



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **101945** (13) **C2**
(51) МПК (2013.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: а 2009 02354	(72) Винахідник(и): Файф Гвендолін (US/US), Хоулмгрен Ерік (US/US), Масс Роберт Д. (US/US), Новотні Вілл'ям (US/US)
(22) Дата подання заявки: 28.05.2004	(73) Власник(и): ДЖЕНЕНТЕК, ІНК., 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080-4990 USA (US)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 27.05.2013	(74) Представник: Петров Андрій Володимирович, реєстр. №139
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 60/474.480	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: KABBINAVAR FAIROOZ ET AL: "Phase II, randomized trial comparing bevacizumab plus fluorouracil (FU)/leucovorin (LV) with FU/LV alone in patients with metastatic colorectal cancer." JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY : OFFICIAL JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL ONCOLOGY. 1 JAN 2003, vol. 21, no. 1, 1 January 2003 (2003-01-01), pages 60-65 Miller K.D. E2100: A Phase III Trial of Paclitaxel Versus Paclitaxel/Bevacizumab for Metastatic Breast Cancer. Clinical Breast Cancer, February 2003: 421-422 p. M.S. Gordon et al. Phase I Safety and Pharmacokinetic Study of Recombinant Human Anti-Vascular Endothelial Growth Factor in Patients With Advanced Cancer. Journal of Clinical Oncology, Vol 19, No 3 (February 1) 2001: pp 843-850
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 30.05.2003	
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: US	
(41) Публікація відомостей про заявку: 10.07.2009, Бюл.№ 13	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 27.05.2013, Бюл.№ 10	
(62) Номер та дата подання попередньої заявки, з якої виділено заявку, позначену кодом (21): а 200512429, 28.05.2004	

(54) ЛІКУВАННЯ ЗЛОЯКІСНОГО НОВОУТВОРЕННЯ ЗА ДОПОМОГОЮ БЕВАЦИЗУМАБУ

(57) Реферат:

Винахід стосується лікування злоякісного новоутворення у людини, в т.ч. людини, сприйнятливої до або з діагностованим колоректальним раком, що передбачає введення бевацизумабу та моніторинг гастроінтестинальної перфорації у пацієнта.

UA 101945 C2

За даною заявкою заявляється пріоритет за попередньою заявкою на патент США № 60/474,480, поданою 30 травня 2003 року, яка включена в даний винахід як посилання.

Даний винахід загалом стосується лікування захворювань людини й патологічних станів. Більш докладно, винахід стосується антиангіогенного лікування злоякісного новоутворення,

5 окремо або в сполученні з іншими видами протиракової терапії.

Злоякісні новоутворення залишаються однією з головних смертельних небезпек для здоров'я людей. У США злоякісні новоутворення діагностують приблизно в 1 млн. 300 тис. нових пацієнтів щорічно й вони є другою основною причиною смертності після серцевих захворювань, викликаючи в середньому 1 з 4-х летальних випадків. До того ж припускають, що

10 протягом 5 років замість серцево-судинних захворювань рак буде першою причиною смертності. У більшості випадків причиною летального кінця є солідні пухлини. Незважаючи на те, що в лікуванні певних видів злоякісних новоутворень спостерігається значний прогрес, сумарна 5-літня виживаність для всіх злоякісних новоутворень за останні 20 років покращилася тільки приблизно на 10 %. Рак або злоякісні пухлини, метастазують і швидко неконтрольовано

15 ростуть, що надзвичайно ускладнює їх своєчасну діагностику й лікування. Більше того, злоякісні новоутворення можуть виникати практично з будь-якої тканини організму шляхом злоякісної трансформації однієї або декількох нормальних клітин у тканини й кожен тип злоякісного новоутворення в конкретній тканині організму відрізняється один від одного.

Існуючі зараз способи лікування злоякісних пухлин є відносно неселективними. При

20 хірургічному втручанні видаляють пухлинну тканину, променева терапія викликає зменшення солідних пухлин; і при хіміотерапії вбивають клітини, які швидко діляться. Хіміотерапія, особливо, приводить до різних побічних дій, які в деяких випадках є настільки важкими, що обмежують дозу, яка може бути призначена, і в такий спосіб перешкоджають застосуванню потенційно ефективних лікарських засобів. Крім того, часто розвивається стійкість злоякісних

25 новоутворень до хіміотерапевтичних лікарських засобів.

Таким чином, існує нагальна потреба в специфічному й більш ефективному лікуванні злоякісних новоутворень.

Ангіогенез являє собою важливе клітинне явище, при якому клітини ендотелію судин проліферують, розмножуються й перетворюють, утворюючи нові судини із раніше існуючої

30 судинної сітки. У цей час переконливо доведено, що розвиток кровопостачання надзвичайно важливий для нормальних і патологічних проліферативних процесів (Folkman й Klagsbrun (1987) Science 235:442-447). Для більшості ростових процесів у багатоклітинних організмах факторами, які обмежують швидкість росту, є доставка кисню й поживних речовин, а також видалення продуктів катаболізму. Таким чином, вважають, що у більшості випадків судинна

35 сітка необхідна не тільки для розвитку органів і диференціації при ембріогенезі, але також для загоєння ран і репродуктивних функцій у дорослих.

Ангіогенез також залучений у патогенез при різних розладах, включаючи, але не обмежуючись тільки ними, пухлини, проліферативні ретинопатії, дегенерацію жовтої плями, зв'язану зі старінням, ревматоїдний артрит (РА) і псоріаз. Ангіогенез необхідний для росту

40 більшості первинних пухлин й їх наступного метастазування. Пухлини можуть поглинати достатню кількість поживних речовин і кисню за допомогою простої дифузії аж до розміру 1-2 мм, після цього для їх подальшого росту необхідне формування кровопостачання. Вважають, що цей процес здійснюється шляхом залучення прилеглої судинної сітки-хазяїна, що сформувалася, для початку проростання капілярів нових кровоносних судин, які спільно ростуть і потім інфільтрують пухлинну масу. Додатково, ангіогенез пухлини здійснюється шляхом

45 залучення циркулюючих клітин-попередників ендотелію з кісткового мозку для сприяння утворення нових судин у тканині. Kerbel (2000) Carcinogenesis 21:505-515; Lynden та ін. (2001) Nat. Med. 7:1194-1201.

Поряд з тим, що індукція нових кровоносних судин, як вважають, є переважним способом

50 ангіогенезу пухлини, дані, отримані недавно, вказують на те, що деякі пухлини можуть рости шляхом спільного використання існуючих кровоносних судин організму-хазяїна. Після цього спільно використовувана судинна сітка регресує, викликаючи зворотний розвиток пухлини, що в остаточному підсумку, одержує зворотний розвиток за допомогою ангіогенезу, індукованого гіпоксією, у прилеглої пухлині. Holash та ін. (1999) Science 284:1994-1998.

Через істотний фізіологічний і патологічний вплив ангіогенезу, багато робіт були присвячені вивченню факторів, здатних регулювати цей процес. Передбачається, що процес ангіогенезу регулюється шляхом рівноваги між про- і антиангіогенними молекулами, яка порушується при різних захворюваннях, особливо при злоякісних новоутвореннях. Carmeliet й Jain (2000) Nature

55 407:249-257.

Встановлено, що фактор росту клітин ендотелію судин (VEGF), який також позначають як VEGF-A або фактор проникності судин (VPF), є головним регулятором як нормального, так й атипичного ангиогенезу. Ferrara й Davis-Smyth (1997) *Endocrine Rev.* 18:4-25; Ferrara (1999) *J. Mol. Med.* 77:527-543. У порівнянні з іншими факторами росту, які сприяють процесам утворення

5 кровеносних судин, VEGF є унікальним внаслідок його високої специфічності до клітин ендотелію в судинній системі. VEGF є надзвичайно важливим для ембріонального утворення й розвитку судин, а також ангиогенезу. Carmeliet та ін. (1996) *Nature* 380:435-439; Ferrara та ін. (1996) *Nature* 380:439-442. Крім того, VEGF необхідний для циклічної проліферації кровеносних судин у жіночих статевих шляхах, а також для росту кісток й утворення хрящів. Ferrara та ін.

10 (1998) *Nature Med.* 4:336-340; Gerber та ін. (1999) *Nature Med.* 5:623-628.

Крім того, що він є ангиогенним фактором при ангиогенезі й утворенні й розвитку кровеносних судин, VEGF, як плейотропний фактор росту, проявляє багато біологічних дій в інших фізіологічних процесах, таких як виживання клітин ендотелію, проникність судин і розширення судин, хемотаксис моноцитів і кальцієві потоки. Ferrara й Davis-Smyth (1997), вище. Більше того,

15 у недавніх дослідженнях була показана мітогенна дія VEGF на деякі клітини неендотеліального типу, такі як епітеліальні клітини пігменту сітківки, клітини протоки підшлункової залози й шванівські клітини. Guerrin та ін. (1995) *J. Cell Physiol.* 164:385-394; Oberg-Welsh та ін. (1997) *Mol. Cell. Endocrinol.* 126:125-132; Sondell та ін. (1999) *J. Neurosci.* 19:5731-5740.

Істотні докази також вказують на вирішальну роль VEGF у розвитку станів або захворювань, зв'язаних з патологічним ангиогенезом. мРНК VEGF переэкспресується в більшості досліджених пухлин людини (Berkman та ін. *J Clin Invest* 91:153-159 (1993); Brown та ін. *Human Pathol.* 26:86-91 (1995); Brown та ін. *Cancer Res.* 53:4727-4735 (1993); Mattern та ін. *Brit. J. Cancer.* 73:931-934 (1996); і Dvorak та ін. *Am J. Pathol.* 146:1029-1039 (1995)). Крім того,

20 концентрація VEGF в очній рідині тісно пов'язана з наявністю активної проліферації кровеносних судин у хворих з діабетичною ретинопатією й іншими ретинопатіями, зв'язаними з ішемією (Aiello та ін. *N. Engl. J. Med.* 331:1480-1487 (1994)). У недавніх дослідженнях також була показана локалізація VEGF у хоріоїдальних мембранах нових судин у хворих, уражених AMD (Lopez та ін. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 37:855-868 (1996)).

Внаслідок його центральної ролі у стимуляції пухлинного росту, VEGF являє собою перспективну мішень для лікувального впливу. Дійсно, зараз розвивається багато терапевтичних підходів, спрямованих на блокування VEGF або його рецепторної сигнальної системи, для лікування новоутворень. Rosen (2000) *Oncologist* 5:20-27; Ellis та ін. (2000) *Oncologist* 5:11-15; Kerbel (2001) *J. Clin. Oncol.* 19:45S-51S. Дотепер, блокування VEGF/VEGF

25 рецептора за допомогою моноклональних антитіл й інгібування передачі сигналу за допомогою інгібіторів тирозинкінази є найбільш перспективними досліджуваними підходами. Також досліджуються VEGFR-1 рибозими, кон'югати VEGF-токсин і розчинні рецептори VEGF.

Анти-VEGF антитіло "Бевацизумаб (Bevacizumab, БВ)", також відоме як "rhMAb VEGF" або "Avastin™", являє собою рекомбінантне гуманізоване анти-VEGF моноклональне антитіло, отримане відповідно до Presta та ін. (1997) *Cancer Res.* 57:4593-4599. Воно містить мутовані

30 каркасні ділянки IgG1 людини й антиген-зв'язувальні ділянки, які визначають комплементарність, з мишиного анти-hVEGF моноклонального антитіла A.4.6.1, яке блокує зв'язування VEGF людини з його рецепторами. Близько 93 % амінокислотної послідовності бевацизумабу, включаючи більшість каркасних ділянок, має походження з IgG1 людини і близько 7 % послідовності має походження з мишиного антитіла A4.6.1. Бевацизумаб має

35 молекулярну масу близько 149 кДа і є глікозильованим. Бевацизумаб досліджують у клінічних умовах для лікування різних типів злоякісних новоутворень і деякі результати, отримані на ранніх стадіях досліджень, є багатообіцяючими. Kerbel (2001) *J. Clin. Oncol.* 19:45S-51S; De Vore та ін. (2000) *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* 19:485a; Johnson та ін. (2001) *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* 20:315a; Kabbinnavar та ін. (2003) *J. Clin. Oncol.* 21:60-65.

Даний винахід стосується способів застосування анти-VEGF антитіла для лікування захворювань і патологічних станів. Зокрема, винахід забезпечує ефективний підхід для лікування злоякісних новоутворень, частково ґрунтуючись на несподіваних результатах, які

40 вказують на те, що додавання анти-VEGF антитіла до звичайної хіміотерапії приводить до статистично достовірного й клінічно значимого поліпшення у пацієнтів зі злоякісними новоутвореннями.

Отже, в одному варіанті здійснення, винахід забезпечує спосіб лікування злоякісного новоутворення в людини, який передбачає введення пацієнтові ефективних кількостей анти-VEGF антитіла й протипухлинної композиції, де вказана протипухлинна композиція містить

45 принаймні один хіміотерапевтичний засіб.

Злоякісне новоутворення, яке піддається лікуванню згідно із даним винаходом, включає, але не обмежуючись тільки ними, карциному, лімфому, бластоми, саркому й лейкоз або лімфоїдні злоякісні новоутворення. Більш переважні приклади таких злоякісних новоутворень включають плоскоклітинний рак, рак легені (включаючи дрібноклітинний рак легені, не дрібноклітинний рак легені, аденокарциному легені й плоскоклітинний рак легені), рак очеревини, печінково-клітинний рак, рак шлунка (включаючи шлунково-кишковий рак), рак підшлункової залози, гліобластоми, рак шийки матки, рак яєчників, рак печінки, рак сечового міхура, гепатому, рак молочної залози, рак ободової кишки, колоректальний рак, рак ендометрію або матки, рак слинної залози, рак нирки, рак печінки, рак передміхурової залози, рак піхви, рак щитовидної залози, рак гепатоцитів і різні типи раку голови й шиї, а також В-клітинну лімфому (включаючи низькодиференційовану/фолікулярну неходжкінську лімфому (НХЛ); дрібнолімфоцитну (ДЛ) НХЛ; середньодиференційовану/фолікулярну НХЛ; середньодиференційовану дифузійну НХЛ; високодиференційовану імунобластну НХЛ; високодиференційовану лімфобластну НХЛ; високодиференційовану небластомерноклітинну НХЛ; недиференційовану НХЛ; лімфому клітин кори головного мозку; лімфому, зв'язану зі СНІДом; і макроглобулінемію Уолденстрома); хронічний лімфолейкоз (ХЛЛ); гострий лімфобластний лейкоз (ОЛЛ); лейкоз ворсинчастих клітин; хронічний мієлобластний лейкоз; і посттрансплантаційний лімфопроліферативний розлад (ПТЛР), а також атипову судинну проліферацію, зв'язану з факоматозом, набряк (такий як набряк, зв'язаний з пухлинами головного мозку), і синдром Мейгса. Переважно, злоякісне новоутворення вибирають із групи, яка включає рак молочної залози, колоректальний рак, рак прямої кишки, недрібноклітинний рак легені, неходжкінську лімфому (НХЛ), рак нирки, рак передміхурової залози, рак печінки, рак підшлункової залози, саркому м'яких тканин, саркому Капоши, карциноїдну пухлину, рак голови й шиї, меланому, рак яєчників, мезотеліому й множинну мієлому. Більш переважно, злоякісне новоутворення являє собою колоректальний рак. Злоякісні стани, які піддаються лікуванню, відповідно до винаходу, включають метастатичні злоякісні пухлини. Спосіб згідно із даним винаходом переважно придатний для лікування васкуляризованих пухлин.

Згідно із даним винаходом, може застосовуватися будь-який хіміотерапевтичний засіб, який проявляє протипухлинну активність. Переважно, хіміотерапевтичний засіб вибирають із групи, яка включає алкілувальні агенти, антиметаболіти, аналоги фолієвої кислоти, аналоги піримідину, аналоги пурину й споріднені інгібітори, алкалоїди барвінку, епіподофілотоксини, антибіотики, L-аспарагіназа, інгібітор топоізомерази, інтерферони, координаційні комплекси платини, антрацендіон-заміщена сечовина, похідні метилгідразину, препарати для пригнічення кори наднирників, адренокортикостероїди, прогестини, естрогени, антиестроген, андрогени, антиандроген й аналог гонадротропін-релізінг гормону. Більш переважно, хіміотерапевтичний засіб вибирають із групи, яка включає 5-фторурацил (5-ФУ), лейковорин (ЛВ), іренотекан, оксалиплатин, капецитабін, паклітаксел і доксетаксел. Два або більше хіміотерапевтичних засобів можуть застосовуватися в суміші для введення в сполученні із введенням анти-VEGF антитіла. Однією переважною комбінацією для хіміотерапії є комбінація на основі фторурацилу, яка містить 5-ФУ й один або декілька хіміотерапевтичних засобів. Підходящі схеми прийому лікарських засобів для комбінованої хіміотерапії відомі в даній галузі й описані, наприклад, Saltz та ін. (1999) Proc ASCO 18:233a й Douillard та ін. (2000) Lancet 355:1041-7.

В одному варіанті здійснення, даний винахід забезпечує спосіб підвищення тривалості життя людини зі злоякісним новоутворенням, який передбачає введення пацієнтові ефективних кількостей композиції анти-VEGF антитіла й протипухлинної композиції, де вказана протипухлинна композиція містить принаймні один хіміотерапевтичний засіб, причому спільне введення анти-VEGF антитіла й протипухлинної композиції забезпечує ефективне підвищення тривалості життя.

В іншому варіанті здійснення, даний винахід забезпечує спосіб підвищення тривалості життя без захворювання людини зі злоякісним новоутворенням, який передбачає введення пацієнтові ефективних кількостей композиції анти-VEGF антитіла й протипухлинної композиції, де вказана протипухлинна композиція містить принаймні один хіміотерапевтичний засіб, причому спільне введення анти-VEGF антитіла й протипухлинної композиції забезпечує ефективне підвищення тривалості життя без захворювання.

Крім того, даний винахід забезпечує спосіб лікування групи людей зі злоякісним новоутворенням, який передбачає введення пацієнтові ефективних кількостей композиції анти-VEGF антитіла й протипухлинної композиції, де вказана протипухлинна композиція містить принаймні один хіміотерапевтичний засіб, причому спільне введення анти-VEGF антитіла й протипухлинної композиції забезпечує ефективне підвищення ступеня реакції-відповіді в групі пацієнтів.

В іншому варіанті здійснення, даний винахід забезпечує спосіб підвищення тривалості реакції-відповіді в людини, яка має злоякісне новоутворення, який передбачає введення пацієнтові ефективних кількостей композиції анти-VEGF антитіла й протипухлинної композиції, де вказана протипухлинна композиція містить принаймні один хіміотерапевтичний засіб, причому спільне введення анти-VEGF антитіла й протипухлинної композиції забезпечує ефективне підвищення тривалості реакції-відповіді.

Винахід також забезпечує спосіб лікування людини, сприйнятливої до або з діагностованим колоректальним раком, який передбачає введення пацієнтові ефективних кількостей анти-VEGF антитіла. Колоректальний рак може бути метастатичним. Лікування анти-VEGF антитілом додатково можна комбінувати зі звичайною хіміотерапією для колоректального раку, такою як схема прийому згідно із Saltz (5-ФУ/ЛВ/іринотекан), описана Saltz та ін. (1999).

В одному переважному варіанті здійснення, винахід забезпечує спосіб лікування людини або групи пацієнтів з метастатичним колоректальним раком, який передбачає введення пацієнтові ефективних кількостей композиції анти-VEGF антитіла й протипухлинної композиції, де вказана протипухлинна композиція містить принаймні один хіміотерапевтичний засіб, причому спільне введення анти-VEGF антитіла й протипухлинної композиції приводить до статистично достовірного й клінічно значимого поліпшення у пацієнтів, підданих лікуванню, що визначається шляхом вимірювання тривалості життя, виживання без захворювання, ступеня реакції-відповіді або тривалості реакції-відповіді. Переважно, протипухлинна композиція являє собою комбінацію на основі схеми прийому фторурацилу. Більш переважно комбінація для введення містить 5-ФУ+лейковорин, 5-ФУ+лейковорин+іринотекан (ІФЛ), або 5-ФУ+лейковорин+оксаліплатин (ФОЛФОКС).

Винахід забезпечує виріб, який містить контейнер, у якому знаходиться композиція, яка містить анти-VEGF антитіло, і упаковку з інструкцією із застосування композиції для введення пацієнтові зі злоякісним новоутворенням композиції анти-VEGF антитіла й протипухлинної композиції, яка містить принаймні один хіміотерапевтичний засіб.

Винахід також забезпечує набір для лікування злоякісного новоутворення в пацієнта, який включає упаковку, яка містить композицію анти-VEGF антитіла й інструкції для застосування композиції анти-VEGF антитіла й протипухлинної композиції, яка містить принаймні один хіміотерапевтичний засіб, для лікування злоякісного новоутворення в пацієнта.

Короткий опис креслень.

На фігурі 1 наведений аналіз виживання згідно із Каплан-Мейером. Середня тривалість життя (вказана пунктирними лініями) становить 20,3 місяця в групі, яка одержувала іринотекан, фторурацил і лейковорин (ІФЛ) плюс бевацизумаб, у порівнянні з 15,6 місяця в групі, яка одержувала ІФЛ плюс плацебо, що відповідає коефіцієнту ризику смерті 0,66 ($P < 0,001$).

На фігурі 2 наведений аналіз тривалість життя без захворювання згідно із Каплан-Мейером. Середня тривалість життя без захворювання (вказана подвійними лініями) становить 10,6 місяця в групі, яка одержувала іринотекан, фторурацил і лейковорин (ІФЛ) плюс бевацизумаб, у порівнянні з 6,2 місяця в групі, яка одержувала ІФЛ плюс плацебо, що відповідає коефіцієнту ризику прогресії 0,54 ($P < 0,001$).

На фігурі 3А-3В наведений аналіз тривалості життя для різних підгруп пацієнтів, розділених згідно з початковими даними.

На фігурі 4 наведений аналіз тривалість життя згідно із Каплан-Мейером для групи, яка одержувала 5-ФУ/ЛВ плюс плацебо, у порівнянні із групою, яка одержувала 5-ФУ/ЛВ плюс бевацизумаб (БВ).

На фігурі 5 наведений аналіз тривалість життя без захворювання згідно із Каплан-Мейером для групи, яка одержувала 5-ФУ/ЛВ плюс плацебо, у порівнянні із групою, яка одержувала 5-ФУ/ЛВ плюс бевацизумаб (БВ).

Докладний опис переважних варіантів здійснення винаходу.

I. Визначення.

Терміни "VEGF" й "VEGF-A" використовуються взаємозамінно й стосуються фактора росту клітин ендотелію судин, який складається з 165 амінокислот, а також факторів росту клітин ендотелію судин, які складаються із 121, 189 й 206 амінокислот, як описано Leung та ін. Science, 246:1306 (1989), і Houck та ін. Mol. Endocrin., 5:1806 (1991), і їх алельних форм, які зустрічаються в природі, й отриманих з них. Термін "VEGF" також застосовується щодо усічених форм поліпептидів, які містять 8-109 або 1-109 амінокислоти з 165-ти амінокислотної послідовності фактора росту клітин ендотелію судин людини. Будь-які такі форми VEGF можуть ідентифікуватися в даній заявці шляхом вказівки, наприклад "VEGF (8-109)", "VEGF (1-109)" або "VEGF₁₆₅". Положення амінокислот "зрізаного" нативного VEGF пронумеровані, як вказано в нативній послідовності VEGF. Наприклад, амінокислота в 17-му положенні (метіонін) в зрізаній

послідовності VEGF відповідає амінокислоті також в 17-му положенні (метіонін) у нативному VEGF. Усічені нативні VEGF мають зв'язувальну афінність до рецепторів KDR й Fit-1, порівнянню з нативним VEGF.

