 мкм будували цифрові зображення концентраційних окружностей. Підраховували кількість судин, що перетинають кожну лінію, і підраховували середнє значення для кожної відстані й варіанта.

FACS-аналіз

Клітини лінії HUVEC на стадії конфлюентності інкубували з контрольним антитілом або антитілом до NRP1 у концентрації 10 мкг/мл протягом 5 хв, 2 год або 20 год при 37°C в інкубаторі з 5% CO_2 . Клітини збирали за допомогою неутримуючого ферменту буфера для дисоціації клітин (фірма Gibco), нейтралізували рівним об'ємом FACS-буфера (1 x 3ФР, 2% FBS, 2мм ЕДТК, 0,1% азиду натрію) і переносили в пов'язані з Про 96-лункові планшети для аналізу з U-образним дном (фірма Falcon) з розрахунку 500000 клітин на лунку. Клітинний дебрис збирали центрифугуванням при 2000 про/хв і ресуспендували в 25 мкл буфера, що офарблює (FACS-буфер з 5% неімунної мишачої

сироватки, 2% неімунної щурячої сироватки й 10% 10 мкг/мл людського Ig), що містить відповідне біотинільоване антитіло в розведенні 1:100, з наступною інкубацією протягом 2 год при 4°C. Антитіла біотинілювали за допомогою вміщуючого біотин набору для мічення білків FluoReporter mini-biotin-xx (фірма Molecular Probes). Потім клітини промивали двічі FACS-буфером і інкубували з 25 мкл FACS-буфера, що містить розведений у співвідношенні 1:1000 стрептавідин-PE (фірма BD Biosciences), протягом 20 хв при 4°C. І, нарешті, клітини промивали й ресуспендували в FACS-буфері й аналізували за допомогою системи FacsCalibur (фірма BD Biosciences).

Аналіз клітинної адгезії

Клітини лінії HUVEC на стадії конфлюентності попередньо інкубували в 100 мкл середовища 199 з контрольним антитілом або антитілом до NRP1 протягом 30 хв при 37°C, потім висівали в 96-лункові плоскодонні планшети NUNC (фірма eBioscience), сенсibiliзовані 1 мкг/мл фибронектина (фірма Roche), з розрахунку 10000 клітин на лунку. Планшети центрифугували протягом 1 хв при 140хг для того, щоб синхронізувати контакт клітин із субстратом, і інкубували при 37°C протягом 30 хв. Потім планшети промивали тричі 3ФР, заморожували при -80°C протягом 2 год. Щільність клітин визначали за допомогою набору CyQuant (фірма Molecular Probes).

Аналіз судин у неонатальній сітківці мишей

Новонародженим мишам лінії CD1 (одного приплоду) вводили внутрібрюшинно (i.p.) різні антитіла в концентрації 10 мг/кг. Ін'єкції здійснювали в дні 1 і 3 після народження для дослідів, оцінку яких починали з 5 дня після народження (P5), і в дні 1, 3 і 5 для P8-дослідів. Очі виділяли й фіксували в 4% параформальдегіді (ПФА) у 3ФР протягом 16 год при 4°C, а потім промивали 3ФР. Відсічену сітківку блокували за допомогою 10% мишачої сироватки в 3ФР (3ФР, 1% Тритон X-100) протягом 3 год, потім інкубували протягом ночі при 4°C з біотинільованим ізолектином B4 (*Bandeiraea simplicifolia*; фірма Sigma) 25 мкг/мл в PBLEC (1% Тритон X-100, 0,1мМ CaCl₂, 0,1мМ MgCl₂, 0,1 мМ MnCl₂ у 3ФР, р 6,8). Потім сітківки промивали 4 рази в 3ФР і інкубували зі стрептавідином Alexa 488 (1:200; фірма Molecular Probes) протягом ночі при 4°C. Після завершення фарбування сітківки промивали 4 рази 3ФР, піддавали пост-фіксації 4% ПФА в 3ФР, потім ще раз промивали 4 рази 3ФР. Зображення сітківки, закріплені на плоскому предметному склі, аналізували за допомогою конфокального флуоресцентного мікроскопа.

Аналіз проникності судин мишачої шкіри

5-7-тижневим самкам мишей лінії C57BL6J ін'єкували внутрішньо (i.v.) 150 мкл 0,5%-ного розчину блакитного Еванса. Голили ділянки на спинних і бічних ділянках тварин для видалення волосяного покриву під шиєю й над стегном і виголені області розділяли на 4 зони, у які здійснювали ін'єкції. Через 1 год після ін'єкції блакитного Еванса ін'єкували внутрішкірно (i.d.) довільно в одну з 4 зон, по 1 ін'єкції в кожну зону 20 мкл 3ФР, що містить BCA (7,5 мкг/мл) або hVEGF (7,5 мкг/мл) з антитілом (0,5 мг/мл) або без нього. Через 1 год

після i.d.-ін'єкції тварин забивали й шкіру з 4 зонами відтинали. Одержували цифрове зображення шкіри. Отримані за допомогою пункційної біопсії дерматомми розміром 8 мм застосовували для вирізання зразків шкіри областей, у які здійснювали ін'єкції, і зразки шкіри інкубували в розчині формаміду 55°C протягом 48 год для екстракції барвника блакитного Еванса із тканин. Потім оцінювали абсорбцію розчину за допомогою спектрофотометра при довжині хвилі 605 нм.

Аналіз клітинної проліферації

Проліферацію клітин оцінювали за допомогою набору Cell Proliferation ELISA (фірма Roche). У цілому, метод полягав у наступному: клітини лінії HUVEC на стадії 90%-ної конфлюентності збирали й ресуспендували в середовищах для аналізу (DMEM:F12 50:50, 1,5% FBS) і висівали з розрахунку 3000 клітин на лунку в 96-лункові чорні планшети для культури тканини (ViewPlate-96, фірма Perkin Elmer), попередньо сенсibiliзовані 1% желатину. Клітини інкубували при 37°C протягом 16 год, заміняли середовища для аналізу на свіжі й інкубували протягом ще 8 год. Додавали в культуру VEGF (20 нг/мл) і різні антитіла й клітини інкубували протягом 20 год. Додавали призначений для мічення розчином Brd (5-бромдезоксидеоксиридин) до кінцевої концентрації 10 мМ і клітини інкубували протягом ще 24 год при 37°C. Включення Brd визначали за допомогою хемілюмінесцентного імуноаналізу.

Аналіз фосфорилування VEGFR2

Загальний VEGFR2 і фосфо-VEGFR2 визначали за допомогою наборів DuoSet IC ELISA (фірма R&D). У цілому, метод полягав у наступному: клітини лінії HUVEC на субконфлюентній стадії промивали 3ФР і лізували за допомогою відповідного лізуючого буфера. Клітинні лизати центрифугували при 14 кг протягом 5 хв при 4°C і супернатанти переносили в чисті пробірки. Потім здійснювали необхідні аналізи ELISA.

Імуноблотинг

Клітини лінії HUVEC на стадії конфлюентності витримували в умовах «голоду» протягом 16 год у середовищі EBM-2, доповненого 0,2% FBS і 0,1% BCA, а потім заміняли на середовище EBM-2, доповнене 0,1% BCA, після чого інкубували протягом 90 хв при 37°C. Додавали контрольне антитіло й антитіло до NRP1 з розрахунку 50 мкг/мл і клітини інкубували протягом 30 хв при 37°C. Клітини стимулювали VEGF (20 нг/мл) протягом 10 хв при 37°C, двічі промивали охолодженим на льоді 3ФР і лізували в буфері для лізису, що містить 20 Мм Трис, рН 7,5, 150мМ NaCl, 1% Тритон X-100, суміш I і II інгібіторів фосфатаз (фірма Sigma) і таблетку з інгібітором всіх протеаз (фірма Roche). Аліквоти лизатів піддавали електрофорезу в 4-20% Novex Трис-гліцинових ДСН-гелях (фірма Invitrogen), з наступним електропереносом на ПВДФ-мембрану типу Invitrolon (фірма Invitrogen). Застосовувані в цьому досліді первинні антитіла являли собою антитіла до Erk, до фосфо-Erk, до Akt, до фосфо-Akt, до p38, до фосфо-p38, до Src і до фосфо-Src (Tyr416), які всі одержували від фірми Cell Signaling Technology.

Результати

А. Вибіркова дія анти-NRP1^A і анти-NRP1^B на функцію Sema3A і зв'язування VEGF відповідно

Оцінювали здатність антитіл до NRP1 блокувати зв'язування VEGF₁₆₅ з NRP1. Анти-NRP1^B у значній мірі блокувало зв'язування VEGF з NRP1 на відміну від анти-NRP1^A (Фіг. 4). Ці результати дозволяють припустити, що CUB-домени (a1-a2) NRP1 не потрібні для зв'язування VEGF (Gu і ін., J Biol Chem 277, 2002, сс. 18069-18076).

Крім того, оцінювали вплив антитіл до NRP1 на функцію Sema3A. Раніше висловлювалося припущення, що Sema3A і VEGF₁₆₅ можуть мати перекривальні єднальні домени в N-кінцевій ділянці b1-домени, і тому вони можуть конкурувати за зв'язування з NRP1 (Gu і ін., J Biol Chem 277, 2002, сс. 18069-18076; Miao і ін., J Cell Biol 146, 1999, сс. 233-242). Тому можливо, що один МАТ до NRP1 може блокувати зв'язування як Sema3A, так і VEGF. МАТ до NRP1, запропоновані в даному винаході, оцінювали відносно їх здатності блокувати індукований Sema3A колапс точки росту аксона. Ганглії спинного корінця (DRG) вирізували з ембріонів мишей лінії E12.5 і культивували для створення точок росту сенсорних нейронів, чутливих до залежного від Sema3A/NRP1 колапсу (He і Tessier-Lavigne, Cell 90, 1997, сс. 739-751). Додавання в ці культури Sema3A сповільнювало утворення точками росту багатих актином структур. Однак, якщо в лунки одночасно з Sema3A додавали анти-NRP1^A, колапс повністю блокувався. На противагу цьому анти-NRP1^B не робило впливу на індукований Sema3A колапс (Фіг. 5А).

Таким чином, ці два антитіла мають функціонально різну дію: анти-NRP1^A блокує функцію Sema3A, але не робить впливу на зв'язування VEGF з NRP1; а анти-NRP1^B блокує зв'язування VEGF з NRP1, але не робить впливу на функцію Sema3A. Додаткові дослідження показали, що жодне з вивчених антитіл не блокує залежний від Sema3F/NRP2 колапс точки росту гіпокампа мишей лінії E17 (Фіг. 5Б), що погодиться з даними про те, що жодне із зазначених антитіл не зв'язується з NRP2. Таким чином, антитіла являють собою вибірковий інструмент зв'язування ролі NRP1 у біології судин і засобом виборчої блокади активності NRP1.

Б. Обое антитіла анти-NRP1^A і анти-NRP1^B знижують залежну від VEGF₁₆₅ міграцію ендотеліальних клітин і утворення відростків від гранул

У МАТ до NRP1, запропонованих у винаході, оцінювали знаходжуючися під контролем VEGF міграцію ендотеліальних клітин (ЕК). З використанням транслункової системи вносили ендотеліальні клітини пупочної вени людини (HUVEC) у верхню камеру, а VEGF додавали в нижню камеру для посилення міграції ЕК. Потім фіксували ЕК, які в результаті міграції виявилися в нижній камері, офарблювали й оцінювали їхню кількість (Фіг. 6А). У цьому й наступному експериментах антитіла до VEGF застосовували як позитивний контроль для блокади розташованої під контролем VEGF міграції ЕК (якщо не зазначене інше, застосовували антитіло, що володіє крос-видовою реактивністю, до VEGF B20.4.1; Liang і ін., J Biol Chem 281, 2006, сс. 951-961).

МАТ до NRP1 додавали до клітин у верхню камеру безпосередньо перед додаванням VEGF. Важливо відзначити, що й анти-NRP1^A, і анти-NRP1^B у значній мірі знижували міграцію ендотеліальних клітин, при цьому анти-NRP1 забезпечувало більше сильну блокаду міграції (Фіг. 6А). Аналогічні результати отримані з використанням інших типів ліній ЕК, таких як HUAEC і HAEC.

Для додаткової оцінки ролі NRP1 і МАТ до NRP1 у більше складних функціях ЕК, застосовували систему *in vitro* ангиогенного утворення відростків (Nakatsu і ін., Microvasc Res 66, 2003, сс. 102-112). У цьому аналізі нанесені на гранули ЕК утворювали відростки протягом 7-денного періоду, що приводило до утворення безлічі добре сформованих судинних структур, що простираються від кожної гранули. Додавання в ці структури будь-яких МАТ до NRP1 приводило до зменшення довжини судин і у випадку анти-NRP1^B до зниження кількості виявлених відростків. Ці дані були підтверджені кількісно (Фіг. 6Б). Антитіла до VEGF використали як позитивний контроль, і в цьому аналізі вони повністю блокували утворення відростків. Ці результати підтверджують виражену здатність кожного з вивчених МАТ знижувати міграцію ЕК і утворення відростків судин у цьому аналізі *in vitro*.

В. NRP1 необхідний для ремоделювання судин у сітківці мишей

Фенотипи, характерні для мишей з «виключеним» Nrp1, відповідають дефекту ремоделювання судин (Gu і ін., Dev Cell 5, 2003, сс. 45-57; Kawasaki і ін., Development 126, 1999, сс. 895-4902; Takashima і ін., Proc Natl Acad Sci U S A 99, 2002, сс. 3657-3662). У зв'язку із цим роль NRP1 у ремоделюванні судин оцінювали, аналізуючи вплив системної обробки МАТ до NRP1 на сітківку, що розвивається, мишей, що являє собою ідеальну модель для вивчення стереотипних випадків утворення судинних відростків, ремоделювання й дозрівання (Dorrell і Friedlander, Prog Retin Eye Res 25, 2006, сс. 277-295). У цілому, метод полягав у наступному: у новонароджених мишей астрогліальна мережа має здатність забезпечувати формування відростків ЕК від центральної артерії сітківки, локалізованої біля диска зорового нерва (ОНН). Через 1 день після народження (P1) у судинній мережі сітківки розвивається морфогенетична борозенка в шарі нервового волокна (NFL), що перебуває на шарі гангліозних клітин, що починає подовжуватися до краю сітківки за концентричною схемою, досягаючи половини цієї відстані до Р5 (Фіг. 7А). Протягом 3 наступних днів борозенка продовжує подовжуватися в напрямку до краю сітківки, у цей час судинне сплетіння, що примикає до ОНН, піддається стереотипному ремоделюванню, що полягає в стоншенні судинного сплетіння в удосконаленій капілярній мережі в NFL (Фіг. 7Б) і утворенні відростків судин у більше глибоких шарах сітківки (Фіг. 7В).

Антитіла вводили шляхом ін'єкції в новонароджених мишей, починаючи з P1, з наступними ін'єкціями через день до збору сітківки в P5 і P8. Для візуалізації судинної мережі сітківки офарблювали ізолектином В4 і порівнювали. У той час як удосконалена капілярна мережа в контрольній групі,

обробленої Ig, виявилася повністю сформованою між P5 і P8, зазначене ремоделювання судин повністю інгібувалося обома МАТ до NRP1. Це розходження оцінювали кількісно шляхом порівняння щільності судин у репрезентативних зображеннях, отриманих для судинної мережі NFL, в області, пов'язаною з ONH (Фіг. 7Г). Оскільки обробка кожним з МАТ до NRP1 приводила до вираженого інгібування ремоделювання судин, судинна щільність виявилася істотно вище в сітківці, обробленої як анти-NRP1^A, так і анти-NRP1^B, у порівнянні з контрольними варіантами. Важливо відзначити, що розвинена борозенка продовжувала подовжуватися в сітківці, обробленої обома МАТ до NRP, при цьому лише невелике інгібування подовження виявлено в сітківці тварин, оброблених анти-NRP1^B (Фіг. 7Д). Ці результати дозволяють припустити, що розвиток сітківки інгібувався не повністю, але замість цього при обробці кожним з МАТ до NRP1 відбувається специфічна блокада ремоделювання судин.

На відміну від обробки МАТ до NRP1, обробка антитілами до VEGF приводила до зниження судинної щільності в сітківці в порівнянні з контролем (Фіг. 7Г). По даним якісної оцінки судини в оброблених антитілом до VEGF сітківках мали знижену комплексність до P8, ця тенденція в менш вираженому ступені виявлений до P5. Ці дані дозволяють припустити, що обробка антитілом до VEGF призводить або до блокади початкового утворення відростків і/або регресії судин. Важливо відзначити, що системне введення антитіла до VEGF несуттєво знижувало подовження судинної борозенки (Фіг. 7Д). Це, імовірно, є наслідком слабкої дифузії антитіла в клітини верхівки, що подовжується, через відсутність судинних порожнин у цьому зовнішньому шарі (Gerhardt і ін., *J Cell Biol* 161, 2003, сс. 1163-1177).

Оцінка сітківки в P8 дозволяла також додатково досліджувати впливу обробки антитілом на ангиогенне утворення відростків. Між P5 і P8 у судин починалося утворення відростків від судинної мережі NFL у більше глибокі судинні шари, що приводило до формування зовнішнього плексиформного шару (OPL) судинної мережі, що є зовнішнім відносного зовнішнього ядерного шару і являє собою найглибше судинне ложе в сітківці (Фіг. 7В). Далі в процесі розвитку відбувається утворення відростків від колатералей, які досягають OPL, що приводить до формування проміжного судинного ложа (пухирця), що називають внутрішнім плексиформним шаром (IPL). Зображення OPL, отримані в P8, свідчать про повне інгібування утворення відростків обробкою як обома МАТ до NRP1, так і антитілом до VEGF.