"Анти-VEGF антитіло" являє собою антитіло, яке зв'язується з VEGF з достатньою афінністю й специфічністю. Переважно, анти-VEGF антитіло за винаходом може застосовуватися як терапевтичний засіб для націлювання й боротьби із захворюваннями або станами, у яких задіяна активність VEGF. Анти-VEGF антитіло, як правило, не зв'язується з іншими гомологами VEGF, такими як VEGF-B або VEGF-C, і з іншими факторами росту, такими як P1GF, PDGF або bFGF. Переважне анти-VEGF антитіло являє собою моноклональне антитіло, яке зв'язується з тим же епітопом, що й моноклональне анти-VEGF антитіло A4.6.1, яке продукується гібридомом ATCC HB 10709. Більш переважно анти-VEGF антитіло являє собою рекомбінантне гуманізоване анти-VEGF моноклональне антитіло, отримане згідно із Presta та ін. (1997) Cancer Res. 57:4593-4599, включаючи, але не обмежуючись тільки ним, антитіло, відоме як бевацизумаб (BB; Avastin™).

"VEGF антагоніст" стосується молекули, здатної нейтралізувати, блокувати, інгібувати, скасовувати, зменшувати або перешкоджати VEGF активностям, включаючи їх зв'язування з одним або декількома VEGF рецепторами. VEGF антагоністи включають анти-VEGF антитіла і їх антигензв'язувальні фрагменти, рецепторні молекули й похідні, які специфічно зв'язуються з VEGF, ізолюючи в такий спосіб його зв'язування з одним або декількома рецепторами, антитілами анти-VEGF рецептора й антагоністами VEGF рецептора, такими як невеликі молекули інгібіторів VEGFR тирозинкінази.

Для всього опису й формули даного винаходу, нумерація залишків у важкому ланцюзі імуноглобуліну відповідає EU індексу, як наведено в Kabat та ін., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-е видання Міністерства охорони здоров'я, Національні інститути охорони здоров'я, Бетесда, шт Мериленд (1991), що спеціально включено в даний винахід як посилання. "EU індекс як в Kabat" стосується залишку з нумерацією IgG1 EU антитіла людини.

"Нативна послідовність" поліпептиду містить поліпептид, який має таку ж амінокислотну послідовність, що й поліпептид, отриманий із природного джерела. Таким чином, нативна послідовність поліпептиду може мати амінокислотну послідовність поліпептиду, який зустрічається в природі, з будь-якого ссавця. Така нативна послідовність поліпептиду може бути виділена із природного джерела або може бути отримана рекомбінантними або синтетичними способами. Термін "нативна послідовність" поліпептиду специфічно охоплює зрізані форми, які зустрічаються в природі, або секретовані форми поліпептиду {наприклад, послідовність позаклітинного домену}, варіантні форми, які зустрічаються в природі {наприклад, альтернативно зшиті форми} і алельні варіанти поліпептиду, які зустрічаються в природі.

"Варіант" поліпептиду означає біологічно активний поліпептид, який має принаймні близько 80 % амінокислотної послідовності, яка ідентична до нативної послідовності поліпептиду. Такі варіанти включають, наприклад, поліпептиди, у яких один або декілька амінокислотних залишків на N- або C-кінці поліпептиду додані або вилучені. Звичайно, варіант має принаймні близько 80 % амінокислотної послідовності, більш переважно принаймні близько 90 % амінокислотної послідовності, і найбільш переважно принаймні близько 95 % амінокислотної послідовності, яка ідентична до нативної послідовності поліпептиду.

Термін "антитіло" використовується в найбільш широкому розумінні й охоплює моноклональні антитіла (включаючи повнорозмірні або інтактні моноклональні антитіла), поліклональні антитіла, полівалентні антитіла, поліспецифічні антитіла {наприклад, біспецифічні антитіла}, і фрагменти антитіл (див. далі), у тому випадку, якщо мають необхідну біологічну активність.

Якщо спеціально не вказано інакше, вираз "полівалентне антитіло" застосовується в даному винаході для позначення антитіла, яке містить три й більше антигензв'язувальні ділянки. Полівалентне антитіло переважно конструюють так, щоб воно містило три або більше антигензв'язувальні ділянки й, як правило, не являло собою нативні послідовності IgM або IgA антитіла.

"Фрагменти антитіла" містять тільки частину інтактного антитіла, яка у більшості випадків включає антигензв'язувальну ділянку інтактного антитіла й у такий спосіб зберігає здатність зв'язувати антиген. Прикладами фрагментів антитіл, які охоплюються даним визначенням, є: (i) Fab фрагмент, який містить VL, CL, VH й CH1 домени; (ii) Fab' фрагмент, який являє собою Fab фрагмент, який містить один або декілька залишків цистеїну на C-кінці CH1 домену; (iii) Fd фрагмент, який містить VH й CH1 домени; (iv) Fd' фрагмент, який містить VH й CH1 домени й один або декілька залишків цистеїну на C-кінці CH1 домену; (v) Fv фрагмент, який містить VL й VH домени одного плеча антитіла; (vi) dAb фрагмент (Ward та ін., Nature 341, 544-546 (1989)),

який складається з VH домену; (vii) виділені CDR ділянки; (viii) F(ab')₂ фрагменти, бівалентний фрагмент, який включає два Fab'-фрагменти, з'єднаних дисульфідним містком у шарнірній ділянці; (ix) одноланцюгові молекули антитіла (наприклад, одноланцюгові Fv; scFv) (Bird та ін., Science 242:423-426 (1988); i Huston та ін., PNAS (USA) 85:5879-5883 (1988)); (x) "діатіла" із двома антиген-зв'язувальними ділянками, які містять варіабельний домен важкого ланцюга (VH), з'єднаний з варіабельним доменом легкого ланцюга (VL) в одному й тому ж поліпептидному ланцюзі (див., наприклад, EP 404,097; WO 93/11161; i Hollinger та ін., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)); (xi) "лінійні антитіла", які містять пару послідовно розташованих Fd сегментів (VH-CH1-VH-CH1), які, разом з комплементарними поліпептидами легкого ланцюга, утворюють пару антигензв'язувальних ділянок (Zapata та ін. Protein Eng. 8(10):1057-1062 (1995); i патент US 5,641,870).

Поняття "моноклональне антитіло" у контексті даного опису означає антитіло, отримане з популяції практично гомогенних антитіл, тобто з популяції, яка складається з індивідуальних антитіл, які ідентичні за винятком можливих мутацій, що зустрічаються в природних умовах, які можуть бути присутні у невеликих кількостях. Моноклональні антитіла є високо специфічними і являють собою антитіла до індивідуального антигену. Крім того, на противагу препаратам поликлональних антитіл, які, як правило, включають різні антитіла до різних детермінантів (епітопів), кожне моноклональне антитіло спрямоване до однієї детермінанти антигену. Прикметник "моноклональне" не припускає, що воно повинне бути створене за допомогою якого-небудь конкретного методу, необхідного для створення антитіл. Наприклад, моноклональні антитіла, які можна застосовувати згідно із даним винаходом, можна одержувати за допомогою методу на основі гібридом, вперше описаного Kohler та ін., Nature 256:495 (1975), або їх можна конструювати методами рекомбінатної ДНК (див., наприклад, патент US 4,816,567). "Моноклональні антитіла" також можуть бути виділені з фагових бібліотек антитіл за допомогою методик, описаних, наприклад, в Clackson та ін., Nature 352:624-628 (1991) або Marks та ін., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991).

Моноклональні антитіла в даному винаході специфічно охоплюють "химерні" антитіла, у яких частина важкого та/або легкого ланцюга ідентична або гомологічна до відповідних послідовностей антитіл, отриманих з конкретних видів, або які належить до конкретного класу або підкласу антитіл, у той час як інша ділянка ланцюга(ів) ідентична або гомологічна до відповідних послідовностей антитіл, отриманих з інших видів, або які належать до іншого класу або підкласу антитіл, а також фрагментів таких антитіл, якщо вони мають необхідну біологічну активність (патент US 4,816,567; i Morrison та ін., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984)).

"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 являє собою людські імуноглобуліни (антитіло-реципієнт), у яких залишки з гіперваріабельної ділянки реципієнта замінені залишками з гіперваріабельної ділянки інших видів крім людини (антитіло-донор), таких як миші, щури, кролики або примати, крім людини, які мають необхідну специфічність, афінність й функціональну активність. У деяких випадках залишки каркасної ділянки (FR) людського імуноглобуліну заміняють відповідними залишками імуноглобуліну інших видів, крім людини. Крім того, гуманізовані антитіла можуть містити залишки, які не присутні в антитілі-реципієнті або в антитілі і-донорі. Ці модифікації здійснюють із метою додаткового вдосконалення характеристик антитіла. Загалом, гуманізоване антитіло повинне містити практично повний принаймні один, а як правило, два варіабельні домени, у яких всі або практично всі гіперваріабельні петлі відповідають петлям вказаних імуноглобулінів інших тварин крім людини, а всі або практично всі FR відповідають послідовності людського імуноглобуліну. Гуманізоване антитіло необов'язково може містити також принаймні частину константної ділянки імуноглобуліну (Fc), як правило, людського імуноглобуліну. Додаткові більш докладні дані див. в Jones та ін., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann та ін., Nature 332:323-329 (1988); i Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992).

"Людське антитіло" являє собою антитіло, яке має амінокислотну послідовність, що відповідає послідовності антитіла, отриманого з людини, і/або отриманого за допомогою будь-якої технології для одержання людських антитіл, розкритих у даному винаході. Із цього визначення людського антитіла спеціально виключене гуманізоване антитіло, яке містить антиген-зв'язувальні ділянки, отримані з організму, крім людини. Людські антитіла можуть бути отримані за допомогою різних методик, відомих у даній галузі. В одному варіанті здійснення, людське антитіло вибирають із фагової бібліотеки, яка експресує людські антитіла (Vaughan та ін. Nature Biotechnology 14:309-314 (1996); Sheets та ін. PNAS (USA) 95:6157-6162 (1998)); Hoogenboom й Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks та ін., J. Mol. Biol., 222:581 (1991)).

Людські антитіла також можуть бути отримані шляхом введення локусу імуноглобуліну людини трансгенним тваринам, наприклад, мишам, у яких ендogenous гени імуноглобулінів частково або повністю інактивовані. При провокації відбувається вироблення людських антитіл, які за всіма параметрами подібні до антитіл людини, включаючи перестановку генів, набір і склад антитіл.

5 Цей підхід описаний, наприклад, у патентах US 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016, і в наступних наукових публікаціях: Marks та ін., *Bio/Technology* 10: 779-783 (1992); Lonberg та ін., *Nature* 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368:812-13 (1994); Fishwild та ін., *Nature Biotechnology* 14: 845-51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14: 826 (1996); Lonberg й Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93 (1995). Альтернативно, людське антитіло може

10 бути отримане за допомогою іморталізації В-лімфоцитів людини, які продукують антитіло, спрямоване на антиген-мішень (такі В-лімфоцити можуть бути відновлені з оригінальних або можуть бути імунізовані *in vitro*). Див., наприклад, Cole та ін., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, сс. 77 (1985); Boerner та ін., *J. Immunol.* 147 (1):86-95 (1991); і патент US 5,750,373.

15 Антитіло зі "зрілою афінністю" являє собою антитіло з одним або декількома змінами в одній або більше з його CDR, які приводять до поліпшення спорідненості антитіла до антигену, у порівнянні з батьківським антитілом, яке не має цієї(их) зміни(н). Переважні антитіла зі зрілою афінністю мають спорідненість із антигеном-мішенню в наномольному або навіть пікомольному діапазоні. Антитіла зі зрілою афінністю одержують за допомогою методик,

20 відомих у даній галузі. В Marks та ін. *Bio/Technology* 10:779-783 (1992) описане дозрівання афінності за допомогою перестановки VH й VL доменів. Випадковий мутагенез CDR та/або каркасних ділянок описаний в: Barbas та ін. *Proc Nat. Acad. Sci, USA* 91:3809-3813 (1994); Schier та ін. *Gene* 169:147-155 (1995); Yelton та ін. *J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995); Jackson та ін., *J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995); і Hawkins й ін., *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992).

25 "Виділений" поліпептид являє собою поліпептид, який ідентифікований і відділений від та/або отриманий з компонента його природного оточення. Забруднювачами в його природному оточенні є речовини, який можуть виявляти вплив при діагностичному або терапевтичному застосуванні поліпептиду, і вони можуть являти собою ферменти, гормони й інші білкові або небілкові розчинені речовини. У переважних варіантах здійснення винаходу поліпептид повинен

30 бути очищений (1) до більше ніж 95 % у перерахунку на масу поліпептиду, що визначають методом Лоурі, і найбільш переважно до більше ніж 99 мас. %, (2) до ступеня, достатнього для одержання принаймні 15 N-кінцевих залишків або внутрішньої амінокислотної послідовності за допомогою секвенатора з обертовою чашкою, або (3) до гомогенного стану за даними ДСН-ПААГ у відновлювальних або невідновлювальних умовах при фарбуванні кумасі брильянтовим

35 голубим або переважно при фарбуванні сріблом. Виділений поліпептид включає поліпептид, який знаходиться *in situ* у рекомбінантних клітинах, якщо в них не присутній жоден компонент природного оточення поліпептиду. Однак звичайно виділений поліпептид одержують із використанням принаймні однієї стадії очищення.

40 "Функціональна антигензв'язувальна ділянка" антитіла являє собою ділянку, здатну зв'язувати антиген-мішень. Антигензв'язувальна афінність антигензв'язувальної ділянки може не бути настільки сильною, як у батьківського антитіла, з якого отримана антигензв'язувальна ділянка, але здатність зв'язувати антиген повинна бути достатньою для можливості вимірювання за допомогою будь-якого зі способів, які відомі й застосовуються для оцінки зв'язування антитіла з антигеном. Крім того, антигензв'язувальна афінність кожної з

45 антигензв'язувальних ділянок полівалентного антитіла, описаного в даному винаході, може бути різною. Для мультимерних антитіл, вказаних у даному винаході, кількість функціональних антигензв'язувальних ділянок може бути визначена за допомогою ультрацентрифугування, як описано в прикладі 2 нижче. Відповідно до цього способу аналізу, антиген-мішень у різних пропорціях об'єднують із мультимерним антитілом і розраховують середню молекулярну масу комплексів за умови наявності різного числа функціональних зв'язувальних ділянок. Ці

50 теоретичні значення порівнюють із отриманими фактичними експериментальними значеннями для визначення кількості функціональних антиген-зв'язувальних ділянок.

Антитіло, яке має "біологічні характеристики" вказаного антитіла являє собою антитіло, яке має одну або декілька біологічних характеристик цього антитіла, що відрізняє його від інших

55 антитіл, які зв'язуються з тим же антигеном.

Для скринінгу антитіл, які зв'язуються з епітопом на антигені, зв'язаним з антитілом, яке представляє інтерес, можна здійснювати звичайний перехресно-блокуючий аналіз, такий як описаний в *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow й David Lane (1988).

"Агоніст антитіла" являє собою антитіло, яке зв'язується з рецептором й активує його. Як правило, здатність агоніста антитіла активувати рецептор є принаймні кількісно подібна (і може бути надзвичайно кількісно подібна) до природного ліганда агоніста рецептора. Прикладом агоніста антитіла є агоніст, який зв'язується з рецептором суперсімейства рецепторів TNF й індукує апоптоз клітин, які експресують рецептор TNF. Дослідження для визначення індукції апоптозу описані в заявках WO98/51793 й WO99/37684, які обидві спеціально включені в даний винахід як посилання.

"Розлад" являє собою будь-який стан, при якому ефективне лікування за допомогою антитіла. Він включає хронічні й гострі розлади або захворювання, включаючи ті патологічні стани, які викликають схильність ссавця до вказаного захворювання. Необмежуваними прикладами розладів для лікування, відповідно до винаходу, є доброякісні й злоякісні пухлини; лейкози й лімфоїдні злоякісні порушення; нейронні, гліальні, астроцитні, гіпоталамічні й інші залозисті, макрофагальні, епітеліальні, стромальні й бластоцельні розлади; і запальні, ангіогенні й імунологічні розлади.

Термін "терапевтично ефективна кількість" стосується кількості лікарського засобу, ефективною для лікування захворювання або розладу в ссавця. У випадку злоякісного новоутворення терапевтично ефективна кількість лікарського засобу може зменшувати кількість пухлинних клітин; зменшувати розмір пухлини; інгібувати (тобто до деякої міри сповільнювати й переважно зупиняти) інфільтрацію злоякісних клітин у периферичних органах; інгібувати (тобто до деякої міри сповільнювати й переважно зупиняти) метастазування пухлини; інгібувати, певною мірою, ріст пухлини; і/або полегшувати певною мірою один або декілька симптомів, зв'язаних з розладом. У межах лікарський засіб може запобігати росту та/або вбивати існуючі ракові клітини, і він може бути цитостатичним та/або цитотоксичним. Для лікування злоякісного новоутворення, ефективність в умовах *in vivo* може бути визначена, наприклад, шляхом вимірювання тривалості виживання, часу прогресування захворювання (ЧПЗ), ступеня реакції-відповіді (СРВ), тривалості реакції-відповіді та/або якості життя.

"Лікування" стосується як терапевтичного лікування, так і профілактичних або превентивних заходів. Особи, які мають потребу в лікуванні, включають тих осіб, у яких уже діагностовано захворювання, а також тих осіб, у яких захворюванню можна запобігти.

Терміни "рак" й "злоякісний" стосуються або описують фізіологічний стан у ссавців, який звичайно характеризується неконтрольованим ростом клітин. Приклади злоякісного новоутворення включають, але не обмежуючись тільки ними, карциному, лімфому, бластоми, саркому й лейкоз. Більш переважні приклади таких злоякісних новоутворень включають плоскоклітинний рак, рак легені (включаючи дрібноклітинний рак легені, недрібноклітинний рак легені, аденокарциному легені й плоскоклітинний рак легені), рак очеревини, печінковоклітинний рак, рак шлунка (включаючи шлунково-кишковий рак), рак підшлункової залози, гліобластоми, рак шийки матки, рак яєчників, рак печінки, рак сечового міхура, гепатому, рак молочної залози, рак ободової кишки, колоректальний рак, рак ендометрію або матки, рак слинної залози, рак нирки, рак печінки, рак передміхурової залози, рак піхви, рак щитовидної залози, рак гепатоцитів і різні типи раку голови й шиї, а також В-клітинну лімфому (включаючи низькодиференційовану/фолікулярну не-ходжкінську лімфому (НХЛ); дрібнолімфоцитну (ДЛ) НХЛ; середньодиференційовану/фолікулярну НХЛ; середньодиференційовану дифузійну НХЛ; високодиференційовану імунобластну НХЛ; високодиференційовану лімфобластну НХЛ; високодиференційовану небластомерноклітину НХЛ; недиференційовану НХЛ; лімфому клітин кори головного мозку; лімфому, зв'язану зі СНІДом; і макроглобулінемію Уолденстрема); хронічний лімфолейкоз (ХЛЛ); гострий лімфобластний лейкоз (ОЛЛ); лейкоз ворсинчастих клітин; хронічний мієлобластний лейкоз; і посттрансплантаційний лімфопроліферативний розлад (ПТЛР), а також атипову судинну проліферацію, зв'язану з факіоматозом, набряк (такий як набряк, зв'язаний з пухлинами головного мозку), і синдром Мейгса.

Термін "хазяїн-ссавець" у контексті даного опису стосується будь-якого сумісного реципієнта для пересадки. Під "сумісним" мають на увазі хазяїна-ссавця, який сприйнятливий до пересаженного трансплантата. Переважно, хазяїном є людина. Якщо й донором трансплантата, і його хазяїном є людина, то вони переважно сумісні за антигенами HLAII класу для поліпшення гістосумісності.

Термін "цитотоксичний засіб" у контексті даного опису стосується речовини, яка інгібує або попереджає функцію клітин та/або викликає деструкцію клітин. Мається на увазі, що під цей термін підпадають радіоактивні ізотопи (наприклад, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³² і радіоактивні ізотопи Lu), хіміотерапевтичні засоби й токсини, такі як невеликі молекули токсинів або токсини, які мають ферментативну активність, бактеріального, грибового, рослинного або тварини походження, включаючи їх фрагменти та/або варіанти.

Термін "протипухлинна композиція" стосується композиції, корисної для лікування злоякісного новоутворення, яка містить принаймні один активний терапевтичний засіб, здатний інгібувати або запобігати росту або функціонуванню пухлини, і/або викликати руйнування пухлинних клітин. Терапевтичні засоби, придатні для застосування в складі протипухлинної композиції для лікування злоякісного новоутворення, включають, але не обмежуються тільки ними, хіміотерапевтичні засоби, радіоактивні ізотопи, токсини, цитокіни, такі як інтерферони, і антагоністичні засоби, спрямовані на цитокіни, рецептори цитокінів або антигени, зв'язані з пухлинними клітинами. Наприклад, терапевтичні засоби, придатні для застосування згідно із даним винаходом, можуть являти собою антитіла, такі як анти-HER2 антитіло й анти-СБ20 антитіло, або невеликі молекули, інгібітори тирозинкінази, такі як інгібітори VEGF рецептора й інгібітори EGF рецептора. Переважно терапевтичний засіб являє собою хіміотерапевтичний засіб.