Наявність різних фенотипів, виявлених у сітківках тварин, яких системно обробляли або анти-NRP1^A, або анти-NRP1^B, у порівнянні з обробкою антитілом до VEGF, дозволяє припустити, що NRP1 може регулювати функції ЕК за допомогою механізму, відмінного від посилення шляху передачі сигналу VEGFR2.

Г. Блокада функції NRP1 впливає на передачу сигналу VEGFR2

З врахуванням того, що NRP1 необхідно для міграції ендотеліальних клітин у відповідь на вплив VEGF, при створенні винаходу вивчали необхідність присутності NRP1 при проліферації ЕК і вплив на проникність судин, тобто на два різних види активності клітин, які індукуються VEGF. Несподівано було встановлено, що ні обробка анти-NRP1^A, ні NRP1^B не робила впливу на індуковану VEGF проникність, у той час як антитіла до VEGF викликали виражену блокаду (Фіг. 8А). Аналогічна тенденція виявлена при оцінці індукованої VEGF проліферації ЕК, при цьому анти-NRP1^A не мало здатність блокувати проліферацію, а анти-NRP1^B викликало лише невелике залежне від дози зниження (Фіг. 8Б). Ці результати підтвердили раніше опубліковані дані про те, що «вимикання» *siRNA* NRP1 в ЕК не робило впливу на індуковану VEGF проліферацію (Murga і ін., *Blood* 105, 2005, сс. 1992-1999), і це дозволяє припустити, що основна роль NRP1 у контрольованому VEGF поведженні ЕК складається в опосередкуванні клітинної міграції.

Вивчали вплив антитіл до NRP1 на передачу сигналу VEGFR2. VEGF зв'язується із другим і третім позаклітинними IgG-доменами VEGFR2 і активує рецептор шляхом запуску автофосфорилювання декількох залишків тіроzinу у внутрішньоклітинному домені. На відміну від антитіла до VEGF, що повністю блокує фосфорилювання VEGFR2, індуковане VEGF в HUVEC, анти-NRP1^A несуттєво змінювало рівні фосфорилювання VEGFR2, у той час як анти-NRP1^B викликало лише невелике зниження фосфорилювання (Фіг. 8В).

Більш імовірно, NRP1 не роблячи безпосереднього впливу на регуляцію фосфорилювання VEGFR2, може модулювати специфічні шляхи VEGFR2. Для оцінки цього припущення вивчали вплив обробки антитілом до NRP1 на розташовані в напрямку передачі сигналу події, опосередковувані VEGFR2. Відомо, що VEGFR2 індукуює проліферацію ЕК через активацію активованих мітогеном протеїнкіназ Erk1/2 (Rousseau і ін., *Oncogene* 15, 1997, сс. 2169-2177; Takahashi і ін. Shibuya, *Oncogene* 18, 1999, сс. 2221-2230), і регулюють виживання ЕК і проникність судин через шлях PI3-кінази/Akt (Chen і ін., *Nat Med* 11, 2005, сс. 1188-1196; Gerber і ін., *J Biol Chem* 273, 1998, сс. 13313-13316; Six і ін., *FEBS Lett* 532, 2002, сс. 67-69). Інкубація з анти-NRP1^A і анти-NRP1^B не робила впливу на індуковане VEGF фосфорилювання Erk1/2 або Akt, що відповідає даним про те, що обробка МАТ до NRP1 несуттєво змінює індуковану VEGF проліферацію ЕК або проникність судин. З іншого боку, інгібування функції NRP1 антитілами до NRP1 у значній мірі знижує міграцію ЕК. Імовірно, NRP1 специфічно регулює шляхи VEGFR2, необхідні для клітинної рухливості, наприклад, шлях MAP-кінази p38, що, як відомо, необхідно для регульованої VEGF реорганізації актину в ЕК і міграції клітин (Rousseau і ін., *Oncogene*, 1997, 15, сс. 2169-2177). Обробка як анти-NRP1^A, так і й анти-NRP1^B приводила до невеликого зниження рівня фосфорилювання p38 в HUVEC (Фіг. 8Г), що підтверджує цю гіпотезу. Однак мало імовірно, що тільки невелике зниження фосфорилювання p38

приводить до виявленого при створенні винаходу значному зниженню міграції й утворення відростків, що описано в попередніх розділах (Фіг. 6), або пояснює якісні розходження фенотипів, виявлені при обробках Мат до NRP1 і Мат до VEGF в експериментах по ремоделюванню судин (Фіг. 7).

Приклад 3. Протипухлинна інгібуюча активність антитіл до NRP1

Матеріали й методи

Людські клітинні лінії недрібноклітинного раку легене H1299 і SK-MES-1 одержували з ATCC (Роквілл, шт. Мериленд). При вивченні лінії SK-MES-1, кожної безтимусної HRLN-самці миші імплантували s.c. у бічну дялінку фрагмент пухлини обсягом 1 мм^3 . При вивченні лінії H1299 1×10^7 пухлинних клітин ін'єкували s.c. у бічну дялінку кожної безтимусної HRLN-самці миші. Ріст пухлини оцінювали двічі в тиждень за допомогою кронциркуля. Коли пухлини досягали розміру $80\text{--}120 \text{ мм}^3$, мишей розділяли на групи приблизно з однаковими середніми розмірами пухлини й починали обробку. У кожному експерименті цей день приймали за день 1. Всі обробки регулювали щодо ваги, використовуючи норму витрати $0,2 \text{ мол}/20 \text{ р.}$ Обсяг пухлини (мм^3) розраховували як $\text{ширина}^2 \times \text{довжину}/2$. Відсоток інгібування росту пухлини (%TGI) розраховували в такий спосіб: (медіанний обсяг пухлини в контрольних тварин (контрольний варіант) - медіанний обсяг пухлини в оброблених тварин (оброблений варіант)/медіанний обсяг пухлини в контрольних тварин (контрольний варіант) $\times 100$. %TGI визначали тільки у випадку, коли всі тварини в групі залишалися живими в процесі експерименту (для лінії SK-MES-1 цей період становив 22 дні; для H1299 - 15 днів). Час до закінчення (TTE) $= \log_{10}(\text{обсяг, мм}^3) - b/m$; де b являє собою значення постійного члена в рівнянні регресії, а m являє собою крутість нахилу прямої, отриманої шляхом лінійної регресії, виражені у вигляді log росту пухлини. Відсоток уповільнення росту пухлини (%TGD) $= (\text{медіанне TTE для обробленого варіанта} - \text{медіанне TTE для контрольного варіанта}) \times 100$.

Мишей анестезували авертином (1,3% триброметанола й 0,8% амлового спирту; фірма Sigma-Aldrich). Мічений за допомогою ФІТЦ лектин *Lycopersicon esculentum* (150 мкг в 150 мкл 0,9% NaCl; фірма Vector Laboratories) ін'єкували за 3 хв до системної перфузії. Судинну мережу надавали транскардіальній перфузії 4% параформальдегіда (ПФА) у ЗФР протягом 2-3 хв. Пухлини видаляли й потім фіксували шляхом занурення в зазначений фіксуючий агент на 16 год із наступною інкубацією протягом ночі в 30%-ний сахарозі для кріозахисту, потім занурювали в ОСТ (ортохлортолуол) і заморозували. Одержували зрізи (товщиною 30 мкм) і поміщали на скляні предметні стекла, регідратували й блокували в ЗФР (ЗФР, 0,5% Тритон X-100), доповненому 5% несенсибілізованої козячої сироватки протягом 2 год при кімнатній температурі. Зрізи інкубували протягом ночі з анти-NRP1^B (1:500) або щурячим антитілом до мишачого PDGFR β (1:1000; клон APB5, фірма eBioscience) при 4°C. Потім зрізи промивали 4 рази ЗФР і інкубували із вторинними антитілами,

таким як козяче антитіло до людського Ig Alexa 488 і козяче антитіло до щурячого Ig Alexa 568 (1:200; фірма Molecular Probes) протягом 4 год при кімнатній температурі. Після завершення фарбування зрізи промивали 4 рази в ЗФР, піддавали наступної фіксації за допомогою 4% ПФА в ЗФР, а потім ще раз промивали 4 рази ЗФР. Розчин, отриманий після останнього промивання, видаляли й додавали 1-2 краплі Fluoromount-G (фірма SouthernBiotech). На зразки поміщали скляні покривні стекла й одержували зображення за допомогою флуоресцентного мікроскопа Zeiss Axiophot.

Результати

Установлено, що блокування шляху VEGF знижує неоваскуляризацию на мишачих моделях пухлини й при людському раку (Ferrara і Kerbel, Nature 438, 2005, сс. 967-974). Однак, імовірно, що в деяких пухлин формування судин у меншому ступені залежить від VEGF, або вони можуть не мати чутливості до терапії на основі антитіл до VEGF (Jain і ін., Nat Clin Pract Oncol 3, 2006, сс. 24-40; Kerbel і ін., Cancer Metastasis Rev 20, 2001, сс. 79-86). Для рішення питання про те, чи може блокада NRP1 підсилювати інгібування росту пухлини шляхом блокади VEGF, при створенні винаходу були відібрані кілька моделей ксенотрансплантатів пухлин, для яких відомо, що вони мають різну чутливість до терапії на основі антитіл до VEGF. Оскільки встановлено, що VEGF строми мишей, аналогічно отриманому з пухлини VEGF, впливає на ріст пухлини, при створенні винаходу застосовували Мат до VEGF, які розпізнають і мишачий, і людський VEGF (Liang і ін., J Biol Chem 281, 2006, сс. 951-961).

Ці експерименти проводили для оцінки впливу блокади тільки NRP1 і в сполученні з антитілом до VEGF. В експерименті застосовували також антитіло до VEGF як єдиний агент і антитіло, що представляє собою контроль ізотипа. Лінія SK-MES-1 являє собою модель ксенотрансплантата NSCLC, експресуючого насамперед NRP1 у судинній тканині й у тканині строми, із середнім рівнем експресії в пухлинних клітинах. На цій моделі встановлено, що антитіло до VEGF інгібувало ріст пухлини (TGI) на рівні 52%, анти-NRP1^B при використанні як єдиний агент забезпечувало TGI на рівні 37%, а анти-NRP1^A не робило істотного впливу на TGI (Фіг. 9A).

Важливо відзначити, що адитивна дія виявлена при використанні будь-якого антитіла до NRP1 у сполученні з антитілом до VEGF. Як показано на Фіг. 10A, анти-NRP1^A при його застосуванні в сполученні з антитілом до VEGF приводило до підвищення рівня TGI від приблизно 52% до приблизно 70%; а анти-NRP1^B при його застосуванні в сполученні з антитілом до VEGF, приводило до підвищення рівня TGI приблизно до 77% (Фіг. 9A). Аналогічні результати були отримані на моделі ксенотрансплантата NSCLC H1299, у якій також відбувається експресія високих рівнів NRP1 у судинній тканині й тканині строми, але в меншому ступені в пухлинних клітинах. Введення анти-NRP1^B як єдиний агент забезпечувало TGI на рівні 39%. антитіло до VEGF забезпечувало TGI на рівні

28%, а введення комбінації забезпечувало TGI на рівні 51% (Фіг. 9B).

При використанні SK-MES-1-моделі тварин обробляли в день 35 і потім обробку продовжували до дня 60 для оцінки вповільнення росту пухлин (тварин виключали з експерименту при перевищенні розміру пухлини 1500 мм³; жодна тварина не була виключена в результаті токсичності). Із графіка Каплана-Мейера видно, що обоє MAT до NRP1 роблять істотний вплив при використанні комбінації (combination arms) у відношенні вповільненні росту пухлини при використанні агента індивідуально (Фіг. 9B). Оцінка вповільнення росту пухлини (TGD) показала, що при використанні анти-NRP1^A як єдиний агент не виявлено ніякого вповільнення росту; TGD на рівні 24% виявлено при застосуванні анти-NRP1^B; TGD на рівні 60% при використанні антитіла до VEGF; TGD на рівні 93% виявлено при використанні комбінації анти-NRP1^A + антитіла до VEGF; і на рівні 96% при використанні комбінації анти-NRP1^B + антитіла до VEGF.

Результати, аналогічні отриманим при використанні NSCLC-моделей, виявлені також на мишачій моделі раку молочної залози, позначеного по вихідній лінії (лінія-засновник) 5 (Fo5), у якій пухлини, викликані трансгенною експресією MMTV-Her2, висікали й імплантували безтимусним мишам (Finkle і ін., Clin Cancer Res 10, 2004, сс. 2499-2511). На зазначеній моделі експресія NRP1 відбувалася насамперед у судинах і стромі, що примикає, і при використанні цього варіанта антитіла до VEGF також робило лише частковий вплив на зниження росту пухлини (Фіг. 9B). Інгібування росту виявилось аналогічним інгібуванню росту, виявленому при використанні NSCLC-моделей, при цьому для виявлення гістологічних змін у результаті обробки антитілами до NRP1 і антитілами до VEGF, оцінку тварин проводили в той же день, що й в описаному раніше експерименті (пунктирна лінія; Фіг. 9B).

При використанні Fo5-моделі гістологічне вивчення судин при створенні винаходу дозволило встановити, що в контрольних пухлинах виявлені дуже великі судини, що мають неорганізовану будову, у яких, як правило, відсутнє покриття з перичитів, що встановлено за допомогою імуногістохімічного аналізу PDGFR-. Обробка тільки антитілом до VEGF приводила до зменшення діаметра судин і до загального зниження щільності судин. Крім того, більшість, якщо не всі, судини, які зберігалися після обробки антитілом до VEGF, перебували в тісній асоціації з перичитами. Аналогічні результати одержували при використанні інших маркерів перичитів.

Судини в пухлинах, оброблених індивідуально кожним з MAT до NRP1, мали подібну морфологічну будову із судинами, обробленими антитілами до NRP1, у сітківці новонароджених мишей, при цьому судини були плоскими й мали неорганізовану будову, маючи вигляд, що нагадує сплетіння. З іншого боку, аналогічно контрольним судинам неопрацьованої пухлини, у пухлинах, оброблених кожним MAT до NRP1, також було відсутнє помітне покриття з перичитів. Найцікавішим є той факт, що

в пухлинах, оброблених антитілом до VEGF і кожного з анти-NRP1^A або анти-NRP1^B, виявлений комбінований фенотип, що проявлявся в тому, що відбувалося зменшення судин, аналогічно тому, що було виявлено для оброблених антитілом до VEGF пухлинах, але судини, що залишилися, виглядали менш сформованими, і в них була відсутня тісна асоціація з перичитами.

Ці морфологічні дані корелювали з кількісними змінами щільності судин. Як видно з Фіг. 10, обробка як антитілами до NRP1, так і антитілом VEGF приводила до зниження щільності судин (10A). З іншого боку, імовірно, тільки обробка антитілом до VEGF підсилює фарбування перичитів у вивчених зразках пухлини в порівнянні з контролем. У цілому, співвідношення перичитів/судин, обмірюване щодо покриття з перичитів, свідчить про те, що в пухлинах, оброблених антитілом до VEGF, виявлене найвище співвідношення, що знижується при обробці анти-NRP1^A і анти-NRP1^B.

Дані про те, що антитіла до NRP1 (анти-NRP1^A і анти-NRP1^B) і антитіла до VEGF можуть блокувати різні функції й/або шляхи передачі сигналів ЕК, дозволяють припустити, що спільне застосування цих антитіл для обробки модельних пухлин може привести до адитивної або синергічної дії відносно вповільнення росту пухлин. Дійсно, виражена адитивна дія виявлена при об'єднанні антитіла до NRP1 з антитілом до VEGF (Фіг. 9). При цьому, при використанні анти-NRP1^A отримані результати свідчать скоріше про синергічну, а не адитивну дію, оскільки на декількох моделях пухлин середній обсяг пухлини після обробки анти-NRP1^A як єдиний агент, не відрізнявся істотно від контролю, але при використанні цього антитіла в сполученні з антитілом до VEGF істотно підвищувалася відповідь пухлини в порівнянні із застосуванням тільки одного антитіла до VEGF. Обробка анти-NRP1^B як єдиного агента приводила до істотного вповільнення росту пухлини. Важливо відзначити, що ця дія тільки в незначному ступені була нижче, ніж при застосуванні тільки антитіла до VEGF. Однак уповільнення росту пухлини при застосуванні комбінації, що включає анти-NRP1^B, виявилось аналогічним дії при застосуванні комбінації, що включає анти-NRP1^A. Ефект анти-NRP1^B при його індивідуальному застосуванні може бути результатом щодо більш сильної інгібуючої дії відносно утворення відростків і in vivo ангиогенезу в порівнянні з анти-NRP1^A. З іншого боку, обидва антитіла практично з однаковою ефективністю блокували ремоделювання судин при аналізі розвитку мишачої сітківки й інгібували асоціацію перичитів із судинами на Fo5-моделі пухлини.

Можна припустити, що ремоделювання судин у сітківці відбувається у відсутності тісної асоціації з перичитами, можливо, перичити служать для стабілізації незрілих кровоносних судин, завершуючи період збереження пластичності при ремоделюванні судин (Benjamin і ін., Development, 125, 1998, сс. 1591-1598). Результати, отримані при створенні даного винаходу, дозволяють припустити, що NRP1 необхідно для цього складного процесу ремоделювання судин, що полягає в морфо-

генезі судинного сплетіння в тонких капілярах з наступним дозріванням.