"Хіміотерапевтичний засіб" являє собою хімічну сполуку, придатну для лікування раку. Приклади хіміотерапевтичних засобів включають алкілувальні засоби, такі як тіотепа й циклофосфамід CYTOXAN®; алкілсульфонати, такі як бусульфан, імпросульфан і піпосульфан; азириди, такі як бензодоба, карбоксон, метуредоба й уредоба; етиленіміни й метиламеламіни, включаючи алтретамін, триетиленмеламін, триетиленфосфорамід, триетилентифосфорамід і триметилломеламін; ацетогеніни (особливо булатацин і булатацинон); камптотецин (включаючи синтетичний аналог топотекану); бріостатин; калістатин; СС-1065 (включаючи його синтетичні аналоги адоцелезин, карцелезин і бізелезин); криптофіцини (особливо криптофіцин 1 і криптофіцин 8); доластатин; дуокарміцин (включаючи синтетичні аналоги, KW-2189 й СВ1-TM1); елеутеробін; панкреатистатин; саркодиктін; спонгістатин; азотні аналоги гірчичного газу, такі як хлорамбуцил, хлорнафазин, циклофосфамід, естамустин, іфосфамід, мехлоретамін, гідрохлорид оксиду мехлоретаміну, мельфалан, новембіхін, фенестерин, преднімустин, трофосфамід, урациловий аналог гірчичного газу; нітрососечовини, такі як кармустин, хлорзотин, фотемустин, ломустин, німустин і ранімустин; антибіотики, такі як енедіїнові антибіотики (наприклад, каліхеаміцин, особливо каліхеаміцин гамаїї і каліхеаміцин омегаї (див., наприклад, Agnew, Chem Intl. Ed. Engl. 33:183-186 (1994))); динеміцин, включаючи динеміцин А; бісфосфонати, такі як клодронат; еспераміцин, а також неокарзиностатин-хромовий і споріднені хромопротейнові енедіїнові антибіотики-хромові, аклаціномізини, актиноміцин, аутраміцин, азасерин, блеоміцини, кактиноміцин, карабіцин, карминоміцин, карзинофілін, хромоміцини, дактиноміцин, даунорубіцин, деторубіцин, 6-діазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубіцин ADRIAMYCIN® (включаючи морфоліно-доксорубіцин, ціаноморфоліно-доксорубіцин, 2-піролідіно-доксорубіцин і деоксидоксорубіцин), епірубіцин, езорубіцин, ідарубіцин, марцеломіцин, мітоміцини, такі як мітоміцин С, мікофенольна кислота, ногаламіцин, олівоміцини, пепломіцин, потфіроміцин, пуроміцин, квеламіцин, родорубіцин, стрептонігрин, стрептозоцин, туберцидин, убенімекс, зиностатин, зорубіцин; антиметаболіти, такі як метотрексат й 5-фторурацил (5-ФУ); аналоги фолієвої кислоти, такі як деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметотрексат; аналоги пурину, такі як флударабін, 6-меркаптопурин, тіаміприн, тіогуанін; аналоги піримідину, такі як анцитабін, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабін, дідеоксиуридин, доксифлуридин, еноцитабін, флоксурин; андрогени, такі як калустерон, дромостанолонпропіонат, епітіостанол, мепітіостан, тестостерон; антиадренергетики, такі як аміноглутетимід, мітотан, трилостан; замінник фолієвої кислоти, такий як фролінова кислота; ацеглатон; альдофосфамідглікозид; амінолевулінову кислоту; енілурацил; амсакрин; бестрабуцил; бісантрен; едотраксат; дефосфамін; демеколцин; діазиквін; елфорнітин; ацетат еліптінію; епотилон; етоглуцид; нітрат галію; гідроксисечовину; лентинан; лонідаїнін; маїтансиноїди, такі як маїтансин й ансамітоцини; мітогуазон; мітоксантрон; мопіданмол; нітраерин; пентостатин; фенамет; пірарубіцин; лозоксантрон; подофілінову кислоту; 2-етилгідрозид; прокарбазин; полісахаридний комплекс PSK® (JHS Natural Products, Юджин, шт. Орегон); разоксан; ризоксин; сизофіран; спірогерманій; теназонову кислоту; триазиквін; 2,2',2"-трихлортриетиламін; трихотекени (особливо Т-2 токсин, веракурин А, роридин А й ангуїдин); уретан; віндезин; дакарбазин; маномустин; мітобронітол; мітолактол; піпоброман; гацитозин; арабінозид ("Ага-С"); циклофосфамід; тіотепа; таксоїди, наприклад, паклітаксел TAXOL® (Bristol-Myers Squibb Oncology, Принстон, шт. Нью-Джерсі), препарат паклітакселу у вигляді наночастинок на основі альбуміну без Cremophor ABRAXANE™ (American Pharmaceutical Partners, Шомберг, Іллінойс), і доксетаксел TAXOTERE® (Rhône-Poulenc Rorer, Ентоні, Франція); хлорамбуцил; гемцитабін GEMZAR®; 6-тіогуанін; меркаптопурин; метотрексат; координаційні комплекси платини, такі як цисплатин, оксалиплатин і карбоплатин; вінбластин; платину; етопозид (VP-16); іфосфамід; мітоксантрон; вінкрисдин; вінорелбін NAVELBINE®; новантрон; теніпозид; едотрексат; дауноміцин; аміноптерин; кселода;

ібандронат; іринотекан (наприклад, CPT-11); інгібітор топоізомерази RFS 2000; дифтометилорнітин (ДМФО); ретиноїди, такі як ретиноєва кислота, капецитабін; і фармацевтично прийнятні солі, кислоти або похідні будь-якої із вказаних вище сполук.

Під обсяг цього визначення також підпадають антигормональні засоби, які регулюють або інгібують дію гормону на пухлини, такі як антиестрогени й селективні модулятори рецептора естрогену (SERM), включаючи, наприклад, тамоксифен (включаючи тамоксифен NOLVADEX®), ралоксифен, дролоксифен, 4-гідрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон, і FARESTON-тореміфен; інгібітори ароматази, які інгібують фермент ароматазу, який регулює вироблення естрогену в надниркових залозах, такі як, наприклад, 4(5)-імідазоли, аміноглутетимід, мегестролацетат MEGASE®, ексеместан AROMASIN®, формерстан, фадрозол, ворозол RIVISOR®, летрозол FEMARA® і анастрозол ARIMIDEX®; і антиандрогени, такі як флутамід, нілутамід, бікалутамід, лейпролід і гозерелін; а також троксацитабін (1,3-діоксолановий аналог нуклеозиду цитозину); антисмислові олігонуклеотиди, особливо ті, які інгібують експресію генів шляхів передачі сигналів, задіяних в проліферації аберантних клітин, такі як, наприклад, PKC-альфа, Ralf і H-Ras; рибозими, такі як інгібітор експресії VEGF (наприклад, рибозим ANGIOZYME®) і інгібітор експресії HER2; вакцини, такі як вакцини для генної терапії, наприклад, вакцина ALLOVECTIN®, вакцина LEUVECTIN® і вакцина VAXID®; PROLEUKIN® rIL-2; інгібітор топоізомерази 1 LURTOTECAN®; ABARELIX® gmRH; і фармацевтично прийнятні солі, кислоти або похідні будь-якої з вказаних вище сполук.

"Засіб, який інгібує ріст" у контексті даного опису стосується сполуки або композиції, яка інгібує ріст клітин *in vitro* та/або *in vivo*. Таким чином, засобом, який інгібує ріст, може бути той засіб, який істотно зменшує відсоток клітин у S-фазі. Приклади засобів, які інгібують ріст, включають засоби, які блокують проходження клітинного циклу (на стадії, яка відрізняється від S-фази), такі як засоби, які затримують G1-фазу й M-фазу. Класичними блокаторами M-фази є препарати барвінку (вінкристин і вінбластин), TAXOL®, і інгібітори топо-II, такі як доксорубіцин, епірубіцин, даунорубіцин, етопозид і блеоміцин. Ті засоби, які зупиняють G1-фазу, також підпадають під засоби, які зупиняють S-фазу, наприклад, засоби, які алкілюють ДНК, такі як тамоксифен, преднізон, дакарбазин, мехлоретамін, цисплатин, метотрексат, 5-фторурацил, і ара-С. Додаткову інформацію можна знайти в The Molecular Basis of Cancer, під ред Mendelsohn й Israel, частина 1, під заголовком "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" під ред. Murakami та ін. (WB Saunders: Філадельфія, 1995), особливо на стор. 13.

Термін "цитокін" є загальним терміном для білків, які синтезуються однією популяцією клітин і впливають на інші клітини, виконуючи функції міжклітинних медіаторів. Прикладами таких цитокінів є лімфокіни, монокіни й звичайні поліпептидні гормони. До цитокінів належать, зокрема, гормон росту, такий як людський гормон росту, N-метіонілований людський гормон росту й бичачий гормон росту; паратиреоїдний гормон; тироксин; інсулін; проінсулін; релаксин; прорелаксин; глікопротеїнові гормони, такі як фолікулостимулювальний гормон (ФСГ), тиреотропний гормон (ТТГ) і лютеїнізуючий гормон (ЛГ); фактор росту епідермісу; фактор росту гепатоцитів; фактор росту фібробластів; пролактин; плацентарний лактоген; фактор некрозу пухлин -альфа й -бета; фактор, який інгібує мюллерову протоку; мишиний гонадотропін-асоційований пептид; інгібін; активін; фактор росту ендотелію судин; інтегрин; тромбopoетин (ТП); фактори росту нервів, такі як NGF-альфа; фактор росту тромбоцитів; трансформуючі фактори росту (TGF), такі як TGF-альфа й TGF-бета; інсуліноподібний фактор росту -I й -II; еритропоетин (ЕП); остеоіндуктивні фактори; інтерферони, такі як інтерферон-альфа, -бета й -гамма колонієстимулюючі фактори (CSF), такі як макрофагальний CSF (M-CSF); гранулоцитарно-макрофагальний CSF (GM-CSF) і гранулоцитарний CSF (G-CSF); інтерлейкіни (IL), такі як IL-1, IL-1 альфа, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; фактор некрозу пухлин, такий як TNF-альфа або TNF-бета; а також інші поліпептидні фактори, включаючи LIF й кіт-ліганд (KL). У даному описі термін цитокіни охоплює білки природного походження або отримані за допомогою рекомбінантної культури клітин і біологічно активні еквіваленти природних послідовностей цитокінів.

Термін "проліки", який використовується у даному описі, стосується попередника або похідного фармацевтично активної речовини, який(яка) є менш цитотоксичним відносно до пухлинних клітин, ніж первинний лікарський засіб і може бути активований ферментативно або перетворений в більш активну початкову форму. Див., наприклад, Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" Видання біохімічного товариства, 14, стор. 375-382, 615-і збори, Белфаст (1986) і Stella та ін., "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," Directed Drug Delivery, Borchardt та ін., (ред.), стор. 247-267, Humana Press (1985). Проліки згідно із даним винаходом включають, але не обмежуючись тільки ними, фосфатвмісні проліки, тіофосфатвмісні проліки, сульфатвмісні проліки, пептидвмісні проліки, проліки на основі модифікованих D-амінокислот,

глікозильовані проліки, проліки, які містять бета-лактамі, необов'язково заміщені феноксиацетамідвмісні проліки або необов'язково заміщені фенілацетамідвмісні проліки, проліки 5-фторцитозину й інші 5-фторуридинові проліки, які можуть бути перетворені в більш активні вільні цитотоксичні лікарські засоби. Прикладами цитотоксичних засобів, які можуть бути

5 перетворені у форму проліків для застосування згідно із даним винаходом, є, але не обмежуючись тільки ними, всі перераховані вище хіміотерапевтичні засоби.

Термін "внутрішньовенна інфузія" стосується введення лікарського засобу у вену тварині або людині протягом періоду часу, більше приблизно 5 хвилин, переважно приблизно від 30 до 90 хвилин, хоча, відповідно до винаходу, внутрішньовенна інфузія альтернативно вводиться

10 протягом 10 годин або менше.

Термін "внутрішньовенний болюс" або "внутрішньовенний поштовх" стосується введення лікарського засобу у вену тварині або людині, таким чином, що лікарський засіб вводиться в організм приблизно протягом 15 хвилин або менше, переважно 5 хвилин або менше.

Термін "підшкірне введення" стосується введення лікарського засобу під шкіру тварині або людині, переважно в порожнину між шкірою й розташованою під нею тканиною, за допомогою відносно повільного, безперервного вивільнення лікарського засобу з ємності. Порожнина може бути створена шляхом стискання або відтягування шкіри нагору й убік від розташованої під нею

15 тканини.

Термін "підшкірна інфузія" стосується введення лікарського засобу під шкіру тварині або людині, переважно в порожнину між шкірою й розташованою під нею тканиною, за допомогою відносно повільного, безперервного вивільнення лікарського засобу з ємності протягом періоду часу, включаючи, але не обмежуючись, 30 хвилин або менше, або 90 хвилин або менше. Необов'язково, інфузію можна здійснювати шляхом підшкірної імплантації помпи для доставки лікарського засобу, яка вживлена під шкіру людині або тварині, причому помпа доставляє

20 заздалегідь встановлену кількість лікарського засобу протягом заздалегідь встановленого періоду часу, такого як 30 хвилин, 90 хвилин, або періоду часу, який охоплює курс лікування.

Термін "підшкірний болюс" стосується введення лікарського засобу під шкіру тварині або людині, причому болюсна доставка лікарського засобу переважно відбувається протягом часу, менше ніж приблизно 15 хвилин, більш переважно, менше, ніж 5 хвилин, і найбільш переважно

25 менше, ніж 60 секунд. Введення переважно здійснюють у порожнину між шкірою й розташованою під нею тканиною, причому порожнину створюють, наприклад, шляхом стискання або відтягування шкіри нагору й убік від розташованої під нею тканини.

"Ангіогенний фактор" являє собою фактор росту, який стимулює розвиток кровоносних судин. Переважним ангіогенним фактором згідно із даним винаходом є фактор росту ендотелію судин (VEGF).

30

Слово "мітка" у контексті даного опису стосується сполуки або композиції, яка може бути виявлена, і яка безпосередньо або опосередковано кон'югована з поліпептидом. Мітка сама може являти собою мітку, яка може бути виявлена, (наприклад, радіоізотопні мітки або флуоресцентні мітки) або, у випадку ферментативної мітки, може каталізувати хімічну зміну субстрату або композиції, який(яку) можна виявляти.

35

"Виділена" молекула нуклеїнової кислоти являє собою молекулу нуклеїнової кислоти, яка ідентифікована й відділена від принаймні однієї молекули нуклеїнової кислоти-домішки, з якою вона звичайно зв'язана в природному джерелі нуклеїнової кислоти поліпептиду. Виділена молекула нуклеїнової кислоти відрізняється від тієї форми або набору, у яких вона знаходиться в природних умовах. Таким чином, виділені молекули нуклеїнових кислот відрізняються від молекули нуклеїнової кислоти, яка існує в клітині в природних умовах. Однак виділена молекула нуклеїнової кислоти включає молекулу нуклеїнової кислоти, яка знаходиться в клітинах, у яких у нормі відбувається експресія поліпептиду, наприклад, у випадку, якщо молекула нуклеїнової

40

кислоти має локалізацію в хромосомі, відмінну від її локалізації в клітині в природних умовах.

Вираз "контролюючі послідовності" стосується послідовностей ДНК, необхідних для експресії функціонально зв'язаної кодувальної послідовності у вибраному організмі-хазяїні. Придатні для прокариот контролюючі послідовності являють собою, наприклад, промотор, необов'язково оператор і сайт зв'язування рибосоми. Як відомо, в еукаріотичних клітинах присутні промотори, сигнали поліаденілування й енхансери.

45

Нуклеїнова кислота "функціонально зв'язана", якщо вона знаходиться у функціональному зв'язку з іншою нуклеотидною послідовністю. Наприклад, ДНК передпослідовності або секреторної лідерної послідовності функціонально зв'язують із ДНК поліпептиду, якщо він експресується у вигляді передпротеїну, який бере участь у секреції поліпептиду; промотор або енхансер функціонально зв'язують із коду вальною послідовністю, якщо він впливає на транскрипцію послідовності; або сайт зв'язування рибосоми функціонально зв'язують із

50

55

60

кодувальною послідовністю, якщо він розташований так, що може полегшувати трансляцію. Як правило, "функціонально зв'язаний" означає, що зв'язані послідовності ДНК є суміжними, а у випадку секреторної лідерної послідовності є суміжними й знаходяться у фазі зчитування. Однак енхансери не обов'язково повинні бути суміжними. Зв'язування здійснюється шляхом лігування в підходящі сайти рестрикції. Якщо такі сайти не існують, то відповідно до відомої практики застосовують синтетичні олігонуклеотидні адаптори або лінкери.

Як використовується в даному винаході, вираз "клітина," "клітинна лінія" й "культура клітин" застосовуються взаємозамінно й всі такі позначення включають потомство. Таким чином, слова "трансформанти" й "трансформовані клітини" включають первинні клітини суб'єкта й культури, які походять із цих клітин, не враховуючи кількості їх пересадок. Також мається на увазі, що все потомство може не мати зовсім ідентичного вмісту ДНК внаслідок навмисних або випадкових мутацій. Також це поняття охоплює мутантне потомство, яке має таку ж дію або біологічну активність, які встановлені для первинно трансформованих клітин. Якщо застосовуються особливі позначення, то вони будуть очевидні з контексту.

IS. Одержання анти-VEGF антитіл.

A. Одержання антитіла.

(i) VEGF Антиген.

Способи одержання й характеристики антитіл добре відомі в даній галузі техніки. Нижче як приклади описані методики для одержання анти-VEGF антитіл, які застосовуються відповідно до даного винаходу. VEGF антиген, який використовується для одержання антитіл, може являти собою, наприклад, молекулу VEGF₁₆₅, або інші ізоформи VEGF або їх фрагмент, який містить необхідний епітоп. Інші форми VEGF, придатні для одержання анти-VEGF антитіл за винаходом, очевидні для фахівця в даній галузі.

VEGF людини одержують, на першому етапі, шляхом скринінгу бібліотеки кДНК, отриманої із клітин людини, використовуючи бичачу кДНК VEGF як зонд для гібридизації. Leung та ін. (1989) Science, 246:1306. У такий спосіб ідентифікують кДНК, яка кодує білок, який складається з 165 амінокислот і який є гомологічним більше ніж на 95 % до VEGF бика; цей білок, який складається з 165 амінокислот, звичайно розглядають як VEGF людини (hVEGF) або VEGF₁₆₅. Мітогенну активність VEGF людини підтверджували шляхом експресії кДНК VEGF людини в клітинах ссавця-хазяїна. Середовище, обумовлене клітинами, трансфектованими кДНК VEGF людини, стимулює проліферацію ендотеліальних клітин капілярів, тоді як для контрольних клітин цього не відбувається. Leung та ін. (1989) Science, вище.

Незважаючи на те, що фактор росту клітин ендотелію судин може бути виділений й очищений із природних джерел для наступного терапевтичного застосування, внаслідок відносно низьких концентрацій білка у фолікулярних клітинах і його високій вартості, як щодо трудозатрат, так і витрат, відновлення VEGF є комерційно невдалим. Отже, подальші спроби пов'язані із клонуванням й експресією VEGF за допомогою методик рекомбінантної ДНК. (Див., наприклад, Ferrara (1995) Laboratory Investigation 72:615-618, і посилання, наведені в ньому).

VEGF експресується в різних тканинах у вигляді множинних гомодимерних форм (121, 145, 165, 189 й 206 амінокислот на мономер) внаслідок альтернативного сплайсингу РНК. VEGF₁₂₁ являє собою розчинний мітоген, який не зв'язує гепарину; подовжені форми VEGF зв'язують гепарини з поступово зростаючою афінністю. Форми VEGF, зв'язані з гепарином, можуть бути розщеплені плазміном на карбоксикінці з вивільненням здатної(их) до дифузії форми(м) VEGF. Амінокислотна послідовність карбоксикінцевого пептиду, ідентифікованого після розщеплення плазміном, являє собою Arg₁₁₀-Ala₁₁₁. Амінокінцеве "ядро" білка VEGF (1-110), виділене у вигляді гомодимеру, зв'язує нейтралізуючі моноклональні антитіла (такі як антитіла, позначені як 4.6.1 й 3.2E3.1.1) і розчинні форми рецепторів VEGF з подібною афінністю в порівнянні з інтактним гомодимером VEGF₁₆₅.

Останнім часом також були ідентифіковані декілька молекул, які мають структурну подібність до VEGF, включаючи плацентарний фактор росту (PlGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D й VEGF-E. Ferrara й Davis-Smyth (1987) Endocr. Rev., вище; Ogawa та ін. (1998) J. Biological Chem. 273:31273-31281; Meyer та ін. (1999) EMBO J., 18:363-374. Рецепторна тирозинкіназа Flt-4 (VEGFR-3) була ідентифікована як рецептор до VEGF-C й VEGF-D. Joukov та ін. (1996) EMBO. J. 15:1751; Lee та ін. (1996) Proc. Natl Acad. Sci. USA 93:1988-1992; Achen та ін. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:548-553. Недавно було показано, що VEGF-C залучений в регуляцію лімфатичного ангиогенезу. Jeltsch та ін. (1997) Science 276:1423-1425.

Було ідентифіковано два рецептори VEGF: Flt-1 (який також називається VEGFR-1) і KDR (який також називається VEGFR-2). Shibuya та ін. (1990) Oncogene 8:519-527; de Vries та ін. (1992) Science 255:989-991; Terman та ін. (1992) Biochem. Biophys. Res. Commun. 187:1579-1586. Було показано, що нейропептин-1 є селективним рецептором VEGF, здатним зв'язувати ізоформи

VEGF, зв'язані з гепарином (Soker та ін. (1998) Cell 92:735-45). Обидва Flt-1 й KDR належать до сімейства рецепторних тирозинкіназ (RTK). RTK являє собою велике сімейство трансмембранних рецепторів з різними біологічними активностями. Зараз ідентифіковано принаймні дев'ятнадцять (19) різних підсімейств RTK. Сімейство рецепторних тирозинкіназ (RTK) включає рецептори, які є надзвичайно важливими для росту й диференціації клітин різних типів (Yarden й Ullrich (1988) Ann. Rev. Biochem. 57:433-478; Ullrich й Schlessinger (1990) Cell 61:243-254). Характерною активністю RTK є активація при зв'язуванні з лігандом, що приводить до фосфорилування рецептора й багатьох субстратів у клітині й внаслідок цього до різних клітинних реакцій-відповідей (Ullrich & Schlessinger (1990) Cell 61:203-212). Таким чином, рецепторна тирозинкіназа, опосередковуючи передачу сигналів, ініціюється позаклітинною взаємодією зі специфічним фактором росту (лігандом), як правило, з наступною димеризацією рецептора, стимуляцією властивої білкової тирозинкіназної активності й трансфосфорилуванням рецептора. У такий спосіб створюються сайти зв'язування для молекул, які передають внутрішньоклітинні сигнали, і утворюються різні комплекси із цитоплазматичними сигнальними молекулами, що сприяє підходящій реакції-відповіді клітин, (наприклад, поділу клітин, диференціації, метаболічним діям, зміні позаклітинного мікрооточення) див., Schlessinger й Ullrich (1992) Neuron 9:1-20. Структурно, обидва Flt-1 й KDR мають сім імуноглобулін-подібних доменів у позаклітинному домені, одну трансмембранну ділянку й консенсусну тирозинкіназну послідовність, яка перервана вставленим доменом кінази. Matthews та ін. (1991) Proc. Natl Acad. Sci. USA 88:9026-9030; Terman та ін. (1991) Oncogene 6:1677-1683.

(ii) Поліклональні антитіла.

Поліклональні антитіла переважно одержують шляхом множинного підшкірного (sc) або внутрішньоочеревинного (ip) введення тваринним відповідного антигену й ад'юванту. Крім того, вказаний антиген може бути кон'югований з білком, який є імуногенним відносно до тих видів тварин, які піддаються імунізації, наприклад, з гемоціаніном молюска фісурели, сироватковим альбуміном, тиреоглобуліном великої рогатої худоби або інгібітором трипсину соєвих бобів при використанні біфункціонального або дериватизуючого агента, наприклад, складного ефіру малеїмідобензоїл сульфосукциніміду (кон'югація відбувається за допомогою залишків цистеїну), N-гідроксисукциніміду (кон'югація відбувається за допомогою залишків лізину), глутаральдегіду, альдегіду янтарної кислоти, SOCl_2 , або $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, де R й R^1 є різними алкільними групами.

Тварин імунізують антигеном, імуногенними кон'югатами або їх похідними, об'єднуючи, наприклад, 100 мкг або 5 мкг білка або кон'югата (для кроликів або мишей, відповідно) із трьома об'ємами повного ад'юванту Фрейнда й здійснюючи ін'єкції отриманого розчину внутрішньошкірно в різні ділянки. Через один місяць тварин бустують 1/5-1/10 початкової кількості білка або кон'югата в повному ад'юванті Фрейнда підшкірними ін'єкціями в різні ділянки. Через 7-14 днів здійснюють збір крові у тварин і визначають титр антитіл в отриманій сироватці. Тварин бустують доти, поки не встановиться титр антитіл. Переважно, тварин бустують кон'югатом того ж самого антигену, але кон'югованого з іншим білком та/або з використанням іншого перехресно-зшиваючого агента. Кон'югати також можуть бути отримані за допомогою культури рекомбінантних клітин у формі білків злиття. Крім того, для посилення імунної відповіді можуть бути використані агенти, які сприяють агрегації, такі як галуни.

(iii) Моноклональні антитіла.

Моноклональні антитіла можна одержувати за допомогою методу на основі гібридом, який вперше описаний Kohler та ін., Nature, 256:495 (1975), або за допомогою методів рекомбінантної ДНК (патент US 4,816,567).