Запропонована й експериментальна перевірка ідея про те, що перицити стабілізують судини пухлини, що приводить до стійкості до терапії на основі антитіл до VEGF у результаті втрати судинами залежності від VEGF (Bergers і ін., *J Clin Invest* 111, 2003, сс. 1287-1295; Erber і ін., *Faseb J* 18, 2004, сс. 338-340). У цих дослідження виявлено, що блокада функції як VEGF (ліганд ЕК), так і PDGF (ліганд перицитів) приводить до подальшого руйнування судинної мережі пухлини. Таким чином, за допомогою дослідів по візуалізації встановлено, що блокада тільки функції VEGF у пухлинах приводить до значного регресу судин, але при цьому судини, що залишилися, стають «нормалізованими» завдяки тісній асоціації з перицитами, даючи можливість у наслідку незрілим судинам піддаватися ремоделюванню й дозріванню судин (Inai і ін., *Am J Pathol* 165, 2004, сс. 35-52).

На основі даних, отриманих при оцінці сітківки, що дозріває, можна постулювати, що блокада функції NRP1 у пухлинах може також знижувати ремоделювання судин пухлини, інгібуючи надалі дозрівання судин, підтримуючи тим самим у судинах статус залежності від VEGF. Це явище саме по собі може не робити істотного впливу на вповільнення росту пухлини, оскільки судинам пухлини вже властиво порушення організації (Baluk і ін., *Curr Opin Genet Dev* 15, 2005, сс. 102-111). Це припущення погодиться з даними про те, що хоча анти-NRP1^A значно інгібує ремоделювання судин, при створенні винаходу при використанні зазначеного антитіла як єдиний агент не виявлено зниження росту пухлини. Однак можна припустити, що блокада ремоделювання й наступного дозрівання судин у сполученні з терапією на основі антитіл до VEGF може надавати судинам, що залишилися, пухлини більшу чутливість до регресу. Експерименти, проведені при створенні даного винаходу, продемонстрували, що судини, що залишилися в пухлинах, оброблених кожним з МАТ до NRP1 у сполученні з антитілом до VEGF, фактично були позбавлені асоціації з перицитами. Ці

результати дозволяють припустити, що адитивна дія, виявлена при блокаді як функції NRP1, так і VEGF, може приводити в результаті до того, що збережені судини в оброблених антитілом до VEGF пухлинах, стають більше чутливими до регресу.

На основі результатів, отриманих при оцінці дозрівання сітківки й моделей ксенотрансплантатів пухлини, можна припустити, що блокада функції NRP1 у знову сформованих судинах інгібує ремоделювання й наступне дозрівання судин, що робить виживання цих судин більше залежним від VEGF (див. модель на Фіг. 11А). Відповідно до цієї моделі при створенні винаходу було виявлено істотне зниження щільності судин у сітківці, що розвивається, новонароджених мишей, оброблених як анти-NRP^{1B}, так і антитілом до VEGF з використанням для кожного агента половинної дози щодо дози при його застосуванні як єдиний агент (однократна доза 10 мг/кг, комбінована доза - 5 мг/кг кожного антитіла (див. Фіг 11B у порівнянні з Фіг. 7Г).

Крім того, можливо, що NRP1 може вимагатися також не тільки для функції ендотелію, але також і для функції перицитів. У цей час відомо, що bFGF індукує підвищувальну регуляцію NRP1 у гладеньком'язевих клітинах, що обумовлює здатність VEGF індукувати міграцію гладеньком'язевих клітин (Liu і ін., *Cytokine* 32 2005, сс. 206-212). В експерименті, представленому в даному описі, виявлена експресія NRP1 на людських гладеньком'язевих клітинах, а також на перицитах у різних людських і мишачих пухлинах (наприклад, експресія NRP1 простирається до ділянок, що примикають до позитивного відносно фарбування лектином областям на Fo5-моделі).

Таким чином, експерименти, представлені в даному описі, демонструють, що блокада функції NRP1 і VEGF у використуванні як моделі пухлини, приводить до адитивної дії відносно зниження росту пухлини. Представлені також дані про те, що NRP1 може діяти також за допомогою механізмів, відрізняючись від передачі сигналів VEGFR2.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Дженентек, Інк.

<120> Антагоністи нейропептиду

<130> P2291R1 PCT

<140> PCT/US2006/043516

<141> 2006-08-11

<150> US 60/734,798

<151> 2005-11-08

<150> US 60/820,561

<151> 2006-07-27

<160> 134

<210> 1

<211> 108

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 1

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

87

96139

88

20 25 30

Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys

35 40 45

Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile

65 70 75

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln

80 85 90

Ser Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu

95 100 105

Ile Lys Arg

<210> 2

<211> 120

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 2

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

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

Glu Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg 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 Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr
95 100 105

Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
110 115 120

<210> 3

<211> 108

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 3

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 Ser Ile Ser

20 25 30

Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys

35 40 45

Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala 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

Tyr Met Ser Val Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu

95 100 105

Ile Lys Arg

<210> 4

<211> 119

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 4

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 Ser
 20 25 30

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

Glu Trp Val Ser Ser Ile Thr Gly Lys Asn Gly Tyr 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 Trp Gly Lys Lys Val Tyr Gly
 95 100 105

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 110 115

<210> 5

<211> 108

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 5

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 Tyr Phe Ser
 20 25 30

Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 35 40 45

Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala 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

Tyr Leu Gly Ser Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 95 100 105

Ile Lys Arg

<210> 6

<211> 122

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 6

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

Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

35 40 45

Glu Trp Val Ser Gln Ile Ser Pro Ala Gly Gly Tyr Thr Asn 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 Glu Leu Pro Tyr Tyr Arg Met