При використанні методу на основі гібридом мишу або іншу придатну тварину-хазяїн, таку як хом'ячок або мавпу-макаку, імунізують відповідно до описаної вище методики для того, щоб викликати утворення лімфоцитів, які продукують або можуть продукувати антитіла, які мають здатність специфічно зв'язуватися з білком, який застосовують для імунізації. Альтернативно, лімфоцити можуть бути імунізовані *in vitro*. Потім лімфоцити зливають із мієломними клітинами за допомогою прийнятного зв'язувального агента, такого як поліетиленгліколь, з одержанням клітини гібридами (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles й Practice, стор. 59-103 (Academic Press, 1986)).

Отримані в такий спосіб клітини гібридами висівають і вирощують на придатному культуральному середовищі, яке переважно містить одну або декілька речовин, які інгібують ріст або виживання незлитих батьківських мієломних клітин. Наприклад, якщо батьківські мієломні клітини не містять ферменту гіпоксантингуанінфосфорибозилтрансферази (HGPRT або HPRT), то культуральне середовище для гібридом, як правило, повинне містити

гіпоксантин, аміноптерин і тимідин (НАТ-середовище), тобто речовини, які перешкоджають росту клітин з дефіцитом HGPRT.

Переважаючими мієломними клітинами, які застосовують для злиття, є клітини, які легко піддаються злиттю, підтримують стабільний високий рівень вироблення антитіл вибраними продукуючими антитіла клітинами й чутливі до середовища, такого як НАТ-середовище. Переважними лініями клітин мієломи є лінії мишиної мієломи, такі як створені на основі мишиних ліній пухлинних клітин лінії MOPC-21 й MPC-11, які можна одержувати з Salk Institute Cell Distribution Center, Сан-Дієго, шт. Каліфорнія, США, і клітини SP-2 або X63-Ag8-653, які можна одержувати з Американської колекції типових культур, Роквіл, шт. Мериленд, США. Описане також застосування ліній клітин мієломи людини й гетеромієломи типу миша-людина для одержання моноклональних антитіл людини (Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur та ін., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, стор. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Нью-Йорк, 1987)).

Культуральне середовище, у якому вирощують клітини гібридами, аналізують відносно вироблення моноклональних антитіл до антигену. Переважно, специфічність зв'язування моноклональних антитіл, отриманих з використанням клітин гібридами, визначають методом імунопреципітації або за допомогою аналізу зв'язування *in vitro*, такого як радіоімуний аналіз (PIA) або твердофазний імуноферментний аналіз (ELISA).

Після виявлення клітин гібридами, які продукують антитіла необхідної специфічності, афінності та/або активності, клони можна субклонувати за допомогою методик обмежуючого розведення й вирощувати стандартними методами (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, стор. 59-103 (Academic Press, 1986)). Придатні для цієї мети культуральні середовища включають, наприклад, середовище D-MEM або RPMI-1640. Крім того, клітини гібридами можна вирощувати *in vivo* у вигляді асцитних пухлин в організмі тварин.

Моноклональні антитіла, які секретуються субклонами, можна відокремлювати від культурального середовища, асцитної рідини або сироватки за допомогою звичайних методів очищення імуноглобулінів, таких як, наприклад, хроматографія з використанням протеїн А-сефарози, гідроксилапатитів, гель-електрофорезу, діаліз або афінна хроматографія.

ДНК, яка кодує моноклональні антитіла, можна легко виділяти й секвенувати за допомогою загальноприйнятих процедур (наприклад, з використанням олігонуклеотидних зондів, які мають здатність специфічно зв'язуватися з генами, які кодують важкі й легкі ланцюги моноклональних антитіл). Як переважне джерело такої ДНК служать клітини гібридами. Після виділення ДНК можна включати в експресійні вектори, якими потім трансфектують клітини-хазяї, такі як клітини *E. coli*, COS-клітини мавпи, клітини яєчника китайського хом'ячка (CHO) або клітини мієломи, які без трансфекції не продукують білок імуноглобуліну, що приводить до синтезу моноклональних антитіл у рекомбінантних клітинах-хазяїнах. Рекомбінантне одержання антитіл більш докладно буде описано нижче.

Відповідно до ще одного варіанта здійснення винаходу, антитіла або фрагменти антитіл можна виділяти з фагових бібліотек антитіл, створених за допомогою методів, описаних в McCafferty та ін., Nature, 348:552-554 (1990). В Clackson та ін., Nature, 352:624-628 (1991) і Marks та ін., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991) описане виділення мишиних і людських антитіл, відповідно, за допомогою фагових бібліотек. У наступних публікаціях описане одержання високоафінних (нМ-діапазон) антитіл людини за допомогою перестановки ланцюга (Marks та ін., Bio/Technology, 10:779-783 (1992)), а також комбінаторна інфекція й рекомбінація *in vivo* як стратегія конструювання дуже великих фагових бібліотек (Waterhouse та ін., Nuc. Acids. Res., 21:2265-2266 (1993)). Таким чином, ці методи являють собою реальну альтернативу традиційним методам виділення моноклональних антитіл на основі гібридом моноклональних антитіл.

ДНК також можна модифікувати, наприклад, шляхом заміни кодувальної послідовності константних доменів важкого й легкого ланцюга людини гомологічними послідовностями мишей (патент US 4,816,567; Morrison, і ін., Proc. Natl Acad. Sci. USA, 81:6851 (1984)), або за допомогою ковалентного зв'язування кодувальної послідовності імуноглобуліну з усією або із частиною кодувальної послідовності поліпептиду, який не належить до імуноглобуліну.

Як правило, такі поліпептиди, які не належать до імуноглобулінів, замінюють на константні домени антитіла або замінюють на варіабельні домени однієї антиген-зв'язувальної ділянки антитіла, створюючи химерне бівалентне антитіло, яке містить одну антигензв'язувальну ділянку, яка має специфічність відносно антигену, і іншу антигензв'язувальну ділянку, яка має специфічність відносно іншого антигену.

(iv) Гуманізовані антитіла й антитіла людини.

Гуманізоване антитіло являє собою антитіло, яке має один або декілька вбудованих у нього амінокислотних залишків, отриманих із джерела, відмінного від людини. Ці амінокислотні залишки, отримані із джерела, відмінного від людини, часто називають "імпортними" залишками, і їх звичайно одержують із "імпортного" варіабельного домену. Гуманізацію в цілому можна здійснювати відповідно до методу Winter зі співавторами (Jones та ін., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann та ін., *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeven та ін., *Science*, 239:1534-1536 (1988)), шляхом заміни CDRs або CDR послідовностей гризунів відповідними послідовностями антитіла людини. Отже, такі "гуманізовані" антитіла являють собою химерні антитіла (патент US 4,816,567), у яких домен, істотно менший ніж інтактний варіабельний домен людини, замінений відповідною послідовністю, отриманою з видів крім людини. На практиці гуманізовані антитіла являють собою, як правило, антитіла людини, у яких деякі CDR залишки й можливо деякі FR залишки замінені залишками з аналогічних ділянок антитіл гризунів.

Вибір варіабельних доменів, як легких, так і важких ланцюгів антитіл людини, які будуть використані для одержання гуманізованих антитіл, є надзвичайно важливим для зниження їх антигенності. Відповідно до так званого методу "найбільш переважної підготовки", послідовність варіабельного домену антитіла гризуна скринують проти цілої бібліотеки відомих послідовностей варіабельних доменів людини. Послідовність антитіла людини, яка найбільш близька до послідовності антитіла гризуна, потім використовують як каркасну ділянку (FR) людини для гуманізування антитіл (Sims та ін., *J. Immunol.*, 151:2296 (1993); Chothia та ін., *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987)). Інший метод передбачає використання певної каркасної ділянки, яка походить з консенсусної послідовності всіх антитіл людини з певним підтипом легких або важких ланцюгів. Та сама каркасна послідовність може використовуватися для одержання різних гуманізованих антитіл (Carter та ін., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Presta та ін., *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)).

Крім того, представляється важливим, щоб антитіла були гуманізовані зі збереженням високої афінності до антигену й інших цінних біологічних властивостей. Для досягнення вказаної мети, відповідно до переважного способу, гуманізовані антитіла одержують, аналізуючи послідовності батьківських антитіл і різні концептуальні продукти гуманізування при використанні методу тривимірного моделювання батьківських і гуманізованих послідовностей. Тривимірні моделі імунoglobulinів є загальнодоступними й добре відомі фахівцям в даній галузі. Комп'ютерні програми, які демонструють можливі тривимірні конформаційні структури вибраних кандидатних послідовностей імунoglobulinів, також загальнодоступні. Аналіз вказаних зображень дозволяє оцінити внесок різних залишків у функціонування кандидатної послідовності імунoglobulinу, тобто тих залишків, які впливають на здатність кандидатного імунoglobulinу зв'язуватися з відповідним антигеном. За допомогою вказаного підходу FR залишки можуть бути відібрані й скомбіновані з реципієнтними й імпортними послідовностями з одержанням антитіл, які мають потрібні характеристики, такі як підвищена афінність зв'язування антигену(ів)-мішені(ней). Як правило, CDR залишки здійснюють безпосередній й найбільш істотний вплив на зв'язування антигену.

Альтернативно, зараз представляється можливим одержувати трансгенних тварин (наприклад, мишей), які після імунізації можуть продукувати повний спектр людських антитіл без виробництва ендogenous імунoglobulinу. Наприклад, було описано, що гомозиготна делеція гена ділянки стику важкого ланцюга антитіла (J_H) в організмі химерних мишей і мишей з мутацією в зародковій лінії приводить до повного інгібування виробництва ендogenous антитіла. Перенесення набору зародкової лінії гена імунoglobulinу людини в таку мутантну зародкову лінію приводить до виробництва антитіл людини після контрольного зараження антигеном. Див., наприклад, Jakobovits та ін., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits та ін., *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggermann та ін., *Year in Immunol.*, 7:33 (1993); i Duchosal та ін., *Nature* 355:258 (1992). Антитіла людини можна одержувати за допомогою фагово-дисплейних бібліотек (Hoogenboom та ін., *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks та ін., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991); Vaughan та ін., *Nature Biotech* 14:309 (1996)).

(v) Фрагменти антитіл.

Для одержання фрагментів антитіл розроблені різні методи. Традиційно ці фрагменти одержували шляхом протеолітичного розщеплення інтактних антитіл (див., наприклад, Morimoto та ін., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992) i Brennan та ін., *Science*, 229:81 (1985)). Однак у зараз ці фрагменти можна одержувати безпосередньо за допомогою рекомбінатних клітин-хазяїв. Наприклад, фрагменти антитіл можна виділяти з вищеописаних фагових бібліотек антитіл. Альтернативно, Fab'-SH-фрагменти можна безпосередньо виділяти з *E. coli* і хімічно зшивати з одержанням P(ab')₂-фрагментів (Carter та ін., *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). Відповідно до іншого підходу, P(ab')₂-фрагменти можна виділяти безпосередньо з

культури рекомбінатних клітин-хазяїв. Фахівцям у даній галузі повинні бути очевидні інші методи одержання фрагментів антитіл. В інших варіантах здійснення винаходу вибране антитіло являє собою однопанцюговий Fv-фрагмент (scFv). Див. WO 93/16185.

(vi) Поліспецифічні антитіла.

5 Поліспецифічні антитіла мають здатність зв'язувати принаймні два різні антигени. Хоча такі молекули звичайно зв'язують тільки два антигени (тобто являють собою біспецифічні антитіла, BsAb), згідно із даним винаходом під це визначення підпадають також антитіла з додатковими специфічностями, такі як триспецифічні антитіла. Прикладами BsAb є антитіла, у яких одне плече спрямоване на антиген пухлинної клітини, а інше плече спрямоване на цитотоксичну

10 тригерну молекулу, такі як анти-FcγRI/анти-CD15, анти-p185^{HER2}/FcγRIII (CD16), анти-SB3/антизлоскисні В-клітини (1D10), анти-SB3/анти-p185^{HER2}, анти-CD3/анти-p97, анти-CD3/антинирково-клітинна карцинома, анти-CD3/анти-OVCAR-3, анти-CD3/L-D1 (антикарцинома ободової кишки), анти-CD3/анти-аналог меланоцитостимулюючого гормону, анти-EGF рецептор/анти-CD3, анти-CD3/анти-CAMA1, анти-CD3/анти-CD19, анти-CD3/MoV18, анти-молекула адгезії клітин нейронів (NCAM)/анти-CD3, анти-фолат-зв'язувальний білок (FBP)/аНТН-CD3, антиантиген, зв'язаний з панкарциномом (AMOC-31)/анти-CD3; BsAb, одне плече яких специфічно зв'язує антиген пухлини, а інше плече зв'язує токсин, такі як анти-сапорин/анти-Id-I, анти-CD22/анти-сапорин, анти-CD7/анти-сапорин, анти-CD38/анти-сапорин, анти-CEA/анти-ланцюг А риніну, антиінтерферон-α(IPM-α)/антигібридома ідіотип, анти-CEA/антиалкалоїд барвінку; BsAb для перетворення проліків, які активуються ферментом, такі як анти-CD30/антилужна фосфатаза (яка каталізує перетворення мітоміцинфосфатних проліків в мітоміциновий спирт); BsAb, які можуть використовуватися як фібринолітичні засоби, такі як антифібрин/антиактиватор тканинного плазміногену (tPA), антифібрин/антиактиватор плазміногену урокіназного типу (uPA); BsAb, спрямовані на імунні комплекси до рецепторів клітинної поверхні, такі як анти-ліпопротеїн низької густини (ЛНГ)/анти-Fc рецептор (наприклад FcγRI, FcγRII або FcγRIII); BsAb для застосування для лікування інфекційних захворювань, такі як анти-CD3/антивірус простого герпесу (HSV), антирецептор Т-клітин:CD3 комплекс/антигрип, анти-FcγR/анти-BIJ; BsAb для визначення пухлини *in vitro* або *in vivo*, такі як анти-CEA/анти-EOTUBE, анти-CEA/анти-DPTA, анти-p185^{HER2}/антигаптен; BsAb як ад'юванти вакцин; і BsAb як

20 діагностичні набори, такі як антикролячий IgG/антиферитин, антипероксидаза хрому (НЯР)/анти-гормон, анти-соматостатин/анти-речовина Р, анти-HRP/анти-FITC, анти-CEA/анти-β-галактозидаза. Прикладами триспецифічних антитіл є анти-CD3/анти-CD4/анти-CD37, анти-CD3/анти-CD5/анти-CD37 й анти-CD3/анти-CD8/анти-CD37. Біспецифічні антитіла можуть бути отримані у вигляді повнорозмірних антитіл або фрагментів антитіл (наприклад P(ab')₂-біспецифічні антитіла).

Способи створення біспецифічних антитіл відомі в даній галузі. Загальноприйняте одержання повнорозмірних біспецифічних антитіл засновано на спільній експресії двох пар важких і легких ланцюгів імуноглобуліну, де обидва ланцюги мають різну специфічність (Millstein та ін., Nature, 305:537-539 (1983)). Через випадковий набір важких і легких ланцюгів імуноглобуліну, ці гібридами (квадроми) потенційно можуть продукувати суміш із 10 різних молекул антитіл, з яких тільки одна має правильну біспецифічну структуру. Очищення правильної молекули, яке звичайно здійснюють у декілька стадій за допомогою афінної хроматографії, є досить трудомістким, а вихід продукту - низьким. Аналогічні підходи описані в WO 93/08829, і в Trautnecker та ін., EMBOJ., 10:3655-3659 (1991).

Відповідно до іншого підходу, варіабельні домени антитіла з необхідною специфічністю зв'язування (антигензв'язувальні центри антитіла) зливають із послідовностями константного домену імуноглобуліну. Злиття переважно здійснюють із константним доменом важкого ланцюга імуноглобуліну, який включає принаймні частину шарнірної ділянки, CH2 й CH3 ділянки. Переважно, щоб принаймні в одному зі злиттів була присутня перша константна ділянка важкого ланцюга (CH1), яка містить сайт, необхідний для зв'язування легкого ланцюга. ДНК, які кодують злитий важкий ланцюг імуноглобуліну й, при необхідності, легкий ланцюг імуноглобуліну, вбудовують у різні експресійні вектори й ними спільно трансфектують прийнятний організм-хазяїн. Це забезпечує більшу гнучкість у підборі загальних пропорцій трьох поліпептидних фрагментів у варіантах, коли в конструкції використовують нерівні співвідношення трьох поліпептидних ланцюгів з метою оптимізації виходу. Однак можна також вбудовувати кодувальні послідовності двох або навіть всіх трьох поліпептидних ланцюгів в один експресійний вектор, коли експресія принаймні двох поліпептидних ланцюгів у рівних пропорціях забезпечує найбільший вихід або коли співвідношення не мають вирішального значення.

У переважному варіанті здійснення вказаного підходу, біспецифічні антитіла являють собою гібрид важкого ланцюга імуноглобуліну, який забезпечує першу специфічність зв'язування в

одному плечі, і гібрид пари важкий ланцюг-легкий ланцюг імуноглобуліну (який забезпечує другу специфічність зв'язування) в іншому плечі. Було виявлено, що ця асиметрична структура полегшує відділення необхідної біспецифічної молекули від небажаних комбінацій ланцюгів імуноглобуліну, оскільки присутність легкого ланцюга імуноглобуліну тільки в одній половині біспецифічної молекули полегшує розділення. Цей підхід описаний у заявці WO 94/04690. Додатковий докладний опис одержання біспецифічних антитіл див., наприклад, в Suresh та ін., *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986). Відповідно до іншого підходу, описаному в заявці WO 96/27011, можна сконструювати ділянку контакту між парою молекул антитіл для підвищення до максимального рівня процентного вмісту гетеродимерів, які одержують із культури рекомбінантних клітин. Переважна ділянка контакту включає принаймні частину C_H3-домену константного домену антитіла. Відповідно до цього способу, одну або декілька амінокислот з невеликими боковими ланцюгами з ділянки контакту першої молекули антитіла заміняють на молекули з більшими боковими ланцюгами (наприклад на тирозин або триптофан). Врівноважуючі "порожнини", які ідентичні або близькі за розмірами до великого(их) бокового(их) ланцюга(ів) створюють в ділянці контакту другої молекули антитіла шляхом заміни молекул амінокислот з великими боковими ланцюгами на амінокислоти з меншими боковими ланцюгами (наприклад на аланін або треонін). Це забезпечує механізм, який сприяє підвищенню виходу гетеродимеру відносно інших небажаних побічних продуктів, таких як гомодимери.

Біспецифічні антитіла включають перехресно-зшиті антитіла або "гетерокон'югати". Наприклад, одне з антитіл у гетерокон'югаті може бути зшите з авідином, а інше з біотином. Такі антитіла можна використовувати, наприклад, для спрямованого перенесення клітин імунної системи до небажаних клітин (патент US 4,676,980) і для лікування ВІЛ-інфекції (WO 91/00360, WO 92/200373, і EP 03089). Гетерокон'югати антитіл можна створювати за допомогою підходящих методів перехресного зшивання. Підходящі агенти для перехресного зшивання добре відомі з рівня техніки й описані в патенті US 4,676,980, поряд з методиками перехресного зшивання.

Методи одержання біспецифічних антитіл із фрагментів антитіл також описані в літературі. Наприклад, біспецифічні антитіла можна одержувати за допомогою хімічного зв'язування. Brennan та ін., *Science*, 229: 81 (1985) описали методику, відповідно до якої інтактні антитіла піддають протеолітичному розщепленню, одержуючи P(ab')₂-фрагменти. Ці фрагменти відновлюють у присутності агента, який утворює комплекси з дитіолом, такого як арсеніт натрію, для стабілізації сусідніх дитіолів і запобігання утворенню міжмолекулярних дисульфідних зв'язків. Отримані Fab'-фрагменти потім перетворюють у похідні тіонітробензоату (TNB). Одне з Fab'-TNB-похідних потім повторно перетворюють в Fab'-тіол шляхом відновлення меркаптоетиламіном і змішують із еквімолярною кількістю іншого Fab'-TNB-похідного, одержуючи біспецифічне антитіло. Отримані біспецифічні антитіла можна застосовувати як агенти для вибіркої іммобілізації ферментів.

Досягнутий зараз прогрес дозволяє полегшувати безпосереднє виділення Fab'-SH-фрагментів з *E. coli*, які можна хімічно зшивати з утворенням біспецифічних антитіл. Shalaby та ін., *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992) описали одержання P(ab')₂-фрагменту молекули повністю гуманізованого біспецифічного антитіла. Кожен Fab'-фрагмент окремо секретувався з *E. coli* і його піддавали безпосередньому хімічному зв'язуванню *in vitro* з одержанням біспецифічного антитіла. Отримане в такий спосіб біспецифічне антитіло мало здатність зв'язуватися із клітинами, для яких характерна понадекспресія рецептора VEGF, і зі звичайними Т-клітинами людини, а також стимулювати літичну активність цитотоксичних лімфоцитів людини, мішенню яких є пухлина молочної залози людини.

Описані також різні методи одержання й виділення фрагментів біспецифічних антитіл безпосередньо з культури рекомбінантних клітин. Наприклад, біспецифічні антитіла одержували за допомогою лейцинових «застібок-блискавок». Kostelny та ін., *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992). Пептиди лейцинових «застібок-блискавок» з білків Fos й Jun зв'язували з Fab'-фрагментами двох різних антитіл шляхом злиття генів. Гомодимери антитіл відновлювали в шарнірній ділянці з одержанням мономерів, а потім повторно окислювали, одержуючи гетеродимери антитіл. Цей спосіб також модно застосовувати для одержання гомодимерів антитіл. Технологія на основі "діатил", описана Hollinger та ін., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993), забезпечує інший механізм одержання фрагментів біспецифічних антитіл. Фрагменти містять варіабельний домен важкого ланцюга (V_H), зв'язаний з варіабельним доменом легкого ланцюга (V_L) за допомогою лінкера, який є занадто коротким для того, щоб дозволити відбутися спарюванню двох доменів одного й того ж ланцюга. Таким чином, V_H- і V_L-домени одного фрагмента повинні спарюватися з комплементарними V_L- і V_H-доменами іншого фрагмента, утворюючи тим самим дві антиген-зв'язувальні ділянки. Описана також інша

стратегія одержання фрагментів біспецифічних антитіл, заснована на застосуванні одноланцюгових Fv (sFv) димерів. Див. Gruber та ін., J. Immunol, 152:5368 (1994).

Під обсяг винаходу підпадають також антитіла, які мають більше двох валентностей. Наприклад, можна одержувати триспецифічні антитіла. Tutt та ін. J. Immunol 147:60 (1991).

5 (vii) Конструювання ефекторної функції.

Може виявитися бажаним модифікувати антитіло за винаходом відносно його ефекторної функції, наприклад, для того, щоб підвищити ефективність антитіла для лікування злоякісного новоутворення. Наприклад, можна вводити один або більше залишків цистеїну в Fc-ділянку, що приводить до утворення в цій ділянці дисульфідного зв'язку між ланцюгами. Отримане в такий спосіб гомодимерне антитіло може мати поліпшену здатність до інтерналізації та/або підвищену комплемент-опосередковану цитотоксичність або й антитіло-обумовлену клітинозалежну цитотоксичність (ADCC). Див. Сагон та ін., J. Exp Med. 176:1191-1195 (1992) і Shopes, B. J. Immunol. 148:2918-2922 (1992). Гомодимерні антитіла з підвищеною протипухлинною активністю також можуть бути отримані за допомогою гетеробіфункціональних крос-лінкерів, відповідно до методики, описаної в Wolff та ін. Cancer Research 53:2560-2565 (1993). Альтернативно, можна сконструювати антитіло, що має подвоєну кількість Fc-ділянок, яке внаслідок цього може мати підвищену здатність до комплемент-залежного лізису й ADCC. Див. Stevenson та ін. Anti-Cancer Drug Design 3:219-230 (1989).

(viii) Імунокон'югати.

20 Винахід також стосується імунокон'югатів, які містять антитіло, як описано в даному винаході, кон'юговане із цитотоксичним засобом, таким як хіміотерапевтичний засіб, токсином (наприклад токсином, який має ферментативну активність, бактеріального, грибного, рослинного або тварини походження, або його фрагментами), або радіоактивним ізотопом (тобто радіоактивний кон'югат).

25 Хіміотерапевтичні засоби, які прийнятні для одержання таких імунокон'югатів, уже були описані вище. Токсини, які мають ферментативну активність, і їх фрагменти, які можуть застосовуватися, включають ланцюг А дифтерії, незв'язані активні фрагменти дифтерійного токсину, ланцюг А ендотоксину (з *Pseudomonas aeruginosa*), ланцюг А рицину, ланцюг А абрину, ланцюг А модецину, альфа-сакрин, білки *Aleurites fordii*, діантинові білки, білки *Phytolacca americana* (PAPI, PAPП, і PAP-S), інгібітор *momordica charantia*, курцин, кротин, інгібітор *saponaia officinalis*, гелонін, мітогелін, рестриктоцин, феноміцин, еноміцин і трихотецени. Для одержання радіоактивних кон'югатів антитіл придатні різні радіонукліди. Їх прикладами є ²¹²Bi, ¹³¹I, ¹³¹In, ⁹⁰Y й ¹⁸⁶Re.

35 Кон'югати антитіла й цитотоксичного засобу одержують за допомогою різних біфункціональних білкових зшиваючих агентів, таких як N-сукцинімідил-3-(2-піридилдитіол) пропіонат (SPDP), імінотіолан (IT), біфункціональні похідні складних імідоефірів (такі як диметиладипімідат HCL), активних складних ефірів (такі як дисукцинімідилсуберат), альдегіди (такі як гутаральдегід), біс-азидо сполуки (такі як біс (і-азидобензоїл) гександіамін), похідні біс-діазонію (такі як біс-(і-діазонійбензоїл)-етилендіамін), діізоціанати (такі як толуол 2,6-діізоціанат), і біс-активні сполуки фтору (такі як 1,5-дифтор-2,4-динітробензол). Наприклад, імунотоксин рицину може бути отриманий, як описано в Vitetta та ін. Science 238: 1098 (1987). 1-Ізотіоціанатобензил-3-метилдіетилентриамінпентаоцтова кислота, мічена ¹⁴C (MX-DTPA), являє собою типовий хелатуючий засіб для кон'югації радіонуклеотиду з антитілом. Див. WO 94/11026.

45 В іншому варіанті здійснення винаходу, антитіло може бути кон'юговане з "рецептором" (таким як стрептавідин) для використання для попереднього націлювання на пухлину, при цьому кон'югат антитіло-рецептор вводять пацієнтові, а потім видаляють незв'язаний кон'югат із кровообігу за допомогою очищаючого засобу, і після цього вводять "ліганд" (наприклад, авідин), який кон'югований із цитотоксичним засобом (наприклад, з радіонуклеотидом).

(ix) Імуноліпосоми.

50 Антитіло, розкрите в даному винаході, також може бути приготовлене у вигляді імуноліпосом. Ліпосоми, які містять антитіло, одержують за допомогою способів, відомих з рівня техніки, таких як описані в Epstein та ін., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688 (1985); Hwang та ін., Proc. Natl Acad. Sci. USA, 77:4030 (1980); і патентах US 4,485,045 й 4,544,545. Ліпосоми зі збільшеним часом циркуляції в дахи розкриті в патенті US 5,013,556.

55 Особливо переважні ліпосоми можуть бути отримані методом обернено-фазового випарювання композиції ліпідів, яка містить фосфатидилхолін, холестерин і фосфатидилетаноламін, модифікований поліетиленгліколем (PEG-PE). Ліпосоми пропускають через фільтри із заданим розміром пор, одержуючи ліпосоми потрібного діаметра. Fab'-фрагменти антитіла згідно із даним винаходом можуть бути кон'юговані з ліпосомами, як описано в Martin та ін. J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982), за допомогою реакції утворення

міжланцюгових дисульфідних зв'язків. Ліпосома необов'язково може містити хіміотерапевтичний засіб (таке як доксорубіцин). Див. Gabizon та ін. J. National Cancer /nsf.81(19)1484 (1989).

(x) Антитіло-залежне опосередковане ферментом лікування проліками (ADEPT).

Антитіло згідно із даним винаходом також може застосовуватися в ADEPT шляхом кон'югування антитіла з ферментом, який активує проліки і перетворює проліки (наприклад пептидильним хіміотерапевтичним засобом, див. WO 81/01145) в активний протипухлинний лікарський засіб. Див, наприклад, заявку WO 88/07378 і патент US 4,975,278.

Фермент, який є компонентом імунокон'югата, придатним для ADEPT, включає будь-який фермент, здатний активувати проліки, перетворюючи їх в більш активну, цитотоксичну форму.

Ферменти, які можуть бути використані в способі згідно із даним винаходом, включають, не обмежуючись тільки ними, лужну фосфатазу, здатну перетворювати фосфатвмісні проліки у вільні ліки; арилсульфатазу, здатну перетворювати сульфатвмісні проліки у вільні ліки; деаміназу цитозину, здатну перетворювати нетоксичний 5-фторцитозин у протираковий лікарський засіб, 5-фторурацил; протеази, такі як протеаза *Serratia*, термолізін, субтилізін, карбоксипептидази й катепсини (такі як катепсини B й L), які здатні перетворювати пептидвмісні проліки у вільні ліки; D-аланілкарбоксипептидази, здатні перетворювати проліки, які містять D-амінокислотні замісники; ферменти, які розщеплюють вуглеводні, такі як β -галактозидаза й нейрамінідаза, здатні перетворювати глікозильовані проліки у вільні ліки; β -лактамаза, здатна перетворювати ліки, модифіковані за допомогою β -лактамів, у вільні ліки; і пеніцилінамідази, такі як пеніцилін V амідаза або пеніцилін G амідаза, які перетворюють ліки, модифіковані за азотом аміногруп за допомогою феноксиацетильних або фенілацетильних груп, відповідно, у їх вільні ліки. Альтернативно, антитіла з ферментативною активністю, також відомі з рівня техніки як "абзими", можуть використовуватися для перетворення проліків відповідно до винаходу у вільні активні ліки (див., наприклад, Massey, Nature 328: 457-458 (1987)). Кон'югати антитіла з абзимом, які використовуються для доставки абзиму до популяції пухлинних клітин, можуть бути отримані, як розкрито в даному винаході.

Ферменти згідно із даним винаходом можуть бути ковалентно зв'язані з антитілом за допомогою методик, добре відомих у даній галузі, наприклад, при використанні гетеробіфункціональних перехресно-зшиваючих реагентів, описаних вище. Альтернативно, за допомогою добре відомої технології рекомбінантних ДНК можуть бути отримані білки злиття, які містять принаймні антигензв'язувальну ділянку антитіла відповідно до даного винаходу, з'єднану принаймні з функціонально активною ділянкою ферменту відповідно до даного винаходу (див., наприклад, Neuberger та ін., Nature, 312: 604-608 (1984)).

(xi) Злиття антитіла з епітопом-«рятувальником», що зв'язується з рецептором.

У певних варіантах здійснення винаходу, може бути бажаним використовувати фрагмент антитіла, який відрізняється від фрагмента інтактного антитіла, наприклад, для підвищення проникнення в пухлину. У цьому випадку може бути бажаним модифікувати фрагмент антитіла для підвищення часу напівжиття в сироватці. Цього можна досягти, наприклад, шляхом введення у фрагмент антитіла епітопу-«рятувальника», який зв'язується з рецептором (наприклад шляхом мутації підходящої ділянки у фрагменті антитіла або шляхом включення епітопу в мічений пептид, який потім зливають із фрагментом антитіла на будь-якому кінці або в середині, наприклад, за допомогою синтезу ДНК або пептиду).

Епітоп-«рятувальник», який зв'язується з рецептором, переважно знаходиться в ділянці, у якій будь-який один або декілька амінокислотних залишків з однієї або двох петель Fc-домену перенесені в аналогічні ділянки фрагмента антитіла. Більш переважно, здійснюють перенос трьох і більше залишків з однієї або двох петель Fc-домену. Найбільш переважно, епітоп беруть із CH2-домену Fc-ділянки (наприклад, IgG) і переносять в CH1, CH3 або VH-ділянку або більше ніж одна таку ділянку антитіла. Альтернативно, епітоп беруть із CH2-домену Fc-ділянки й переносять в CL-ділянку або VL-ділянку фрагмента антитіла, або в обидві цих ділянки.

(xii) Інші ковалентні модифікації антитіла.

Ковалентні модифікації антитіла підпадають під обсяг даного винаходу. їх можна здійснювати шляхом хімічного синтезу або шляхом ферментативного або хімічного розщеплення антитіла, якщо це є придатним. Інші типи ковалентних модифікацій у молекулі антитіла здійснюють шляхом взаємодії амінокислотних залишків-мішеней антитіла з органічним дериватизуючим засобом, здатним взаємодіяти з вибраними боковими ланцюгами або N- або C-кінцевими залишками.

Цистеїнільні залишки в більшості випадків взаємодіють із α -галоацетатами (і відповідними амінами), такими як хлороцтова кислота або хлорацетамід, з утворенням карбоксиметильних або карбоксамідометильних похідних. Цистеїнільні залишки також піддаються реакції із бромтрифторацетоном, α -бром- β -(5-імідозол)пропіоновою кислотою, хлорацетилфосфатом, N-

алкілімідами малеїнової кислоти, 3-нітро-2-піридилдисульфідом, метил 2-піридилдисульфідом, n-хлормеркурібензоатом, 2-хлормеркурі-4-нітрофенолом, або хлор-7-нітробензо-2-окса-1,3-діазолом.

Гістидильні залишки можуть піддаватися взаємодії з діетилпірокарбонатом при рН 5,5-7,0, оскільки цей реагент відносно специфічний до бокового ланцюга гістидилу. Також є придатним парабромфенацилбромід; взаємодію з яким переважно здійснюють в 0,1 М какодилаті натрію при рН 6,0.

Лізинильні й амінокінцеві залишки піддаються реакції з ангідридом янтарної кислоти або ангідридами інших карбонових кислот. Утворення похідних при взаємодії із цими реагентами викликає зміну заряду лізинільних залишків на протилежний. Іншими підходящими реагентами для одержання похідних залишків, які містять α -аміногрупи, є складні імідоефіри, такі як метилпіколінімідат, піридоксаль фосфат, піридоксаль, хлорборогідрид, тринітробензолсульфонова кислота, О-метилізоасечовина, 2,4-пентандіон, і взаємодія із гліоксилатом, яка каталізується трансаміназою.

Аргінільні залишки можна модифікувати шляхом взаємодії з одним або декількома звичайними реагентами, такими як фенілгліоксаль, 2,3-бутандіон, 1,2-циклогександіон і нінгідрин. Для одержання похідних залишків аргініну реакцію необхідно здійснювати в лужних умовах у зв'язку з високим значенням pK_a функціональної гуанідинової групи. Крім того, ці реагенти можуть взаємодіяти із групами лізину, а також з епсилон-аміногрупою аргініну.

Також можна специфічно модифікувати залишки тирозилу, особливий інтерес представляє введення спектральних міток у залишки тирозилу шляхом взаємодії з ароматичними діазонієвими сполуками або тетранітрометаном. У більшості випадків використовують N-ацетилімізолід і тетранітрометан для одержання О-ацетил тирозильних похідних й 3-нітро-похідних, відповідно. Залишки тирозилу можуть бути йодовані за допомогою I або I₂ для одержання радіоактивно мічених білків, які застосовуються для радіоімунаналізу.

Бокові карбоксильні групи (аспартил або глутаміл) селективно модифікують шляхом взаємодії з карбодіімідами ($R-N=C=N-R$), у яких R й R' являють собою різні алкільні групи, такими як 1-циклогексил-3-(2-морфолініл-4-етил) карбодіімід або 1-етил-3-(4-азоніа-4,4-диметилфеніл) карбодіімід. Крім того, аспартильні й глутамільні залишки перетворюються в аспартильні й глутамінільні залишки шляхом взаємодії з іонами амонію.

Глутамінільні й аспарагінільні залишки часто піддаються деамідуванню з утворенням глутамільних й аспартильних залишків, відповідно. Ці залишки піддаються деамідуванню в нейтральних або лужних умовах. Деамідовані форми цих залишків підпадають під обсяг даного винаходу.

Інші модифікації включають гідроксилування проліну й лізину, фосфорилювання гідроксильних груп серильних або треонільних залишків, метилування α -аміногруп бокових ланцюгів лізину, аргініну й гістидину (T.E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, стор. 79-86 (1983)), ацетилювання N-кінцевого аміну й амідування будь-якої C-кінцевої карбоксильної групи.

Інші типи ковалентних модифікацій включають хімічне або ферментативне зв'язування глікозидів з антитілом. Ці методики мають ту перевагу, що для них не потрібне одержання антитіла в клітині-хазяїні, яка має потенційні можливості глікозилювання для N- або О-зв'язаного глікозилювання. Залежно від застосовуваного способу зв'язування цукор(и) може(уть) приєднуватися до (а) аргініну й гістидину, (б) вільних карбоксильних груп, (в) вільних сульфгідрильних груп, таких як сульфгідрильні групи цистеїну, (г) вільних гідроксильних груп, таких як гідроксильні групи серину, треоніну або гідроксипроліну, (д) ароматичних залишків, таких як залишки фенілаланіну, тирозину або триптофану, або (е) амідної групи глутаміну. Ці способи описані в заявці WO 87/05330, опублікованій 11 вересня 1987, і в Aplin й Wriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, стор. 259-306 (1981).

Видалення будь-яких вуглеводневих частин, які містить антитіло, можна здійснювати хімічно або ферментативно. Для хімічного деглікозилювання антитіла слід піддавати реакції із сполукою трифторметансульфонової кислоти або еквівалентною сполукою. Така обробка приводить до відщеплення більшості або всіх цукрів, крім зв'язувального цукру (N-ацетилглюкозаміну або N-ацетилгалактозаміну), тоді як антитіло залишається інтактним. Хімічне деглікозилювання описане Hakimuddin, і ін. *Arch. Biochem. Biophys.* 259:52 (1987) і Edge та ін. *Anal. Biochem.*, 118:131 (1981). Ферментативне відщеплення вуглеводневих частин антитіла можна здійснювати за допомогою різних ендо- і екзо-глікозидаз, як описано Thotakura та ін. *Meth. Enzymol.* 138:350 (1987).

Інші види ковалентної модифікації антитіла включають зв'язування антитіла з одним з різних небілкових полімерів, наприклад поліетиленгліколем, поліпропіленгліколем або

поліоксіалкіленами, за допомогою способу, описаного в патентах US 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192 або 4,179,337.

Б. Вектори, клітин и-хазяї й методи рекомбінації.

5 Анти-VEGF антитіло за винаходом може бути отримане рекомбінантно, за допомогою методик і матеріалів, доступних з рівня техніки.

Для рекомбінантного одержання анти-VEGF антитіла виділяють нуклеїнову кислоту, яка його кодує, і вбудовують у здатний до реплікації вектор для подальшого клонування (ампліфікація ДНК) або для експресії. ДНК, яка кодує моноклональне антитіло, можна легко виділяти й секвенувати із використанням загальноприйнятих методик (наприклад, за допомогою олігонуклеотидних зондів, які мають здатність специфічно зв'язуватися з генами, які кодують важкі й легкі ланцюги антитіла). Можна застосовувати різноманітні вектори. Вектори звичайно містять, але не обмежуючись тільки ними, один або декілька наступних компонентів: сигнальну послідовність, сайт ініціації реплікації, один або декілька маркерних генів, енхансер, промотор і термінатор транскрипції.

15 (i) Компонент, який являє собою сигнальну послідовність.

Антитіло згідно із даним винаходом можна одержувати за допомогою рекомбінації не тільки безпосередньо, але також у вигляді поліпептиду, злитого з гетерологічним пептидом, який переважно являє собою сигнальну послідовність або інший поліпептид, який несе специфічний сайт розщеплення на N-кінці зрілого білка або поліпептиду. Вибрана гетерологічна сигнальна послідовність переважно являє собою послідовність, яка розпізнається клітиною-хазяїном і процесується в ній (тобто розщеплюється сигнальною пептидазою). Для прокаріотичних клітин-хазяїв, які не розпізнають й у яких не процесується сигнальна послідовність нативного антитіла, сигнальну послідовність заміняють на прокаріотичну сигнальну послідовність, вибрану, наприклад, із групи, яка включає лужну фосфатазу, пеніциліназу, lpp або лідерні послідовності термостабільного ендотоксину II. Для секреції із дріжджів нативну сигнальну послідовність можна замінювати, наприклад, лідерною послідовністю інвертази дріжджів, лідерною послідовністю α -фактора (включаючи лідерні послідовності α -фактора *Saccharomyces* й *Kluuyveromyces*), або лідерною послідовністю кислої фосфатази, лідерною послідовністю глюкоамілази *C. Albicans* або сигнальною послідовністю, описаною в WO 90/13646. Для експресії в клітинах ссавців можна застосовувати сигнальні послідовності ссавців, а також вірусні секреторні лідерні послідовності, наприклад, сигнальну послідовність вірусу простого герпесу gD.

ДНК такої ділянки-попередника вбудовують шляхом лігування в рамку зчитування ДНК, яка кодує антитіло.

35 (ii) Компонент, який являє собою сайт ініціації реплікації.

Як експресійні, так і клонувальні вектори містять нуклеїнову кислоту, яка ініціює реплікацію вектора в одній або декількох вибраних клітинах-хазяїнах. Як правило, у клонувальних векторах ця послідовність являє собою послідовність, яка ініціює реплікацію вектора незалежно від хромосомної ДНК хазяїна й включає сайти ініціації реплікації або послідовності, які автономно реплікуються. Такі послідовності добре відомі для різних бактерій, дріжджів і вірусів. Сайт ініціації реплікації із плазміни pBR322 придатний для більшості грамнегативних бактерій, сайт ініціації плазміди 2 μ придатний для дріжджів, а різні вірусні сайти ініціації (SV40, вірус полііоми, аденовірус, VSV або BPV) придатні для клонувальних векторів у клітинах ссавців. Як правило, компонент, який представляє собою сайт ініціації реплікації, не потрібен для експресійних векторів ссавців (сайт ініціації SV40, як правило, застосовують тільки через те, що він містить ранній промотор).

45 (iii) Компонент, який являє собою селектуючий ген.

Експресійні й клонувальні вектори можуть містити селектуючий ген, який також позначається як селектований маркер. Як правило, селектуючі гени кодують білки, які (а) обумовлюють стійкість до антибіотиків або інших токсинів, наприклад ампіциліну, неоміцину, метотрексату або тетрацикліну, (б) доповнюють дефіцит ауксотрофності, або (в) поповнюють поживні речовини, які мають вирішальне значення і які не надходять із комплексних середовищ, наприклад, ген, який кодує D-аланінрацемазу з *Bacilli*.

Один із прикладів схеми селекції заснований на використанні лікарського засобу для припинення росту клітин-хазяїв. Ті клітини, які успішно трансформовані гетерологічним геном, продукують білок, який надає стійкість до лікарського засобу, і в результаті виживають у вказаному режимі селекції. Прикладами таких агентів для домінантної селекції, заснованої на застосуванні лікарських засобів, є неоміцин, мікофенольна кислота й гідроміцин.

60 Прикладами інших прийнятих селектованих маркерів для клітин ссавців є маркери, які дозволяють ідентифікувати клітини, які мають здатність поглинати нуклеїнову кислоту антитіла,

такі як DHFR, тимідинкіназа, металотіонеїн-I й -II, переважно гени металотіонеїну приматів, адеаміназа аденозину, орнітиндекарбоксилаза йт.д.

Наприклад, клітини, трансформовані селектуючим геном DHFR, спочатку ідентифікують шляхом культивування всіх трансформантів у культуральному середовищі, які містять метотрексат (Mtx), конкурентний антагоніст DHFR. Придатною клітиною-хазяїном при застосуванні DHFR дикого типу є лінія клітин китайського хом'ячка (CHO) з дефіцитом активності DHFR.

В альтернативному варіанті клітини-хазяї (насамперед хазяї дикого типу, які містять ендогенний DHFR) трансформовані або спільно трансформовані послідовностями ДНК, які кодують антитіло, білок DHFR дикого типу й інший селектований маркер, такий як аміноглікозид-3'-фосфотрансфераза (APH), можна відбирати шляхом вирощування клітин у середовищі, яке містить селектуючий агент для селектованого маркера, такий як аміноглікозидний антибіотик, наприклад, канаміцин, неоміцин або G418. Див. патент US 4,965,199.

Прийнятний селектуючий ген для застосування в дріжджах являє собою ген *trp1*, який присутній в отриманій із дріжджів плазміді YRp7 (Stinchcomb та ін., *Nature*, 282:39 (1979)). Ген *trp1* є селектуючим маркером для мутантного штаму дріжджів, позбавленого здатності рости в середовищі з додаванням триптофану, наприклад, ATCC № 44076 або PEP4-1. Jones, *Genetics*, 85:12 (1977). Наявність ушкодження *trp1* у геномі дріжджової клітини-хазяїна створює сприятливі умови для виявлення трансформації шляхом вирощування при відсутності триптофану. Аналогічно до цього штами дріжджів з дефіцитом *Leu2* (ATCC 20,622 або 38,626) доповнюються за допомогою відомих плазмід, які несуть ген *Leu2*.

Крім того, вектори, отримані з кільцевої плазмиди pKD1 розміром 1,6 мкм, можна застосовувати для трансформації дріжджів *Kluuyveromyces*. Альтернативно, експресійна система для промислового виробництва рекомбінантного телячого хімозину описана для *K. lactis*. Van den Berg, *Bio/Technology*, 8:135 (1990). Описані також стабільні експресійні вектори з більшою кількістю копій, призначені для забезпечення секреції зрілого рекомбінантного людського сироваткового альбуміну промисловими штамми *Kluuyveromyces*. Fleer та ін., *Bio/Technology*, 9:968-975 (1991).

(iv) Компонент, який представляє собою промотор.

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

Відомі також промоторні послідовності, придатні для еукаріот. Практично всі гени еукаріот мають ділянку з високим вмістом АТ, розташовану на відстані приблизно від 25 до 30 основ проти ходу транскрипції від сайту ініціації транскрипції. Інша послідовність, яка розташована на відстані 70-80 основ від сайту ініціації транскрипції проти ходу транскрипції багатьох генів, являє собою CNCAAT-ділянку, у якій N позначає будь-який нуклеотид. На 3'-кінці більшості еукаріотичних генів знаходиться послідовність AATAAA, яка може бути сигналом для додавання полі-А-хвоста на 3'-кінці кодувальної послідовності. 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 енолаза, гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа, гексокіназа, піруватдекарбоксилаза, фосфофруктокіназа, глюкозо-6-фосфатізомераза, 3-фосфогліцератмутаза, піруваткіназа, тріозофосфатізомераза, фосфоглюкоізомераза й глюккіназа.

Іншими промоторами дріжджів, які являють собою індукційні промотори, які мають додаткову перевагу, зв'язану із транскрипцією, яка контролюється умовами росту, є промоторні ділянки алкогольдегідрогенази 2, ізоцитохрому C, кислої фосфатази, розщеплюючих ферментів, зв'язаних з метаболізмом азоту, металотіонеїну, гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази й ферментів, які відповідають за утилізацію мальтози й галактози. Прийнятні вектори й промотори, які можна застосовувати при експресії в дріжджах, додатково описані в EP 73,657. Із промоторами дріжджів також доцільно застосовувати енхансери дріжджів.