95 100 105

Ser Lys Val Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val

110 115 120

Ser Ser

<210> 7

<211> 6

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 7

Tyr Met Ser Val Pro Ile

5

<210> 8

<211> 6

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 8

Tyr Tyr Ser Ser Pro Leu

5

<210> 9

<211> 6

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 9

Tyr Tyr Ser Ser Pro Leu

<210> 10

<211> 6

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 10

Тyr Tyr Ser Ser Pro Leu

5

<210> 11

<211> 6

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 11

Тyr Tyr Ser Ser Pro Leu

5

<210> 12

<211> 6

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 12

Arg Tyr Ser Val Pro Ile

5

<210> 13

<211> 6

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 13

Tyr Tyr Ser Ser Pro Leu

5

<210> 14

<211> 6

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 14

Tyr Tyr Ser Ser Pro Leu

5

<210> 15

<211> 6

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 15

Tyr Tyr Ser Ser Pro Leu

5

<210> 16

<211> 6

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 16

Tyr Tyr Ser Ser Pro Leu

5

<210> 17

<211> 6

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 17

Tyr Tyr Ser Ser Pro Leu

<210> 18

<211> 8

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 18

Phe Ser Phe Ser Ser Glu Pro Ile

5

<210> 19

<211> 8

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 19

Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met

5

<210> 20

<211> 8

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 20

Tyr Ser Phe Ser Ser His Met Met

5

<210> 21

<211> 8

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 21

Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met

5

<210> 22

<211> 8

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 22

Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met

5

<210> 23

<211> 8

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 23

Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gln Leu

5

<210> 24

<211> 8

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 24

Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met

5

<210> 25

<211> 8

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 25

Phe Thr Phe Ser Gln Tyr Ser Ile

5

<210> 26

<211> 8

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 26

Phe Thr Phe Thr Ser Arg Thr Met

5

<210> 27

<211> 8

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 27

Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met

5

<210> 28

<211> 8

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 28

Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met

5

<210> 29

<211> 9

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 29

Ser Ile Thr Gly Lys Asn Gly Tyr Tyr

5

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 30

Ser Ile Ala Gly Ser Gly Gly Tyr Tyr

5

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 31

Ser Ile Tyr Pro Pro Gly Gly Tyr Tyr

5

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 32

Thr Ile Ile Pro His Gly Gly Tyr Tyr

5

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 33

Trp Ile Ser Pro Leu Asn Gly Tyr Tyr

5

<210> 34

<211> 8

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 34

Ser Ile Phe Ser Gly Gly Tyr Tyr

5

<210> 35

<211> 9

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 35

Ser Ile Ser Arg Gly Asp Gly Tyr Tyr

5

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 36

Thr Ile Tyr Pro Phe Gly Gly Tyr Tyr

5

<210> 37

<211> 8

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 37

Ser Ile Ser Ser Gly Gly Tyr Tyr

5

<210> 38

<211> 9

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 38

Ser Ile Tyr Ser Thr Gly Gly Tyr Tyr

5

<210> 39
<211> 9
<212> PRT
<213> штучна послідовність

<220>
<223> синтезована послідовність

<400> 39
Gln Ile Ser Pro Ala Gly Gly Tyr Asn
5

<210> 40
<211> 10
<212> PRT
<213> штучна послідовність

<220>
<223> синтезована послідовність

<400> 40
Trp Gly Lys Lys Val Tyr Gly Met Asp Val
5 10

<210> 41
<211> 11
<212> PRT
<213> штучна послідовність

<220>
<223> синтезована послідовність

<400> 41

Trp Gly Gly Ser Asn Gly Ser Gly Phe Asp Tyr

5 10

<210> 42

<211> 10

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 42

Trp Gly Ser Arg Ser Pro Gly Met Asp Val

5 10

<210> 43

<211> 10

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 43

Trp Ala Lys Arg Ser Tyr Gly Met Asp Val

5 10

<210> 44

<211> 10

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 44

Trp Gly Arg Arg Tyr Ile Gly Met Asp Val

5

10

<210> 45

<211> 8

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 45

Tyr Gly Asn His Val Met Asp Val

5

<210> 46

<211> 9

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 46

Trp Ala Gly Gly Ser Ala Met Asp Val

5

<210> 47

<211> 14

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 47

Phe Gly Gln Ser Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Val

5 10

<210> 48

<211> 9

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 48

Trp Glu Ser Tyr Tyr Gly Met Asp Val

5

<210> 49

<211> 8

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 49

Trp Gly Tyr Pro Gly Met Asp Val

5

<210> 50

<211> 13

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 50

Glu Leu Pro Tyr Tyr Arg Met Ser Lys Val Met Asp Val

5

10

<210> 51

<211> 5

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 51

Ser Ile Ser Ser Tyr

5

<210> 52

<211> 5

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 52

Tyr Ile Ser Ser Tyr

5

<210> 53

<211> 5

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 53

Tyr Ile Ser Ser Tyr

5

<210> 54

<211> 5

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 54

Tyr Ile Ser Ser Tyr

5

<210> 55

<211> 5

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 55

Tyr Ile Ser Ser Tyr

5

<210> 56

<211> 5

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 56

Tyr Ile Ser Ser Tyr

5

<210> 57

<211> 5

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 57

Tyr Ile Ser Ser Tyr

5

<210> 58

<211> 5

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 58

Arg Ile Ser Ser Tyr

5

<210> 59

<211> 5

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 59

Tyr Ile Ser Ser Tyr

5

<210> 60

<211> 5

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 60

Trp Ile His Ser Tyr

5

<210> 61

<211> 5

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 61

Arg Ile His Ser Tyr

5

<210> 62

<211> 5

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 62

Tyr Ile His Ser Tyr

5

<210> 63

<211> 5

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 63

Pro Leu His Ser Tyr

5

<210> 64

<211> 5

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 64

Tyr Leu Ser Ser Tyr

5

<210> 65

<211> 5

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 65

Tyr Leu Ser Ser Tyr

5

<210> 66

<211> 5

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 66

Tyr Phe Ser Ser Tyr

5

<210> 67

<211> 5

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 67

Tyr Phe Ser Ser Tyr

5

<210> 68

<211> 5

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 68

Tyr Phe Ser Ser Tyr

5

<210> 69

<211> 5

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 69

Leu Thr His Ser Tyr

5

<210> 70

<211> 5

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 70

Arg Thr His Ser Tyr

5

<210> 71

<211> 5

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 71

Tyr Thr His Ser Tyr

5

<210> 72

<211> 5

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 72

Tyr Thr His Ser Tyr

5

<210> 73

<211> 5

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 73

Trp Thr His Ser Tyr

5

<210> 74

<211> 5

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 74

Trp Val His Ser Tyr

5

<210> 75

<211> 6

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 75

Gly Ala Ser Ser Arg Ala

5

<210> 76

<211> 6

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 76

Gly Ala Ser Arg Arg Ala

5

<210> 77

<211> 6

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 77

Gly Ala Ser Arg Arg Glu

5

<210> 78

<211> 6

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 78

Gly Ala Ser Ser Arg Ala

5

<210> 79

<211> 6

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 79

Gly Ala Ser Arg Arg Ala

5

<210> 80

<211> 6

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 80

Gly Ala Ser Ser Arg Glu

5

<210> 81

<211> 6

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 81

Gly Ala Ser Ser Gly Glu

5

<210> 82

<211> 6

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 82

Gly Ala Ser Arg Arg Glu

5

<210> 83

<211> 6

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 83

Gly Ala Ser Ser Arg Ala

5

<210> 84

<211> 6

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 84

Gly Ala Ser Ser Ser Ala

5

<210> 85

<211> 6

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 85

Gly Ala Ser Ser Arg Ala

5

<210> 86

<211> 6

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 86

Gly Ala Ser Arg Arg Ala

5

<210> 87

<211> 6

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 87

Gly Ala Ser Ser Arg Ala

5

<210> 88

<211> 6

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 88

Gly Ala Ser Ser Ser Glu

5

<210> 89

<211> 6

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 89

Gly Ala Ser Ser Arg Ala

5

<210> 90

<211> 6

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 90

Gly Ala Ser Thr His Glu

5

<210> 91

<211> 6

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 91

Gly Ala Ser Thr Leu Ala

5

<210> 92

<211> 6

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 92

Gly Ala Ser Ser Arg Ala

5

<210> 93

<211> 6

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 93

Gly Ala Ser Ser Arg Ala

5

<210> 94

<211> 6

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 94

Gly Ala Ser Ser Arg Ala

5

<210> 95

<211> 6

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 95

Gly Ala Ser Ser Arg Ala

5

<210> 96

<211> 6

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 96

Gly Ala Ser Ser Arg Ala

5

<210> 97

<211> 6

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 97

Gly Ala Ser Arg Leu Glu

5

<210> 98

<211> 6

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 98

Gly Ala Ser Ser Arg Ala

5

<210> 99

<211> 5

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 99

Tyr Ser Ser Pro Leu

5

<210> 100

<211> 5

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 100

Ile Gly Ser Pro Ile

5

<210> 101

<211> 5

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 101

Leu Asn Ser Pro Leu

5

<210> 102

<211> 5

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 102

Ile Val Ser Pro Leu

5

<210> 103

<211> 5

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 103

Leu Arg Ser Pro His

5

<210> 104

<211> 5

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 104

Leu Ser Ser Pro Ile

5

<210> 105

<211> 5

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 105

Ile Ile Ser Pro Ile

5

<210> 106

<211> 5

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 106

Lys Leu Ser Pro Leu

5

<210> 107

<211> 5

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 107

Lys Ser Ser Pro Arg

5

<210> 108

<211> 5

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 108

Tyr Ser Ser Pro Leu

5

<210> 109

<211> 5

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 109

Tyr Ile Ser Pro Leu

5

<210> 110

<211> 5

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 110

Tyr Gly Thr Pro His

5

<210> 111

<211> 5

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 111

Tyr Arg Ser Pro Leu

5

<210> 112

<211> 5

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 112

Ile Ser Val Pro Leu

5

<210> 113

<211> 5

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 113

Leu Arg Ser Pro Ile

5

<210> 114

<211> 5

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 114

Ile Arg Ser Pro Leu

5

<210> 115

<211> 5

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 115

Ile Arg Ser Pro Leu

5

<210> 116

<211> 5

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 116

Leu Gly Ser Pro Pro

5

<210> 117

<211> 5

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 117

Tyr Ser Ser Pro Leu

5

<210> 118

<211> 5

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 118

Tyr Gly Ser Pro His

5

<210> 119

<211> 5

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 119

Tyr Ser Ser Pro Ile

5

<210> 120

<211> 5

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 120

Tyr Ser Ser Pro Val

5

<210> 121

<211> 5

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 121

Phe Ile Ser Pro His

5

<210> 122

<211> 5

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 122

Tyr Gly Thr Pro Ile

5

<210> 123

<211> 11

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 123

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Ala

5

10

<210> 124

<211> 7

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 124

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Ser

5

<210> 125

<211> 9

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 125

Gln Gln Tyr Met Ser Val Pro Ile Thr

5

<210> 126

<211> 10

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 126

Gly Phe Ser Phe Ser Ser Glu Pro Ile Ser

5 10

<210> 127

<211> 18

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 127

Ser Ser Ile Thr Gly Lys Asn Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser

1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 128

<211> 10

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 128

Trp Gly Lys Lys Val Tyr Gly Met Asp Val

5 10

<210> 129

<211> 11

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 129

Arg Ala Ser Gln Tyr Phe Ser Ser Tyr Leu Ala

5

10

<210> 130

<211> 7

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 130

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Ser

5

<210> 131

<211> 9

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 131

Gln Gln Tyr Leu Gly Ser Pro Pro Thr

5

<210> 132

<211> 10

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 132

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser

5

10

<210> 133

<211> 18

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

<400> 133

Ser Gln Ile Ser Pro Ala Gly Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser

1

5

10

15

Val Lys Gly

<210> 134

<211> 13

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтезована послідовність

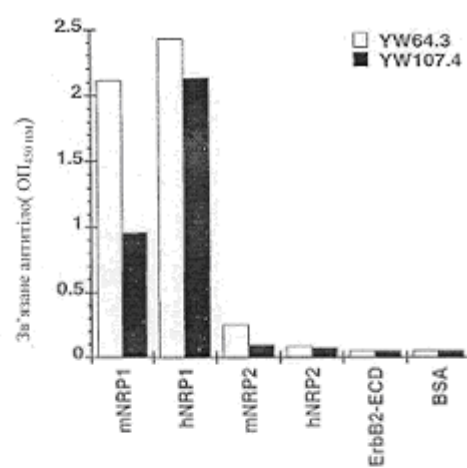
<400> 134

Glu Leu Pro Tyr Tyr Arg Met Ser Lys Val Met Asp Val

5

10

1A



1Б

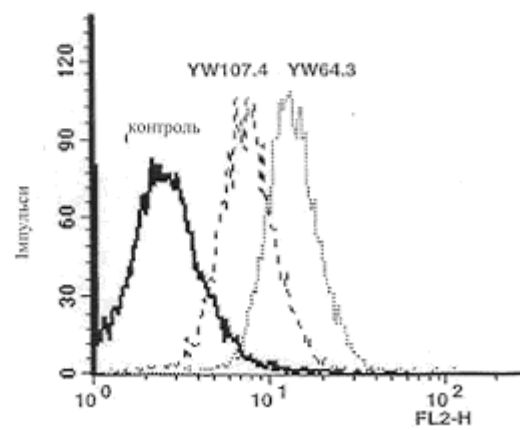
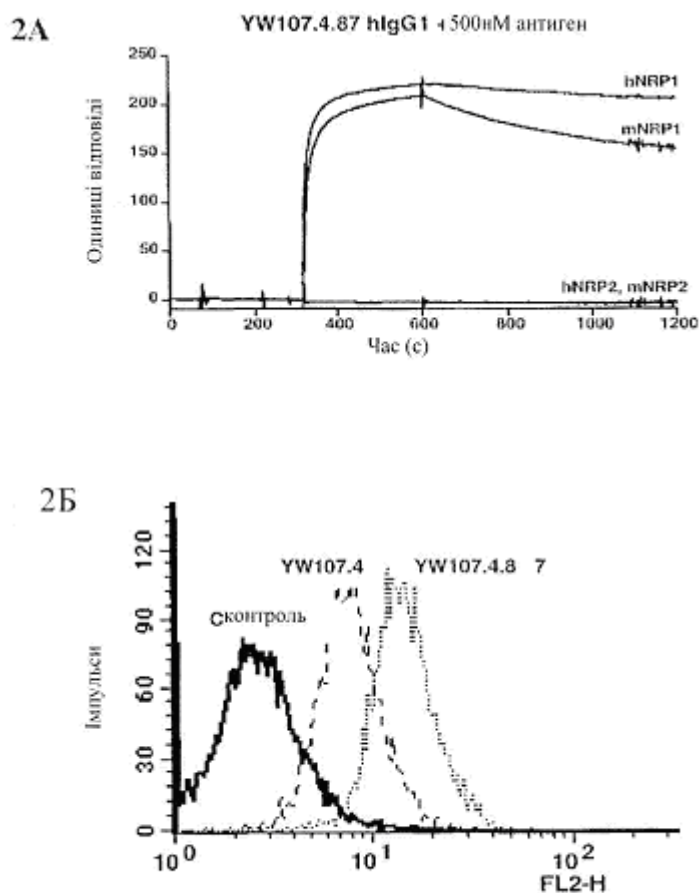


Fig. 1



Фіг. 2

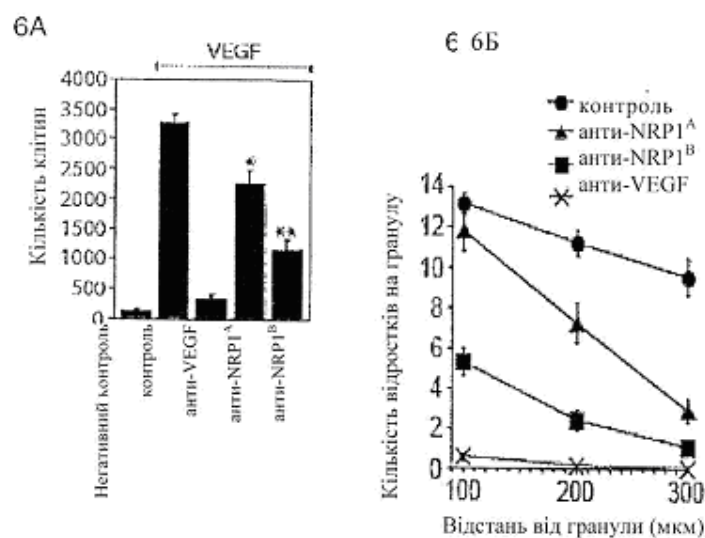
Легкий ланцюг

Kabat No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37		
h4D5	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q		
αNRP1(YW64.3)	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	S	I	S	S	Y	L	A	W	Y	Q		
αNRP1(YW107.4.87)	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	Y	F	S	S	Y	L	A	W	Y	Q		

Kabat No.	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
h4D6	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P
αNRP1(YW64.3)	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	G	A	S	S	R	A	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	
αNRP1(YW107.4.87)	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	G	A	S	S	R	A	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P

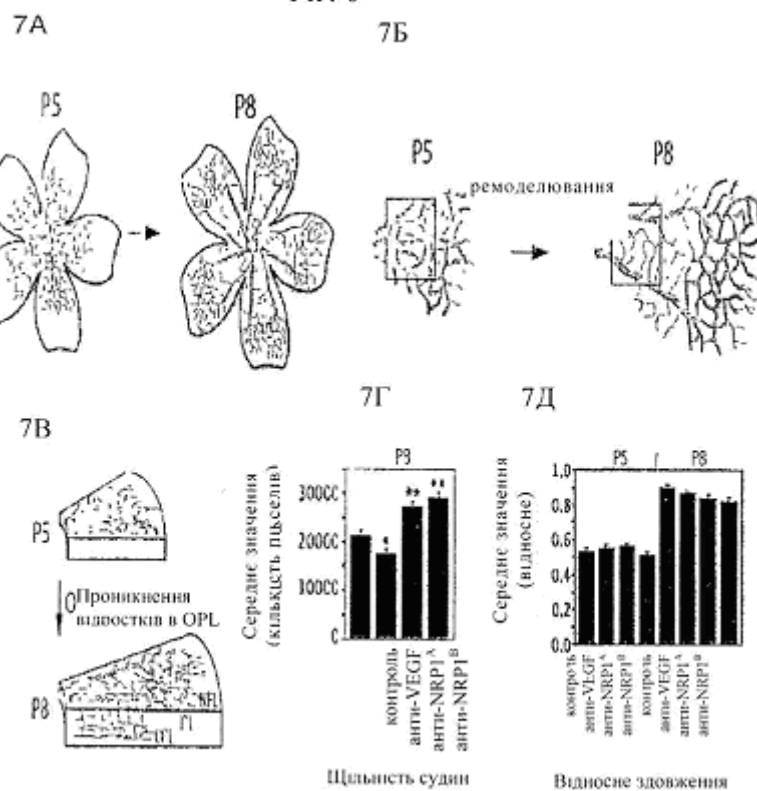
Kabat No.	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120		
h4D6	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	(SEQ ID NO:1)													
αNRP1(YW64.3)	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	M	S	V	P	I	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	(SEQ ID NO:3)													
αNRP1(YW107.4.87)	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	L	G	S	P	P	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	(SEQ ID NO:5)													