Транскрипцію антитіла з векторів у клітинах ссавців-хазяїв контролюють, наприклад, за допомогою промоторів, отриманих з геномів вірусів, таких як вірус поліоми, вірус віспи птахів, аденовірус (такий як аденовірус 2), вірус папіломи великої рогатої худоби, вірус саркоми птахів,

цитомегаловірус, ретровірус, вірус гепатиту В і найбільш переважно мавпячий вірус 40 (SV40), з гетерологічних промоторів ссавців, наприклад, промотору актину або промотору імуноглобуліну, із промоторів теплового шоку за умови, що такі промотори сумісні із системами клітини-хазяїна.

Ранній і пізній промотори вірусу SV40 зручно одержувати у вигляді рестрикційного фрагмента SV40, який містить також сайт ініціації реплікації вірусу SV40. Дуже ранній промотор цитомегаловірусу людини можна одержувати у вигляді рестрикційного фрагмента HindIII E. Система для експресії ДНК у хазяїв-ссавців за допомогою вірусу папіломи великої рогатої худоби як вектора описана у патенті US 4,419,446. Модифікація цієї системи описана в патенті US 4,601,978. Дані, які стосуються експресії кДНК β-інтерферону людини в клітинах мишей під контролем промотору тимідинкінази вірусу простого герпесу див. також та ін., Nature 297:598-601 (1982). Альтернативно, як промотор можна застосовувати довгий кінцевий повтор вірусу саркоми Рауса.

(v) Компонент, який являє собою енхансер.

Транскрипцію ДНК, яка кодує антитіло згідно із даним винаходом, у вищих еукаріот часто підвищують шляхом вбудовування у вектор енхансерної послідовності. Відомі багато енхансерних послідовностей генів ссавців (генів глобіну, еластази, альбуміну, α-фетопротеїну й інсуліну). Однак, як правило, застосовують енхансер вірусу еукаріотичної клітини. Прикладами є енхансер SV40, розташований на віддаленій стороні сайту ініціації реплікації (пари основ 100-270), енхансер раннього промотору цитомегаловірусу, енхансер поліоми, розташований на віддаленій стороні сайту ініціації реплікації, і енхансери аденовірусів. Елементи, які підсилюють активацію еукаріотичних промоторів, описані також в Yaniv (1982) Nature 297:17-18. Енхансер можна вбудовувати шляхом сплайсингу у вектор у положенні 5' або 3' відносно послідовності, яка кодує антитіло, але переважно його поміщають у сайт, розташований в 5'-напрямку від промотору.

(vi) Компонент, який являє собою термінатор транскрипції.

Експресійні вектори, які використовують в еукаріотичних клітинах-хазяїнах (клітини дріжджів, грибів, комах, рослин, тварин, людей або клітини інших багатоклітинних організмів, які містять ядро), повинні також містити 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 поліаденілованих фрагментів у нетрансльованій ділянці мРНК, яка кодує антитіло. Одним із придатних компонентів, які забезпечують термінацію транскрипції, є ділянка поліаденілування бичачого гормону росту. Див. WO 94/11026 і наведений в цьому документі опис експресійного вектора.

(vii) Відбір і трансформація клітин-хазяїв.

Клітини-хазяї, які можна використовувати для клонування або експресії ДНК у векторах, являють собою описані вище прокаріотичні клітини, клітини дріжджів або клітини вищих еукаріот. Прокаріотичні клітини, які можна застосовувати для цієї мети, включають еубактерії, такі як грамнегативні або грампозитивні мікроорганізми, наприклад, Enterobacteriaceae, такі як Escherichia, наприклад, E. coli, Enterobacter, Erwinia, Klebsiella, Proteus, Salmonella, наприклад, Salmonella typhimurium, Serratia, наприклад, Serratia marcescans, і Shigella, а також Bacilli, такі як B. subtilis й B. licheniformis (наприклад, B. licheniformis 41P описаний в DD 266,710, опублікованої 12 квітня 1989 р.), Pseudomonas, такі як P. aeruginosa, і Streptomyces. Одним із переважних хазяїв для клонування з використанням E. coli є штам E. coli 294 (ATCC 31,446), хоча можна застосовувати також інші штами, такі як E. coli B, E. coli XI776 (ATCC 31,537), і E. coli W3110 (ATCC 27,325). Ці приклади наведені з метою ілюстрації, але ніяким чином не обмежують винахід.

Крім прокаріотичних організмів, як хазяїни для клонування або експресії векторів, які кодують антитіло, можна використовувати еукаріотичні мікроорганізми, такі нитчасті гриби або дріжджі. Найбільш часто застосовуваним нижчим еукаріотичним мікроорганізмом-хазяїном є Saccharomyces cerevisiae або звичайні пекарські дріжджі. Однак широко відомо багато інших родів, видів і штамів, які можна застосовувати як хазяїни відповідно до винаходу, такі як Schizosaccharomyces pombe; Kluyveromyces, наприклад, K. lactis, K. fragilis (ATCC 12,424), K. bulgaricus (ATCC 16,045), K. wickerhamii (ATCC 24,178), K. waltii (ATCC 56,500), K. drosophilum (ATCC 36,906), K. thermotolerans, і K. marxianus; Yarrowia (EP 402,226); Pichia pastoris (EP 183,070); Candida; Trichoderma reesia (EP 244,234); Neurospora crassa; Schwanniomycetes, такі як Schwanniomycetes occidentalis; і нитчасті гриби, такі як, наприклад, Neurospora, Penicillium, Tolypocladium, і Aspergillus, такі як A. nidulans й A. niger.

Клітини-хазяїни які можна використовувати для експресії глікозильованого антитіла, одержують із багатоклітинних мікроорганізмів. Прикладами клітин безхребетних є клітини

рослин і комах. Були виявлені численні бакуловірусні штами й варіанти й відповідні придатні для них як хазяїни клітини комах, таких як *Spodoptera frugiperda* (гусениця), *Aedes aegypti* (комар), *Aedes albopictus* (комар), *Drosophila melanogaster* (плодова муха) і *Bombyx mori* тог. Широко відомі різноманітні штами вірусів, які можна використовувати для трансфекції, наприклад, варіант L-1 *Autographa californica* NPV і штам Bm-5 *Bombyx mori* NPV, і такі віруси можна застосовувати згідно із даним винаходом як віруси, насамперед для трансфекції клітин *Spodoptera frugiperda*. Як хазяїни також можна використовувати культури клітин рослин, таких як бавовник, кукурудза, картопля, соя, петунія, томат і тютюн.

Однак найбільший інтерес представляють клітини хребетних й зараз розмноження клітин хребетних у культурі (культура тканини) стало стандартною методикою. Прикладами придатних як хазяїни ліній клітин ссавців є лінія клітин нирки мавпи CV1, трансформована за допомогою SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); лінія клітин нирки ембріона людини (293 або клітини лінії 293, субклоновані з метою вирощування в суспензійній культурі, Graham та ін., J. Gen Virol. 36:59 (1977)); клітини нирки дитинчати хом'ячка (BHK, ATCC CCL 10); клітини яєчника китайського хом'ячка/-DHFR (CHO, Urlaub та ін., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); клітини Сертолі миші (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); клітини нирки мавпи (CV1 ATCC CCL 70); клітини нирки африканської зеленої мавпи (VERO-76, ATCC CRL-1587); клітини раку шийки матки людини (HELA, ATCC CCL 2); клітини нирки собаки (MDCK, ATCC CCL 34); клітини печінки бичачого щура (BRL 3A, ATCC CRL 1442); клітини легкої людини (W138, ATCC CCL 75); клітини печінки людини (Hep G2, HB 8065); клітини пухлини молочної залози миші (MMT 060562, ATCC CCL51); клітини TRI (Mather та ін., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)); клітини MRC 5; клітини FS4 і лінія клітин гепатоми людини (Hep G2).

Клітини-хазяїни трансформують за допомогою описаних вище експресійних або клонувальних векторів для вироблення антитіла й культивують у придатних живильних середовищах, які відповідним чином модифіковані для індукції промоторів, відбору трансформантів або ампліфікації генів, які кодують необхідні послідовності.

(viii) Культивування клітин-хазяїнів.

Клітини-хазяїни, які використовують для одержання антитіла згідно із даним винаходом, можна культивувати в різних середовищах. Для культивування клітин-хазяїв можна використовувати комерційно доступні середовища, такі як середовище Хама F10 (Sigma), мінімальне підтримуюче середовище ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) і середовище Ігла, модифіковане за способом Дульбеко ((DMEM), Sigma). Крім того, як середовище для культивування клітин-хазяїнів можна використовувати будь-яке із середовищ, описаних в Ham та ін., Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes та ін., Anal. Biochem. 102:255 (1980), патентах US 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655; або 5,122,469; заявках WO 90/03430; WO 87/00195; або патенті US Re. 30,985. Будь-яке із цих середовищ при необхідності можна доповнювати гормонами та/або іншими факторами росту (такими як інсулін, трансферин або фактор росту епідермісу), солями (такими як хлорид і фосфат натрію, кальцію, магнію), буферами (такими як HEPES), нуклеотидами (такими як аденозин і тимідин), антибіотиками (такими як лікарський засіб GENTAMYCIN™), мікроелементами (тобто неорганічними сполуками, які звичайно присутні в кінцевих концентраціях, що знаходяться у мікромолярному діапазоні), і глюкозою або еквівалентним джерелом енергії. Фахівцеві 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 використовувалися раніше для клітин-хазяїнів, вибраних для експресії, і вони повинні бути очевидні фахівцеві в даній галузі.

(ix) Очищення антитіла.

При використанні методів рекомбінації антитіло може продукуватися всередину клітини, у периплазматичний простір й безпосередньо виділятися в середовище. Якщо антитіло продукується всередині клітини, то на першій стадії видаляють дебрис, який складається із частинок або із клітин-хазяїнів, або з лізованих ферментів, наприклад, за допомогою центрифугування або ультрафільтрації. В Carter та ін., Bio/Technology 10:163-167 (1992) описаний метод виділення антитіл, секретованих у периплазматичний простір *E. coli*. Коротко, клітинну масу у вигляді пасти піддають відтаванню в присутності ацетату натрію (pH 3,5), EDTA і фенілметилсульфонілфториду (PMSF) приблизно протягом 30 хвилин. Клітинний дебрис можна видаляти шляхом центрифугування. Якщо антитіло секретується в середовище, то супернатанти таких експресійних систем, як правило, спочатку концентрують за допомогою комерційно доступного фільтра для концентрування білків, наприклад, пристрою для ультрафільтрації типу Amicon або Millipore Pellicon. На будь-якій з вищеописаних стадій можна

додавати інгібітор протеази, такий як PMSF, для інгібування протеолізу, а для запобігання росту небажаних домішок можна додавати антибіотики.

Композицію антитіла, отриману із клітин, можна очищати, наприклад, хроматографією на гідроксилапатитах, гель-електрофорезом, діалізом й афінною хроматографією, при цьому переважним методом очищення є афінна хроматографія. Можливість застосування протеїну А як афінного ліганда залежить від виду й ізотипу будь-якого Fc-домену імуноглобуліну, який присутній в антитілі. Протеїн А можна використовувати для очищення антитіл, основою яких є важкі $\gamma 1$ -, $\gamma 2$ - або $\gamma 4$ -ланцюги людини (Lindmark та ін., J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983)). Протеїн G рекомендується для застосування для всіх мишиних ізотипів й $\gamma 3$ -ланцюга людини (Guss та ін., EMBO J. 5:15671575 (1986)). Як матриця, з якою зв'язується афінний ліганд, найбільш часто застосовують агарозу, однак можна використовувати й інші матриці. Стійкі до механічних впливів матриці, такі як скло або полі(стиролдивініл)бензол з визначеним розміром пор, дозволяють досягати більш високих швидкостей потоку й більш короткого часу процесу в порівнянні з характеристиками, які досягають при використанні агарози. Якщо антитіло містить C_{H3} -домен, то для очищення можна використовувати смоли типу Bakerbond ABX™ (J.T. Baker, Філіпсбург, шт. Нью-Джерсі). Залежно від антитіла, яке підлягає виділенню, можна також застосовувати інші методи очищення білка, такі як фракціонування на іонообмінній колонці, осадження етанолом, ВЕРХ з оберненою фазою, хроматографія на силікагелі, хроматографія на гепарин-SEPHAROSE™ хроматографія на аніоно- або катіонообмінній смолі (наприклад, на колонці з поліаспартамовою кислотою), хроматофокусування, ДСН-ПААГ й осадження сульфатом амонію.

Після будь-якої з попередніх стадій очищення, суміш, яка містить анти-VEGF антитіло й домішки, можна піддавати хроматографії, заснованій на гідрофобній взаємодії, при низькому значенні рН з використанням буфера для елюювання, який має значення рН приблизно від 2,5 до 4,5, хроматографію переважно здійснюють при низьких концентраціях солей (наприклад, з використанням приблизно 0-0,25M солі).

III. Фармацевтичні композиції.

Терапевтичні композиції антитіл, застосовуваних згідно із даним винаходом, готують із метою їх подальшого зберігання шляхом змішування антитіла, яке має необхідний ступінь чистоти, з необов'язковими фармацевтично прийнятними носіями, наповнювачами або стабілізаторами (Remington's Pharmaceutical Sciences 16-е видання, під ред. Osol, A. [1980]), у формі ліофілізованих композицій або водних розчинів. Прийнятні носії, наповнювачі або стабілізатори повинні бути нетоксичними для реципієнтів у використовуваних дозах і концентраціях, і 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 октадецилдиметилбензиламонію; хлорид гексаметонію; хлорид бензалконію, хлорид бензетонію; фенол, бутиловий або бензиловий спирт; алкілпарабени, такі як метил- або пропілпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол і м-крезол); поліпептиди з низькою молекулярною масою (які містять приблизно менше 10 залишків); білки, такі як сироватковий альбумін, желатин або імуноглобуліни; гідрофільні полімери, такі як полівінілпіролідон; амінокислоти, такі як гліцин, глютамін, аспарагін, гістидин, аргінін або лізин; моносахариди, дисахариди й інші вуглеводні, включаючи глюкозу, манозу або декстрини; хелатуючі агенти, такі як EDTA; цукри, такі як сахароза, маніт, трегалоза або сорбіт; солеутворюючі протиіони, такі як натрій; комплекси, які містять метал (наприклад, комплекси Zn-протеїн); і/або неіоногенні поверхнево-активні речовини, такі як TWEEN™, PLURONICS™ або поліетиленгліколь (ПЕГ). Переважні композиції, які містять ліофілізоване анти-VEGF антитіло, описані в заявці WO 97/04801, яка повністю включена в даний опис як посилання.

Композиція, запропонована у винаході, також може містити більше однієї активної речовини, якщо це необхідно для конкретного показання, яке підлягає лікуванню, переважно речовини з додатковими видами активності, які не виявляють негативного впливу одна на одну. Наприклад, може виявитися бажаним додатково включати в одну композицію антитіла, які зв'язують EGFR, VEGF (наприклад, антитіло, яке зв'язує інший епітоп на VEGF), VEGFR, або ErbB2 (наприклад, Herceptin®). Альтернативно або додатково, композиція може містити цитотоксичний засіб, цитокін, засіб, який інгібує ріст, та/або невелику молекулу антагоніста VEGFR. Такі молекули в комбінації підходяще знаходяться у кількостях, які ефективні для впливу на вказане показання.

Діючі речовини також можна включати в мікрокапсули, отримані, наприклад, за допомогою методів коацервації або міжфазної полімеризації, наприклад, у гідроксиметилцелюлозні або желатинові мікрокапсули й полі-(метилметакрилатні) мікрокапсули, відповідно, у колоїдні системи доставки лікарського засобу (наприклад, ліпосоми, альбумінові мікросфери,

мікроемульсії, наночастинки й нанокапсули) або в макроемульсії. Такі методики описані в Remington's Pharmaceutical Sciences 16-е видання, під ред Osol, A. (1980).

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

Можна готувати композиції із пролонгованим вивільненням. Прийнятні приклади композицій із пролонгованим вивільненням включають напівпроникні матриці із твердих гідрофобних полімерів, які містять антитіло, при цьому матриці можуть являти собою продукт, який має певну форму, наприклад, плівки або мікрокапсули. Приклади матриць, які можна використовувати для пролонгованого вивільнення, включають поліефіри, гідрогелі (наприклад, полі(2-гідроксіетил-метакрилат) або полівініловий спирт)), полілактиди (патент US 3,773,919), співполімери L-глутамінової кислоти й γ етил-L-глутамату, нерозкладні співполімери етилену й вінілацетату, розкладні співполімери молочної кислоти й гліколевої кислоти, такі як LUPRON DEPOT™ (призначені для ін'єкції мікросфери, які складаються із співполімеру молочної кислоти й гліколевої кислоти й ацетату лейпроліду), і полі-D-(-)-3-гідроксимасляну кислоту. Тоді як полімери, як етилен-вінілацетат, молочна кислота-гліколева кислота, придатні для вивільнення молекул протягом періоду часу, який перевищує 100 днів, певні гідрогелі вивільняють білки протягом більш короткого періоду часу. Якщо інкапсульовані антитіла залишаються в організмі протягом тривалого часу, то вони можуть денатурувати або агрегувати у результаті дії вологості при 37°C, що приводить до втрати біологічної активності й можливих змін імуногенності. Для стабілізації можуть бути розроблені раціональні стратегії, залежно від задіяного механізму. Наприклад, якщо агрегація відбувається в результаті утворення міжмолекулярного зв'язку S-S шляхом тіо-дисульфідного обміну, то для стабілізації можна модифікувати сульфгідрильні залишки, ліофілізувати із кислих розчинів, контролювати вміст вологи за допомогою підходящих добавок, і розробляти специфічні композиції на основі полімерів.

IV. Терапевтичне застосування анти-VEGF антитіл.

Передбачається, що відповідно до даного винаходу, анти-VEGF антитіла можуть застосовуватися для лікування різних пухлинних або непухлинних станів, які характеризуються патологічним ангіогенезом. Непухлинні стани, які піддаються лікуванню, включають ревматоїдний артрит, псоріаз, атеросклероз, діабетичну й інші проліферативні ретинопатії, включаючи ретинопатію недоношених, ретролентальну фіброплазію, неоваскулярну глаукому, дегенерацію жовтої плями, зв'язану зі старінням, гіперплазію щитовидної залози (включаючи дифузійний тиреотоксичний зоб), пересадку рогівки й інших тканин, хронічне запалення, запалення легень, нефротичний синдром, прееклампсію, асцити, випіт у порожнину перикарда (такий як зв'язаний з перикардитом) і плевральний випіт.

Антитіла за винаходом переважно застосовуються для лікування пухлин, для яких ангіогенез відіграє важливу роль у процесі росту, включаючи злоякісні новоутворення й доброякісні пухлини. Прикладами злоякісних новоутворень для лікування згідно із даним винаходом є, але не обмежуючись тільки ними, карцинома, лімфома, бластома, саркома й лейкоз. Більш переважні приклади таких злоякісних новоутворень включають плоскоклітинний рак, рак легені (включаючи дрібноклітинний рак легені, недрібноклітинний рак легені, аденокарциному легені й плоскоклітинний рак легені), рак очеревини, печінковоклітинний рак, рак шлунка (включаючи шлунково-кишковий рак), рак підшлункової залози, гліобластоми, рак шийки матки, рак яєчників, рак печінки, рак сечового міхура, гепатому, рак молочної залози, рак ободової кишки, колоректальний рак, рак ендометрію або матки, рак слинної залози, рак нирки, рак печінки, рак передміхурової залози, рак піхви, рак щитовидної залози, рак гепатоцитів і різні типи раку голови й шиї, а також В-клітинну лімфому (включаючи низькодиференційовану/фолікулярну не-ходжкінську лімфому (НХЛ); дрібнолімфоцитну (ДЛ) НХЛ; середньодиференційовану/фолікулярну НХЛ; середньодиференційовану дифузійну НХЛ; високодиференційовану імунобластну НХЛ; високодиференційовану лімфобластну НХЛ; високодиференційовану небластомерноклітинну НХЛ; недиференційовану НХЛ; лімфому клітин кори головного мозку; лімфому, зв'язану зі СНІДом; і макроглобулінемію Уолденстрема); хронічний лімфолейкоз (ХЛЛ); гострий лімфобластний лейкоз (ОЛЛ); лейкоз ворсинчастих клітин; хронічний мієлобластний лейкоз; і посттрансплантаційний лімфопроліферативний розлад (ПТЛР), а також атипову судинну проліферацію, зв'язану з факіоматозом, набряк (такий як набряк, зв'язаний з пухлинами головного мозку), і синдром Мейгса. Більш переважно, злоякісні новоутворення, які піддаються лікуванню антитілами за винаходом, включають рак молочної залози, колоректальний рак, рак прямої кишки, недрібноклітинний рак легені, неходжкінську лімфому (НХЛ), рак нирки, рак передміхурової залози, рак печінки, рак підшлункової залози, саркому м'яких тканин, саркому Капоши, карциноїдну пухлину, рак голови

й шиї, меланому, рак яєчників, мезотеліому й множинну мієлому. Більш переважно, способи відповідно до винаходу застосовують для лікування колоректального раку в людини.

Даний винахід охоплює антиангіогенну терапію, нову стратегію лікування злоякісного новоутворення, націлену на інгібування розвитку кровоносних судин пухлини, які необхідні для доставки поживних речовин для підтримання росту пухлини. Оскільки ангіогенез залучений як у ріст первинних пухлин, так і метастазів, то антиангіогенна терапія відповідно до винаходу здатна викликати інгібування росту пухлини як у первинній ділянці, так і запобігати метастазуванню пухлин у вторинні ділянки, що надає можливість руйнувати пухлину за допомогою інших терапевтичних засобів.

Комбіноване лікування.

Передбачається, при застосуванні для лікування різних захворювань, таких як пухлини, антитіла за винаходом можуть використовуватися в комбінації з іншими терапевтичними засобами, придатними для лікування таких же або подібних захворювань. При застосуванні для лікування злоякісного новоутворення антитіла згідно із даним винаходом можуть використовуватися в комбінації зі звичайними видами лікування раку, такими як хірургія, променева терапія, хіміотерапія або їх сполучення.

У певних варіантах здійснення, інші терапевтичні засоби, придатні для комбінованої протиракової терапії разом з антитілом за винаходом, включають інші антиангіогенні засоби. У даній галузі ідентифіковано й відомо багато антиангіогенних засобів, включаючи ті, які наведені в Carmeliet й Jain (2000). Переважно, анти-VEGF антитіло відповідно до винаходу застосовується в комбінації з іншим VEGF антагоністом або антагоністом рецептора VEGF, таким як VEGF варіанти, розчинні фрагменти рецептора VEGF, аптамери, здатні блокувати VEGF або VEGFR, нейтралізуючі анти-VEGFR антитіла, інгібітори тирозинкіназ VEGFR з низькою молекулярною масою і їх будь-які комбінації. Альтернативно або додатково, пацієнтові можна спільно вводити два або більше анти-VEGF антитіл.

В інших варіантах здійснення винаходу, інші терапевтичні засоби, придатні для комбінованого лікування пухлин разом з антитілом за винаходом, включають антагоніст інших факторів, залучених у ріст пухлин, такий як EGFR, ErbB2 (також відомий як Her2) ErbB3, ErbB4 або TNF. У деяких випадках також може здійснювати сприятливий вплив введення пацієнтові одного або декількох цитокінів. У переважному варіанті здійснення винаходу, VEGF антитіло вводять спільно із засобом, який інгібує ріст. Наприклад, спочатку можна вводити засіб, який інгібує ріст, а після нього вводити VEGF антитіло. Крім того, підходящим є одночасне введення або введення спочатку VEGF антитіла. Підходящими дозами для засобів, які інгібують ріст, є дози, застосовувані в цей час, або вони можуть бути знижені внаслідок комбінованої дії (синергізму) засобу, який інгібує ріст, і анти-VEGF антитіла.

Хіміотерапевтичні засоби.

У певних варіантах здійснення, даний винахід забезпечує спосіб лікування злоякісного новоутворення шляхом введення пацієнтові, сприйнятливого до або з діагностованим злоякісним новоутворенням, ефективних кількостей анти-VEGF антитіла й одного або декількох хіміотерапевтичних засобів. У способах комбінованого лікування відповідно до винаходу можна застосовувати різні хіміотерапевтичні засоби. Приклади хіміотерапевтичних засобів й їх необмежувачий перелік наведений вище в розділі "Визначення".

Для фахівця в даній галузі техніки очевидно, що підходящі дози хіміотерапевтичних засобів, як правило, відповідають тим, які вже застосовуються для клінічного лікування, коли хіміотерапевтичні засоби вводяться окремо або в комбінації з іншими такими засобами. Можливі відмінності в дозуванні залежать від стану, який піддається лікуванню. Практикуючий лікар здатний визначити підходящу дозу для лікування кожного пацієнта.

Тільки як приклад, далі описана стандартна хіміотерапія для лікування метастатичного колоректального раку.

В одному переважному варіанті здійснення, способи відповідно до винаходу застосовуються для лікування колоректального раку, включаючи метастатичний колоректальний рак. Колоректальний рак є причиною смерті в кожному третьому випадку смерті від злоякісних новостворених у США. Припускають, що в США в 1999 році буде діагностовано близько 129 тис. нових випадків колоректального раку й відбудеться 56 тис. смертельних випадків внаслідок колоректального раку, Landis та ін., Cancer J Clin. 49:8-31 (1999). Близько 70 % пацієнтів з колоректальним раком потенційно виживають за допомогою хірургічного видалення August та ін., Cancer Metastasis Rev 3:303-24 (1984). Однак для тих 30 % пацієнтів, у яких це захворювання прогресує або розвиваються метастази, а також для тих 20 % пацієнтів, у яких після видалення розвивається рецидив, прогноз є поганим. Середня тривалість життя для пацієнтів з

метастазами становить 12-14 місяців, Advanced Colorectal Cancer Meta-Analysis Project, J Clin Oncol 10:896-903 (1992).

Дотепер як стандартне лікування метастатичного колоректального раку в США застосовується хіміотерапія з використанням 5-фторурацилу (5-ФУ) разом з біохімічним модулятором 5-ФУ, лейковорином, Advanced Colorectal Cancer Meta-Analysis Project, J Clin Oncol 10:896-903 (1992); Moertel N Engl J Med 330:1136-42 (1994). Комбінація 5-ФУ/лейковорин забезпечує нечасте, короткочасне зменшення розмірів колоректальних пухлин, але не забезпечує подовження виживання в порівнянні із застосуванням одного 5-ФУ (Advanced Colorectal Cancer Meta-Analysis Project, J Clin Oncol 10:896-903 (1992)), і при використанні 5-ФУ не спостерігається збільшення виживання в порівнянні з неефективним лікуванням разом з найкращим підтримуючим лікуванням, Ansfield та ін. Cancer 39:34-40 (1977). Відсутність даних про поліпшення виживання при застосуванні комбінації 5-ФУ/лейковорин частково може бути обумовлено недостатнім обсягом клінічних спостережень. У великому рандомізованому дослідженні пацієнтів, які одержували допоміжну хіміотерапію для операбельного колоректального раку, при застосуванні 5-ФУ/лейковорину спостерігали збільшення тривалості життя в порівнянні з ломустинном (MeCCNU), вінкристином й 5-ФУ (MOF; Wolmark та ін. J Clin Oncol 11:1879-87 (1993)).

В США хіміотерапія за допомогою 5-ФУ/лейковорину звичайно здійснюється відповідно до однієї із двох схем: схеми лікування Mayo Clinic й Roswell Park. Схема лікування Mayo Clinic передбачає інтенсивний курс 5-ФУ плюс лейковорин у невисокій дозі (425 мг/м 5-ФУ плюс 20 мг/м лейковорину, які вводяться щодня внутрішньовенно [BV] у вигляді «поштовху» протягом 5 днів, з повторенням курсів з 4-5 тижневими інтервалами), Buroker та ін. J Clin Oncol 12:14-20 (1994). Схема лікування Roswell Park передбачає щотижневе введення 5-ФУ плюс лейковорин у високих дозах (500-600 мг/м 5-ФУ, який вводиться шляхом BV «поштовху», плюс 500 мг/м лейковорину, який вводиться у вигляді 2-х годинної інфузії щотижня впродовж 6 тижнів, з повторенням курсів кожні 8 тижнів), Petrelli та ін., J Clin Oncol 7:1419-26 (1989). Порівняльні клінічні спостереження для схем лікування Clinical trials comparing the Mayo Clinic й Roswell Park не виявили відмінностей у їх ефективності, однак у них для цього було недостатньо можливостей, Buroker та ін., J Clin Oncol 12:14-20 (1994); Poon та ін., J Clin Oncol 7:1407-18 (1989). Показники токсичності для цих двох схем лікування відрізняються, а саме схема лікування Mayo Clinic частіше викликає лейкопенії й стоматити, а схема лікування Roswell Park частіше викликає діарею. У пацієнтів зі щойно діагнованим метастатичним колоректальним раком, які одержували лікування відповідно до будь-якої із двох схем, можна очікувати середнього часу прогресування захворювання 4-5 місяців і середньої тривалості життя 12-14 місяців, Petrelli та ін., J Clin Oncol 7:1419-26 (1989); Advanced Colorectal Cancer Meta-Analysis Project, J Clin Oncol 10:896-903 (1992); Buroker та ін., J Clin Oncol 12:14-20 (1994); Cocconi та ін., J Clin Oncol 16:2943-52 (1998).

Недавно було розроблено первинне лікування метастатичного колоректального раку. Оцінювали застосування іринотекану в комбінації з 5-ФУ/лейковорином для двох рандомізованих клінічних досліджень, кожне з яких передбачало лікування близько 400 пацієнтів, Saltz та ін., Proc ASCO 18:233a (1999); Douillard та ін., Lancet 355:1041-7 (2000). В обох дослідженнях при застосуванні комбінації іринотекан/5-ФУ/лейковорин спостерігали статистично достовірне підвищення виживання (на 2,2 й 3,3 місяця), часу прогресування захворювання й ступеня реакції-відповіді в порівнянні з 5-ФУ/лейковорином окремо. Однак переваги іринотекану нівелювалися підвищеною токсичністю: додавання іринотекану до 5-ФУ/лейковорину було зв'язане з підвищенням частоти звичайних критеріїв токсичності Національного інституту ракових захворювань (NCI-CTC) ступеня 3/4 діарея, ступеня 3/4 блювота, ступеня 4 нейтропенія й астенія в порівнянні із застосуванням 5-ФУ/лейковорину окремо. Також при цьому було встановлено, що монотерапія іринотеканом збільшує тривалість життя при вторинному лікуванні, Cunningham та ін., Lancet 352:1413-18 (1998); Rougier та ін., Lancet 352:1407-12 (1998). У результаті двох рандомізованих досліджень було показано, що іринотекан збільшує тривалість життя тих пацієнтів, у яких спостерігали прогресування після лікування 5-ФУ. В одному дослідженні при порівнянні іринотекану з найкращим підтримуючим лікуванням було встановлене збільшення тривалості життя на 2,8 місяця; в іншому дослідженні при порівнянні іринотекану з інфузійним введенням 5-ФУ було показане збільшення тривалості життя на 2,2 місяця. Питання про можливості більш ефективного впливу іринотекану на виживання при первинному або вторинному лікуванні належним чином не було досліджене.

Дозування й введення.

Антитіла й хіміотерапевтичні засоби за винаходом вводяться людині відповідно до добре відомих методів, таких як внутрішньовенне введення у вигляді болюсу або безперервної інфузії

протягом певного періоду часу, а також внутрішньом'язово, внутрішньоочеревинно, у спинномозковий канал, підшкірно, внутрішньосуглобово, внутрішньосиновіально, внутрішньооболонково, перорально, місцево або інгаляційно. Переважно антитіло вводиться внутрішньовенно або підшкірно.

В одному варіанті здійснення, лікування згідно із даним винаходом передбачає комбіноване введення анти-VEGF антитіла й одного або декількох хіміотерапевтичних засобів. Згідно із даним винаходом передбачається введення сумішей різних хіміотерапевтичних засобів. Комбіноване введення включає спільне введення за допомогою окремих препаратів або одного фармацевтичного препарату й послідовне введення в будь-якому порядку, причому переважним є такий період часу, коли обидві (або всф) активні речовини одночасно проявляють їх біологічні дії. Приготування й схеми дозування таких хіміотерапевтичних засобів можуть здійснюватися, як вказано в інструкціях виробника, або можуть визначатися досвідченим шляхом фахівцем у даній галузі. Одержання й схеми дозування хіміотерапевтичних засобів також описані в Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Балтімор, шт. Мериленд (1992). Хіміотерапевтичний засіб може вводиться перед або після введення антитіла, також вони можуть вводитися одночасно.

Для запобігання або лікування захворювання, підходяще дозування антитіла буде залежати від типу захворювання, на яке спрямований вплив, як визначено вище, тяжкості й перебігу захворювання, якщо антитіло вводиться із профілактичною або терапевтичною метою, попереднього лікування, клінічної історії пацієнта й реакції-відповіді на антитіла, а також переваг лікаря. Антитіло підходяще вводиться пацієнтові однократно або протягом циклів лікування. При комбінованій схемі лікування композиції згідно із даним винаходом вводяться в терапевтично ефективній або синергетичній кількості. Як використовується в даному винаході, терапевтично ефективна кількість являє собою таку кількість, яка при спільному введенні анти-VEGF антитіла й одного або декількох інших терапевтичних засобів, або при введенні композиції згідно із даним винаходом, приведе до зменшення або інгібування захворювання або стану, на яке спрямоване лікування. Терапевтично синергетична кількість являє собою таку кількість анти-VEGF антитіла й одного або декількох інших терапевтичних засобів, яка необхідна для синергетичної дії або істотного зменшення або усунення станів або симптомів, зв'язаних з конкретним захворюванням.

Залежно від типу й тяжкості захворювання, початкова передбачувана доза антитіла для введення пацієнтові становить приблизно від 1 мкг/кг до 50 мг/кг (наприклад 0,1-20 мг/кг), що вводиться, наприклад, або за допомогою одного або декількох окремих введень, або шляхом безперервної інфузії. Звичайна добова доза може знаходитися в діапазоні від приблизно 1 мкг/кг до приблизно 100 мг/кг або більше, залежно від факторів, вказаних вище. Для повторюваних введень протягом декількох днів або більше, залежно від стану, лікування продовжують доти, поки не досягнуть бажаного пригнічення симптомів захворювання. Однак також можуть бути корисними інші схеми призначення лікарських засобів. У переважному варіанті здійснення, антитіло за винаходом вводять кожні два або три тижні в дозі в інтервалі від приблизно 5 мг/кг до приблизно 15 мг/кг. Більш переважно, таку схему застосування лікарського засобу застосовують у комбінації зі схемою прийому хіміотерапевтичного засобу як первинне лікування для лікування метастатичного колоректального раку. У деяких варіантах здійснення, схема призначення хіміотерапевтичного засобу передбачає звичайне переривчасте введення високих доз. У деяких інших варіантах здійснення, хіміотерапевтичні засоби вводять у більш низьких дозах і більш часто у вигляді схеми без перерв ("рівномірна хіміотерапія"). Прогрес лікування відповідно до винаходу легко можна спостерігати за допомогою звичайних методик і досліджень.

Додаткова інформація щодо підходящих доз наведена в прикладі далі.

Ефективність лікування.

Головною перевагою лікування згідно із даним винаходом є здатність викликати помітні протиракові дії в людини без прояву істотної токсичності або побічних дій, таким чином, щоб лікування приносило користь пацієнтові в цілому. Ефективність лікування за винаходом можна оцінювати за допомогою різних кінцевих точок, які звичайно застосовуються для оцінки протиракового лікування, включаючи, але не обмежуючись тільки ними, регресію пухлини, зменшення тяжкості або розміру пухлини, часу прогресування, тривалість життя, тривалість життя без захворювання, ступінь загальної реакції-відповіді, тривалість реакції-відповіді і якість життя. У зв'язку з тим, що антиангіогенні засоби за винаходом націлені на кровоносну судинну сітку пухлини й не завжди на самі пухлинні клітини, то вони являють собою унікальний клас протиракових лікарських засобів і тому для оцінки клінічної реакції-відповіді можуть знадобитися виняткові методи вимірювання й визначення. Наприклад, зменшення пухлини більше ніж на 50

% при двомірному аналізі є стандартною точкою для встановлення реакції-відповіді. Однак анти-VEGF антитіло за винаходом може викликати інгібування поширення метастаз без скорочення первинної пухлини або може виявляти тільки пухлиностатичну дію. Тому для визначення ефективності антиангіогенного лікування повинні застосовуватися нові підходи, включаючи, наприклад, визначення маркерів ангіогенезу в плазмі або сечі й вимірювання відповіді за допомогою рентгенологічного зображення.

В одному варіанті здійснення, даний винахід можна використовувати для підвищення тривалості життя людини, сприйнятливої до або з діагностованим злоякісним новоутворенням. Тривалість життя визначається як період часу від першого введення лікарського засобу до смерті пацієнта. У переважному варіанті здійснення, анти-VEGF антитіло за винаходом вводиться людині в комбінації з одним або декількома хіміотерапевтичними засобами, викликаючи ефективне підвищення тривалості життя пацієнта в порівнянні із застосуванням однієї хіміотерапії. Наприклад, для групи пацієнтів, які одержували лікування анти-VEGF антитілом у комбінації з хіміотерапевтичним «коктейлем», який складається принаймні із двох, переважно із трьох хіміотерапевтичних засобів, може спостерігатися середня тривалість життя, яка перевищує принаймні на 2 місяці, переважно в інтервалі від біля 2-х до біля 5-ти місяців показники середньої тривалості життя для групи пацієнтів, які одержували тільки такий же хіміотерапевтичний «коктейль», причому вказане підвищення є статистично достовірним. Тривалість життя також можна оцінювати за допомогою стратифікованого коефіцієнта ризику (КР) для групи, підданої лікуванню, у порівнянні з контрольною групою, який являє собою ризик смерті пацієнта протягом періоду лікування. Переважно, комбіноване лікування анти-VEGF антитілом й одним або декількома хіміотерапевтичними засобами істотно зменшує ризик смерті принаймні приблизно на 30 % (тобто, стратифікований КР становить приблизно 0,70), переважно принаймні приблизно на 35 % (тобто стратифікований КР становить приблизно 0,65), у порівнянні із застосуванням однієї хіміотерапії.

В іншому варіанті здійснення, даний винахід забезпечує способи підвищення тривалості життя без захворювання людини, сприйнятливої до або з діагностованим злоякісним новоутворенням. Час прогресування захворювання (тривалість життя без захворювання) визначається як час від введення лікарського засобу до прогресування захворювання. У переважному варіанті здійснення, комбіноване лікування за винаходом із застосуванням анти-VEGF антитіла й одного або декількох хіміотерапевтичних засобів істотно підвищує тривалість життя без захворювання принаймні приблизно на 2 місяці, переважно приблизно на 2-5 місяців, у порівнянні із застосуванням однієї хіміотерапії.

В іншому варіанті здійснення, лікування згідно із даним винаходом істотно підвищує ступінь реакції-відповіді в групі людей, сприйнятливих до або з діагностованим злоякісним новоутворенням, яких піддають лікуванню із застосуванням різних терапевтичних засобів. Ступінь реакції-відповіді визначається як відсоток пацієнтів, підданих лікуванню, у яких проявляється реакція-відповідь на лікування. В одному варіанті здійснення, комбіноване лікування за винаходом із застосуванням анти-VEGF антитіла й одного або декількох хіміотерапевтичних засобів істотно підвищує ступінь реакції-відповіді в групі пацієнтів, яких піддають лікуванню, у порівнянні із групою, яка одержувала тільки хіміотерапію, вказане підвищення характеризується значенням p χ^2 -квадрат менше 0,005.

В одному варіанті здійснення, даний винахід забезпечує способи підвищення тривалості реакції-відповіді людини або групи пацієнтів, сприйнятливих до або з діагностованим злоякісним новоутворенням. Тривалість реакції-відповіді визначається як період часу від початкової реакції-відповіді до прогресування захворювання. При комбінованому лікуванні за винаходом із застосуванням анти-VEGF антитіла й одного або декількох хіміотерапевтичних засобів переважно спостерігається статистично достовірне підвищення тривалості реакції-відповіді принаймні на 2 місяці.

Безпека лікування.

Даний винахід забезпечує способи ефективного лікування злоякісних новоутворень без прояву значних побічних дій у людей, підданих лікуванню. Клінічні результати лікування відповідно до винаходу частково є несподіваними, оскільки впродовж курсу лікування відповідно до даного винаходу не спостерігається важких побічних дій, які повинні бути зв'язані з антиангіогенним лікуванням. Наприклад, у попередніх клінічних дослідженнях передбачалося, що лікування за допомогою анти-VEGF антитіл може викликати тромбози (які в деяких випадках можуть виявитися летальними), гіпертонію, протеїнурію й носову кровотечу. Однак при здійсненні комбінованої терапії за винаходом із застосуванням анти-VEGF антитіла в комбінації з хіміотерапевтичним «коктейлем», який складається принаймні із двох, переважно із трьох хіміотерапевтичних засобів не спостерігали істотного підвищення випадків таких побічних явищ

у порівнянні із застосуванням однієї хіміотерапії. Таким чином, при здійсненні лікування згідно із даним винаходом несподівано було виявлено, що побічні дії знаходяться на прийнятному рівні, і в той же час ефективність протиракового лікування істотно поліпшується.

V. Вироби (продукти).

- 5 В іншому варіанті здійснення винаходу забезпечується виріб, який містить продукти, застосовувані для лікування порушень, описаних вище. Виріб являє собою контейнер, етикетку й інструкцію-вкладиш в упаковці. Прийнятними контейнерами є, наприклад, флакони, ампули, шприци й т.д. Контейнери можна виготовляти з різних матеріалів, таких як скло або пластмаса. Контейнер містить композицію, ефективну для лікування певного стану, і може мати стерильний
- 10 вхідний канал (наприклад, контейнер може являти собою пакет для внутрішньовенного розчину або флакон, обладнаний пробкою, яку можна проколювати за допомогою голки для підшкірних ін'єкцій). Принаймні одна діюча речовина в композиції являє собою анти-VEGF антитіло. На етикетці, розміщеній на контейнері або вкладеній в нього, зазначають, що композицію застосовують для лікування конкретного стану. Виріб додатково може містити другий
- 15 контейнер, який містить фармацевтично прийнятний буфер, такий як фосфатно-сольовий буферний розчин, розчин Рінгера й розчин декстрази. Крім того, він може включати інші продукти, необхідні з комерційної точки зору й з погляду споживача, зокрема, інші буфери, розріджувачі, фільтри, голки й шприци. Додатково, виріб містить листок-вкладиш в упаковці з інструкціями із застосування, включаючи, наприклад попередження про те, що композиція не
- 20 повинна застосовуватися в комбінації з хіміотерапевтичним засобом антрациклінового типу, наприклад доксорубіцином або епірубіцином, або інформацію для користувача щодо введення пацієнтові композиції анти-VEGF антитіла й протипухлинної композиції.

Депонування матеріалів.

- Відповідно до Будапештської угоди, була задепонована наступна клітинна лінія гібридами в
- 25 Американській колекції типових культур (ATCC), Манассас, шт. Вірджинія, США:

Позначення антитіла	№ ATCC	Дата депонування
A4.6.1	ATCC HB-10709	29 березня 1991 р.

Наступні приклади призначені тільки для ілюстрації здійснення винаходу й ніяким чином його не обмежують. Зміст всіх процитованих в описі патентів і наукової літератури повністю включений в даний винахід як посилання.

VI. Приклади

- 30 Приклад 1. Додавання анти-VEGF антитіла до болюсу іринотекан/фторурацил/лейковорин (ІФЛ) як первинна терапія метастатичного колоректального раку.

- Для визначення ефективності й безпеки додавання бевацизумабу до стандартної первинної хіміотерапії, яку застосовують для лікування метастатичного колоректального раку, здійснювали багатоцентрове рандомізоване дослідження в контрольованих умовах в III фазі.
- 35 Дослідження охоплювало понад 900 пацієнтів з гістологічно підтвердженим, двовимірним імовірним метастатичним колоректальним раком, яких попередньо не піддавали лікуванню.

Матеріали й методи.

Анти-VEGF антитіло бевацизумаб.

- 40 Анти-VEGF антитіло "Бевацизумаб (БВ)", також відоме як "rhUMAb VEGF" або "Avastin™", являє собою рекомбінантне гуманізоване анти-VEGF моноклональне антитіло, отримане відповідно до Presta та ін. (1997) Cancer Res. 57:4593-4599. Воно містить мутовані каркасні ділянки IgG1 людини й антиген-зв'язувальні ділянки, які визначають комплементарність, з мишиного анти-hVEGF моноклонального антитіла A.4.6.1, яке блокує зв'язування VEGF людини з його рецепторами. Патент US 6,582,959; WO 98/45331. Близько 93 % амінокислотної
- 45 послідовності бевацизумабу, включаючи більшість каркасних ділянок, має походження з IgG1 людини і близько 7 % послідовності має походження з мишиного антитіла A4.6.1. Бевацизумаб має молекулярну вагу близько 149 кДа і є глікозильованим.

- Ідентичність поліпептиду й ділянок глікозилювання виводили на основі складу амінокислот і карти пептиду. Розмір і заряд молекули, а також чистоту клінічних партій можна визначати шляхом гель-електрофорезу в додецилсульфаті натрію-поліакриламіді або шляхом капілярного електрофорезу з не-гелевою фільтрацією, ізоелектричного фокусування, а також за допомогою іонообмінної хроматографії або витісної хроматографії на основі розмірів. Активність бевацизумабу визначали за допомогою твердофазного імуноферментного аналізу або
- 55 дослідження кіназного рецептора для рекомбінантного VEGF людини.

Бевацизумаб одержують за допомогою методики рекомбінантної ДНК, використовуючи генно-інженерно сконструйовану лінію клітин яєчника китайського хом'ячка. Білок виділяли із клітинного культурального середовища за допомогою звичайних методів колонкової

хроматографії й фільтрації. Кінцевий продукт тестували щодо його якості, ідентичності, безпеки, чистоти, ефективності, стабільності, хімічного складу й складу наповнювачів відповідно до рекомендацій Адміністрації США з контролю за продуктами харчування й ліками. Чистота бевацизумабу становить >95 %. Бевацизумаб випускається у вигляді прозорої або злегка опалесцентної стерильної рідини, готової для парентерального введення.

Відбір пацієнтів.

Пацієнти з гістологічно підтвердженою метастатичною колоректальною карциномою, яка може бути виміряна у двох площинах, є придатними для дослідження. Іншими критеріями для включення є вік пацієнтів - 18 років і більше, оцінка стану 0 або 1 згідно із Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) 1 (Oken та ін. (1982) Am. J. Clin. Oncol. 5:649-55), прогнозована тривалість життя більше трьох місяців і письмова згода. Також необхідна наявність відповідних гематологічних показників, функції печінки й нирки (включаючи сечовиділення зі вмістом білка, що не перевищує 500 мг у добу).