Фіг. 3А

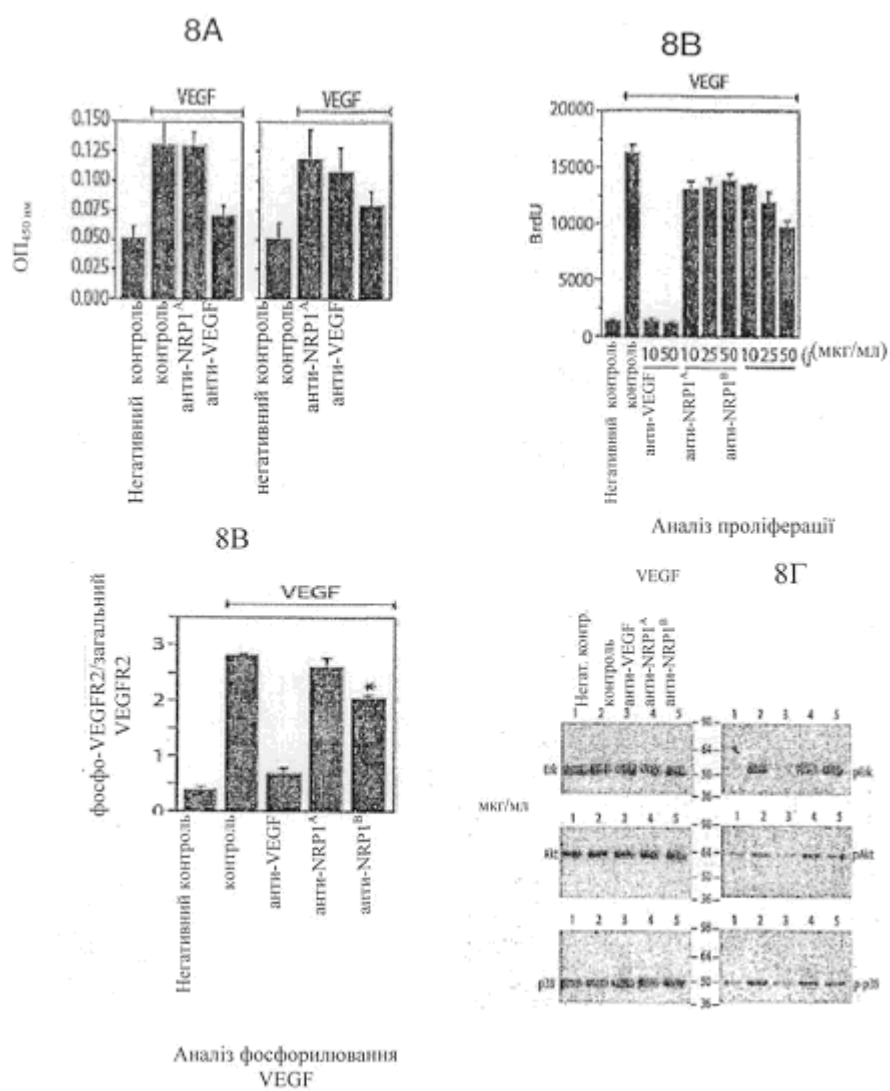


Аналіз міграції

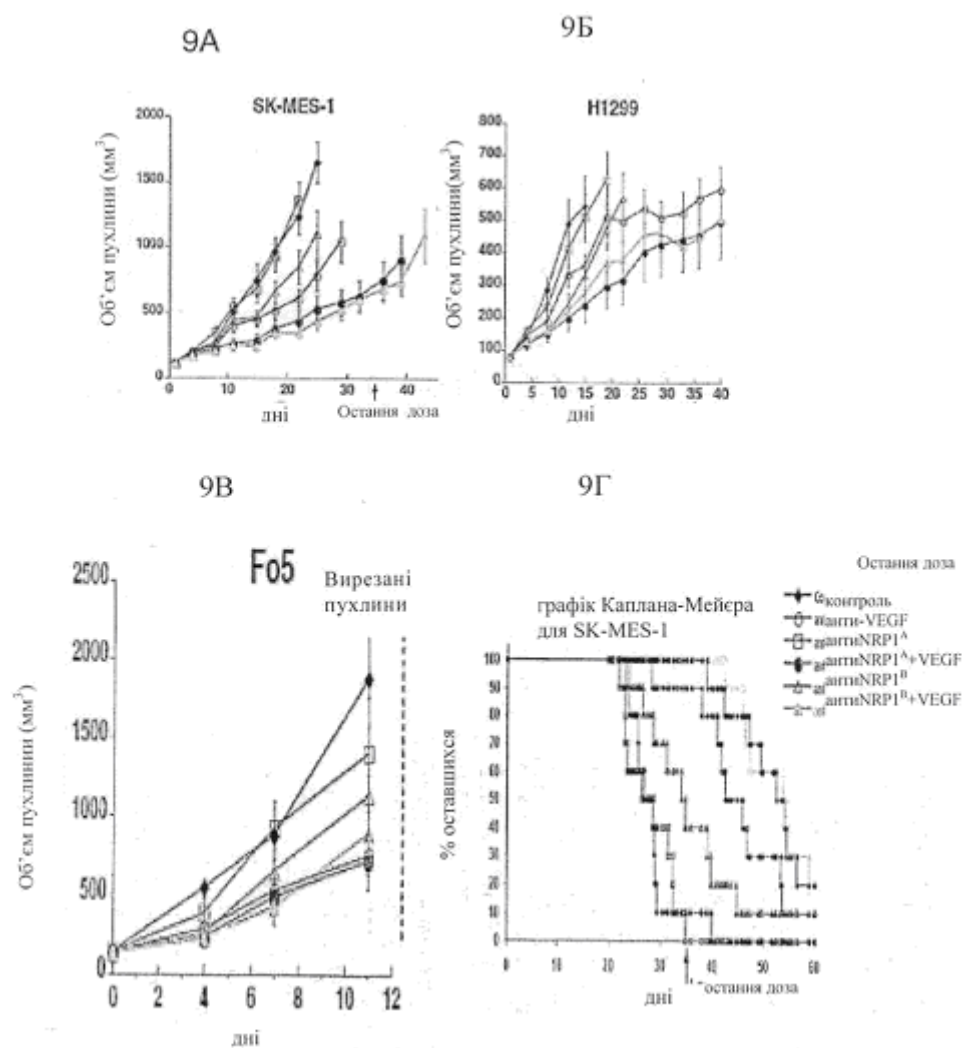
Фіг. 6



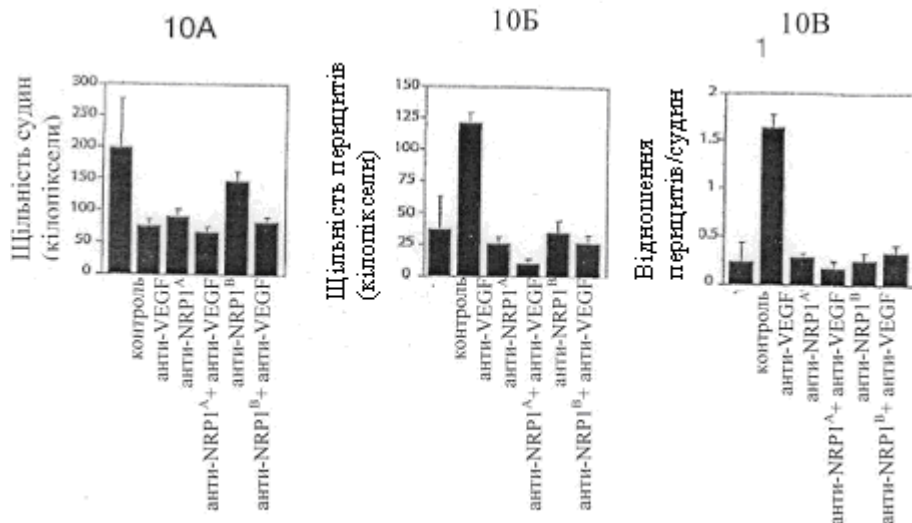
Фіг. 7



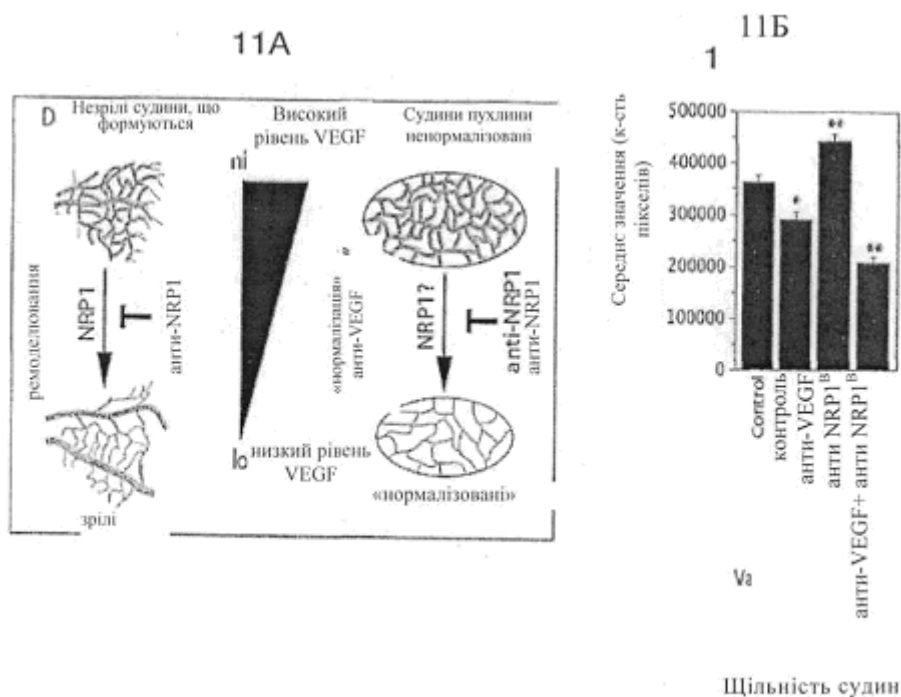
Фиг. 8



Фіг. 9



Фіг. 10



Фіг. 11