Критеріями виключення з дослідження були попередня хіміотерапія або біологічна терапія метастатичного захворювання (застосування ад'ювантів або радіосенсибілізуючих засобів, таких як фторпіримідини з лейковорином або левамизолом або без них більше року перед початком дослідження не перешкоджало включенню в дослідження), одержання променевої терапії протягом 14 днів перед початком дослідження, радикальне хірургічне втручання протягом 28 днів перед початком даного лікування, клінічно значиме серцево-судинне захворювання, клінічно виражений асцит, вагітність або годування грудьми, регулярне застосування аспірину (більше 325 мг у добу) або інших нестероїдних протизапальних засобів, наявність геморагічного діатезу, коагулопатії або потреба у веденні антикоагулянтів у високих дозах, а також діагностовані метастази в центральній нервовій системі.

Схема дослідження.

Підходящих пацієнтів розподіляли в досліджувані групи для лікування за допомогою алгоритму динамічної рандомізації таким чином, щоб дотримати загального балансу між групами; рандомізацію стратифікували відповідно до дослідницького центру, початкових даних стану згідно із ECOG (0 або 1), локалізації первинного захворювання (ободова кишка або пряма кишка) і кількості метастатичних ділянок (одна або більше однієї). На початковій стадії, пацієнтів випадково розбивали на групи з дотриманням співвідношення 1:1:1, яким вводили: ІФЛ плюс плацебо, ІФЛ плюс бевацизумаб, або фторурацил і лейковорин плюс бевацизумаб (таблиця 1), для кожної із цих груп лікування продовжували до прогресування захворювання або до прояву неприйнятних побічних дій або максимально протягом 96 тижнів.

Таблиця 1

Схема первинного лікування*

Лікування	Початкова доза	Схема
Іринотекан Фторурацил Лейковорин Плацебо	125 мг/м ² площі поверхні тіла 500 мг/м ² 20 мг/м ²	Один раз на тиждень протягом 4-х тижнів, цикл повторювали кожні 6 тижнів Кожні 2 тижні
Іринотекан Фторурацил Лейковорин Бевацизумаб	125 мг/м ² 500 мг/м ² 20 мг/м ² 5 мг/кг ваги тіла	Один раз на тиждень протягом 4-х тижнів, цикл повторювали кожні 6 тижнів Кожні 2 тижні
Фторурацил	500 мг/м ²	Один раз на тиждень
Лейковорин Бевацизумаб	500 мг/м ² 5 мг/кг	протягом 4-х тижнів, цикл повторювали кожні 8 тижнів Кожні 2 тижні

* Лікування фторурацилом, лейковорином і бевацизумабом припиняли після підтвердження безпеки додавання бевацизумабу до схеми лікування із застосуванням іринотекану, фторурацилу й лейковорину. Підтвердження здійснювали після рандомізації 313 пацієнтів. Всі лікарські засоби вводили внутрішньовенно.

Здійснювали передбачений проміжний аналіз після проведення рандомізації для 300 пацієнтів, при якому за допомогою відкритої незалежної комісії зі спостереження за даними

оцінювали безпеку схеми лікування ІФЛ плюс бевацизумаб на основі всієї доступної інформації щодо безпеки, включаючи кількість смертей у кожній групі, але без урахування інформації щодо реакції-відповіді пухлини. Якщо комісією зі спостереження за даними не було виявлено несприятливих побічних дій, обумовлених додаванням бевацизумабу до ІФЛ, то включення пацієнтів у групу, яка одержує фторурацил і лейковорин плюс бевацизумаб припиняли, а додаткових пацієнтів з дотриманням співвідношення 1:1 випадково включали в групу, яка одержує схему або ІФЛ плюс плацебо або ІФЛ плюс бевацизумаб. Однак, якщо комісія зі спостереження за даними прийшла до висновку, що показники безпеки для схеми ІФЛ плюс бевацизумаб є неприйнятними, то здійснення такої схеми лікування припиняли, і замість цього пацієнтів з дотриманням співвідношення 1:1 випадково переводили в групу, яка одержує або комбінацію фторурацил і лейковорин плюс бевацизумаб або ІФЛ плюс плацебо.

Відповідь пухлини й прогресування визначали за допомогою критеріїв оцінки відповіді солідних пухлин. Therasse та ін. (2000) J. Natl. Cancer Inst. 92:205-16. При прогресуванні захворювання призначену схему лікування відкривали й таких пацієнтів можна піддавати вторинному лікуванню. Таким пацієнтам у групі, призначеній для здійснення лікування із застосуванням бевацизумабу, надавали вибір продовжити лікування бевацизумабом при такому вторинному лікуванні. У групі, яка одержувала ІФЛ плюс плацебо, таких перехресчувань не дозволяли. Для тих пацієнтів із групи, підданих лікуванню із застосуванням бевацизумабу, у яких до закінчення 96-ти тижневого періоду дослідження не спостерігалось ознак прогресування захворювання, можна продовжувати вводити бевацизумаб в окремому подовженому дослідженні. Для тих пацієнтів із групи, підданої лікуванню із застосуванням бевацизумабу, у яких проявлялася повна реакція-відповідь або спостерігалися неприйнятні побічні дії внаслідок хіміотерапії, можна припиняти хіміотерапію й продовжувати лікування тільки за допомогою бевацизумабу.

Бевацизумаб (або плацебо) вводили із супутньою хіміотерапією. Якщо протягом дослідження вага пацієнтів змінювалася принаймні на 10 %, то для таких пацієнтів дози бевацизумабу й хіміотерапії перераховували. Для пацієнтів, у яких спостерігалися побічні дії, зв'язані з лікуванням, дозволялося застосовувати стандартні внутрішньоциклові й міжциклові модифікації доз для іринотекану й фторурацилу (відповідно до інструкції-вкладиша в упаковці). Дози лейковорину й бевацизумабу не змінювалися.

При аналізі виживання й наступного лікування всіх пацієнтів спостерігали до летального результату, зняття з обліку або закінчення дослідження.

Оцінка

Після визначення початкових даних розмір пухлини вимірювали кожні 6 тижнів протягом перших 24 тижнів дослідження й потім кожні 12 тижнів протягом лікування. Для всіх повних і часткових реакцій-відповідей необхідно було підтвердження принаймні протягом 4 тижнів після їх першого встановлення.

Безпеку визначали на основі даних про побічні дії, результатів лабораторних досліджень і даних основних показників життєдіяльності організму. Побічні дії класифікували відповідно до звичайних критеріїв токсичності Національного інституту ракових захворювань, версія 2, відповідно до якої 1-ий ступінь вказує на незначні побічні дії, 2-ий ступінь відповідає помірним побічним діям, 3-ий ступінь відповідає серйозним побічним діям й 4-ий ступінь означає побічні дії, які представляють небезпеку для життя пацієнта. Попередньо встановлені критерії безпеки включали спостереження за всіма випадками побічних дій, всіма серйозними побічними діями, а також побічними діями, пов'язаними із застосуванням бевацизумабу - гіпертонією, тромбозом, кровотечами 3-ого або 4-ого ступеня 3 або 4, протеїнурією, а також діареєю 3-ого або 4-ого ступеня, і змінами даних лабораторних досліджень й основних показників життєдіяльності в порівнянні з початковими даними.

Для контролю безпеки при застосуванні схеми лікування ІФЛ плюс плацебо й ІФЛ плюс бевацизумаб, відкритим способом за допомогою комісії зі спостереження за даними безпеки протягом дослідження контролювали летальні кінці, серйозні побічні дії, діарею 3-ого або 4-ого ступеня, кровотечу 3-ого або 4-ого ступеня будь-якого походження й тромбози до завершення відновлення здоров'я або закінчення періоду проміжного аналізу ефективності, який з них наступав першим.

Статистичний аналіз.

Основним кінцевим оцінним критерієм була загальна тривалість життя; виживання вимірювалося незалежно від подальшого лікування. Проте, перехресчування між групами не було. Використовували такі методики визначення виживання, як метод Каплана-Мейера, логарифмічний ранговий критерій і пропорційну модель ризиків Сох. Додатковими кінцевими

оцінними критеріями були прогресія виживання без захворювання, критерії об'єктивної реакції-відповіді (повна й часткова реакції-відповіді), тривалість реакцій-відповідей й якість життя.

Для пацієнтів, які залишалися живими під час аналізу, дані виживання перевіряли за часом їх останнього спостереження. Прогресування життя без захворювання визначали як час від рандомізації до прогресування або смерті під час лікування, при цьому смерть під час лікування визначали як будь-який летальний результат, який мав місце протягом 30 днів після останньої дози бевацизумабу або хіміотерапії. Для пацієнтів без прогресування захворювання під час закінчення дослідження дані прогресування без захворювання перевіряли під час останньої оцінки стану пухлини або в день 0, якщо після початкових даних не здійснювали додаткової оцінки. Пацієнтів без відповідних даних наступних спостережень кваліфікували як таких, у яких не спостерігалось реакції-відповіді.

Для виявлення коефіцієнта ризику 0,75 для смертельних випадків у групі, яка одержувала ІФЛ плюс бевацизумаб, у порівнянні з контрольною групою, необхідно було близько 385 смертельних випадків. Всі обчислення здійснювали за допомогою логарифмічного рангового критерію й двосторонніх значень P, зі значенням альфа, рівним 0,05, статистичною здатністю 80 відсотків й одним проміжним аналізом ефективності.

Проміжні аналізи здійснювали відкритим способом. Проміжний аналіз безпеки здійснювали після випадкової оцінки приблизно 100 пацієнтів у кожній групі. Другий проміжний аналіз ефективності й безпеки здійснювали після 193 смертельних випадків (половина необхідної кількості випадків).

Визначення ефективності здійснювали відповідно до принципу наміру лікувати. У дослідження безпеки включали всіх пацієнтів, які одержували принаймні одну дозу досліджуваних лікарських засобів.

Результати.

Характеристики пацієнтів.

Протягом періоду біля двадцяти місяців рандомізації піддавали 923 пацієнтів в 164 населених пунктів США, Австралії й Новій Зеландії. Після того, як 313 пацієнтів випадково розподіляли в одну із трьох груп - 100 пацієнтів у групу, яка одержує ІФЛ плюс плацебо, 103 пацієнтів у групу, яка одержує ІФЛ плюс бевацизумаб, і 110 пацієнтів у групу, яка одержує фторурацил, лейковорин і бевацизумаб, розподіл у групу, яка одержувала фторурацил, лейковорин і бевацизумаб, припиняли (результати цієї групи не представлені). Ця стадія була необхідна для протоколу після першого формального проміжного аналізу безпеки для підтвердження того, що схема лікування із застосуванням ІФЛ плюс бевацизумаб характеризується прийнятними характеристиками безпеки й що розподіл у цю групу може бути продовжено.

Аналіз наміру лікувати в первинній кінцевій точці загального виживання охоплював 411 пацієнтів у групі, яка одержувала ІФЛ плюс плацебо, і 402 пацієнти в групі, яка одержувала ІФЛ плюс бевацизумаб. У таблиці 2 наведені вибрані демографічні й початкові характеристики, які були добре збалансовані між цими групами. Аналогічна кількість пацієнтів у кожній групі попередньо піддавалися хірургічному лікуванню або одержували променеву терапію або допоміжну хіміотерапію для лікування колоректального раку.

Лікування.

Середня тривалість лікування становила 27,6 тижнів у групі, яка одержувала ІФЛ плюс плацебо, і 40,4 тижня в групі, яка одержувала ІФЛ плюс бевацизумаб. Відсоток запланованої дози іринотекану, яка була введена, був подібним у двох групах (78 відсотків у групі, яка одержувала ІФЛ плюс плацебо, і 73 відсотка в групі, яка одержувала ІФЛ плюс бевацизумаб).

На день зняття результатів, 33 пацієнти в групі, яка одержувала ІФЛ плюс плацебо, і 71 пацієнт у групі, яка одержувала ІФЛ плюс бевацизумаб, продовжували приймати призначену початкову терапію. Ступінь використання вторинних видів лікування, які можуть впливати на виживання, таких як оксаліплатин або метастазектомія, був добре збалансований між двома групами. В обох групах близько 50 % пацієнтів одержували деякі види вторинного лікування; 25 % всіх пацієнтів одержували оксаліплатин і менше 2 % пацієнтів піддавали метастазектомії.

Таблиця 2

Вибрані демографічні й початкові характеристики*

Характеристики	ІФЛ плюс плацебо (N=411)	ІФЛ плюс бевацизумаб (N=402)
Стать (%)		
чоловіки	60	59
жінки	40	41
Середній вік (роки)	59,2	59,5
Раса (%)		
європейська	80	79
негроїдна	11	12
інші	9	9
Розташування центру (%)		
США	99	99
Австралія або Нова Зеландія	<1	<1
Стан згідно із ECOG (%)		
0	55	58
1	44	41
2	<1	<1
Тип раку (%)		
ободова кишка	81	77
пряма кишка	19	23
Кількість метастатичних ділянок (%)		
1	39	37
>1	61	63
Попередня протиракова терапія (%)		
допоміжна хіміотерапія	28	24
променева терапія	14	15
середня тривалість метастатичного захворювання (мо)	4	4

* Між групами не було істотних відмінностей. ІФЛ означає іринотекан, фторурацил і лейковорин, і ECOG - Eastern Cooperative Oncology Group.

Ефективність.

Середня тривалість загального виживання, визначена в первинній кінцевій точці, була істотно більшою в групі, яка одержувала ІФЛ плюс бевацизумаб, у порівнянні із групою, яка одержувала ІФЛ плюс плацебо (20,3 місяця проти 15,6 місяця), що відповідає коефіцієнту ризику смерті 0,66 ($P<0,001$) (таблиця 3 і фігура 1), або зменшенню на 34 % ризику смерті в групі, яка одержувала бевацизумаб. Показник виживання протягом 1 року склав 74,3 % у групі, яка одержувала ІФЛ плюс бевацизумаб, і 63,4 % у групі, яка одержувала ІФЛ плюс плацебо ($P<0,001$). У підгрупі пацієнтів, які одержували вторинне лікування із застосуванням оксаліплатину, середня тривалість загального виживання склала 25,1 місяця в групі, яка одержувала ІФЛ плюс бевацизумаб, і 22,2 місяця у групі, яка одержувала ІФЛ плюс плацебо.

Додавання бевацизумабу до ІФЛ супроводжувалося підвищенням середньої тривалості прогресування виживання без захворювання (10,6 місяця проти 6,2 місяців коефіцієнт ризику для прогресування 0,54 у порівнянні із групою, яка одержувала ІФЛ плюс плацебо; $P<0,001$); ступеня реакції-відповіді (44,8 % проти 34,8 %; $P=0,004$); і середньої тривалості реакції-відповіді (10,4 місяця проти 7,1 місяця; коефіцієнт ризику для прогресування, 0,62; $P=0,001$) (таблиця 3). На фігурі 2 наведена оцінка тривалості життя без захворювання згідно із Каплан-Мейером. Лікувальні впливи узгоджували для заздалегідь визначених груп, включаючи групи, визначені відповідно до віку, раси, оцінці стану згідно із ECOG, розташування первинної пухлини, наявності або відсутності попередньої ад'ювантної терапії, тривалості метастатичного захворювання, кількості метастатичних ділянок, часу від постановки діагнозу колоректального раку, наявності або відсутності попередньої променевої терапії, початкової тяжкості пухлинного захворювання й концентрації в сироватці альбуміну, лужної фосфатази й лактатдегідрогенази.

Таблиця 3

Аналіз ефективності*

Кінцева точка	ІФЛ плюс плацебо	ІФЛ плюс бевацизумаб	Значення Р
Середнє виживання (мо)	15,6	20,3	<0,001
Коефіцієнт ризику смерті		0,66	
Показник виживання протягом 1 року (%)	63,4	74,3	<0,001
Тривалість життя без захворювання (мо)	6,2	10,6	<0,001
Коефіцієнт ризику прогресування		0,54	
Ступінь загальної реакції-відповіді (%)	34,8	44,8	0,004
Повна відповідь	2,2	3,7	
Часткова відповідь	32,6	41,0	
Середня тривалість реакції-відповіді (мо)	7,1	10,4	0,001
Коефіцієнт ризику рецидиву		0,62	

* ІФЛ позначає іринотекан, фторурацил і лейковорин.

Безпека.

У таблиці 4 представлена частота вибраних побічних дій 3-ого або 4-ого ступеня при здійсненні заявленого лікування без урахування середньої тривалості (27,6 тижня для групи, яка одержувала ІФЛ плюс плацебо, і 40,4 тижня для групи, яка одержувала ІФЛ плюс бевацизумаб). Частота прояву будь-яких побічних дій 3-ого або 4-ого ступеня становила приблизно 10 % і вона була вище серед пацієнтів, які одержували ІФЛ плюс бевацизумаб, у порівнянні з пацієнтами, які одержували ІФЛ плюс плацебо, більшою мірою у зв'язку з підвищенням частоти прояву гіпертонії 3-ого ступеня (що потребує лікування) і незначного підвищення частоти прояву діареї 4-ого ступеня й лейкопенії. Однак не було виявлено істотної відмінності в частоті прояву побічних дій, які вимагають госпіталізації або припинення досліджуваного лікування або частки смертності протягом 60-ти днів внаслідок будь-якої причини.

Таблиця 4

Вибрані побічні дії*

Побічна дія	ІФЛ плюс плацебо (N=397)	%	ІФЛ плюс бевацизумаб (N=393)
Будь-яка побічна дія 3-ого або 4-ого ступеня	74,0		84,9**
Побічна дія, яка приводить до госпіталізації	39,6		44,9
Побічна дія, яка приводить до відміни лікування	7,1		8,4
Побічна дія, яка приводить до смерті	2,8		2,6
Смерть протягом 60 днів	4,9		3,0
Лейкопенія 3-ого або 4-ого ступеня	31,1		37,0
Гіпертонія			
будь-яка	8,3		22,4**
3-ого ступеня	2,3		11,0**
Будь-який тромботичний випадок	16,2		19,4
Глибокий тромбофлебіт	6,3		8,9
Легенева емболія	5,1		3,6
Кровотеча 3-ого або 4-ого ступеня	2,5		3,1
Протеїнурія			
будь-яка	21,7		26,5
2-ого ступеня	5,8		3,1

3-ого ступеня	0,8	0,8
Перфорація в шлунково-кишковому тракті	0,0	1,5

* Дані не вивірені з урахуванням відмінностей середньої тривалості лікування між групою, яка одержувала іринотекан, фторурацил і лейковорин (ІФЛ) плюс плацебо, і групою, яка одержувала ІФЛ плюс бевацизумаб (27,6 тижня проти 40,4 тижня).

** $P < 0,01$. Включали тільки тих пацієнтів, які одержували лікування із застосуванням принаймні одного досліджуваного лікарського засобу.

У фазах 1 й 2 дослідження спостерігалися крововиливи, тромбоемболія, протеїнурія й гіпертонія, які, можливо, є побічними діями, зв'язаними із застосуванням бевацизумаб. Однак у даному дослідженні тільки частота гіпертонії явно підвищувалася в групі, яка одержувала ІФЛ плюс бевацизумаб, у порівнянні із групою, яка одержувала ІФЛ плюс плацебо. Всі випадки гіпертонії легко піддавалися лікуванню за допомогою звичайних пероральних антигіпертензивних засобів (наприклад, блокаторів кальцієвих каналів, інгібіторів ангіотензин-перетворюючого ферменту і діуретиків). Не було випадків відміни лікування бевацизумабу, гіпертонічних криз або летальних випадків, зв'язаних із проявом гіпертонії в групі, яка одержувала бевацизумаб.

Відсотки прояву протеїнурії 2-ого або 3-ого ступеня (не було виявлено випадків протеїнурії 4-ого ступеня або нефротичного синдрому) і кровотечі будь-якого походження 3-ого або 4-ого ступеня були подібними у двох групах, хоча всі три випадки кровотечі 4-ого ступеня спостерігалися в групі, яка одержувала ІФЛ плюс бевацизумаб. Частота прояву всіх випадків венозних й артеріальних тромбозів склала 19,4 % у групі, яка одержувала ІФЛ плюс бевацизумаб, і 16,2 % у групі, яка одержувала ІФЛ плюс плацебо ($P = 0,26$).

Перфорації в шлунково-кишковому тракті спостерігалися в шести пацієнтів (1,5 %), які одержували ІФЛ плюс бевацизумаб. Один пацієнт помер безпосередньо внаслідок цієї побічної дії, тоді як інші п'ять відновилися (при цьому троє з них були здатні відновити лікування без наступних ускладнень). Серед шести пацієнтів з перфорацією в трьох була підтверджена повна або часткова реакція-відповідь на ІФЛ плюс бевацизумаб. Перфорація в шлунково-кишковому тракті може бути викликана іншими причинами, а не досліджуваним лікуванням, зокрема у двох пацієнтів вона може бути пов'язана з операцією на ободовій кишці протягом попередніх двох місяців, а в одного пацієнта з пептичною виразкою.

Результати цієї III фази дослідження забезпечують безпосереднє підтвердження значної корисності застосування антиангіогенних засобів для лікування злоякісного новоутворення. Додавання бевацизумабу, анти-VEGF антитіла, до хіміотерапії із застосуванням ІФЛ забезпечує клінічно значиме й статистично достовірне поліпшення у хворих зі злоякісними новоутвореннями, як визначається, наприклад, за допомогою загального виживання, тривалості життя без захворювання й тривалості реакції-відповіді. Підвищення середньої тривалості життя на 4,7 місяці, імовірно, обумовлене бевацизумабом, є найбільшим або перевищує дані, отримані в будь-якому іншому дослідженні на фазі 3 при лікуванні колоректального раку. Goldberg та ін. (2004) J. Clin. Oncol. 22:23-30. При даному дослідженні спостерігається середня тривалість життя 20,3 місяця в групах, які піддають лікуванню бевацизумабом, незважаючи на обмежену придатність оксаліплатину для вторинного лікування.

У порівнянні із застосуванням тільки ІФЛ, схема лікування із застосуванням ІФЛ плюс бевацизумаб підвищує тривалість життя без захворювання від середнього значення 6,2 місяця до 10,6 місяців, загальну реакцію-відповідь від 34,8 % до 44,8 %, і середню тривалість реакції-відповіді від 7,1 місяця до 10,4 місяця. Ці поліпшення є клінічно значимими. Неможливо було припустити, що абсолютне поліпшення в ступені реакції-відповіді на 10 % при лікуванні ІФЛ плюс бевацизумаб може бути пов'язане з підвищенням виживання при цій величині. Це спостереження є підтвердженням того, що первинним механізмом дії бевацизумабу є інгібування росту пухлини, а не зменшення кількості клітин.

Ця клінічна перевага супроводжується відносно помірним підвищенням побічних дій при лікуванні, які легко піддаються коректуванню. Спостерігалось абсолютне підвищення приблизно на 10 % сумарних випадків побічних дій 3-ого й 4-ого ступеня, які обумовлені в більшості випадків гіпертонією, яка потребує лікування, діареєю й лейкопенією. Частота смертельних випадків внаслідок будь-якої причини протягом 60-ти днів, госпіталізації й відміни лікування істотно не підвищувалися при додаванні бевацизумабу до ІФЛ.

При 1-ій й 2-ій фазах попередніх клінічних досліджень було встановлено, що лікування одним бевацизумабом або разом з хіміотерапією приводить до підвищення частоти тромбозів,

кровотечі, протеїнурії й гіпертонії. Kabbinavar та ін. (2003) J. Clin. Oncol. 21:60-65; Yang та ін. (2003) New Engl. J. Med. 349:427-34. За винятком гіпертонії, надлишок цих побічних дій не було виявлений в порівнянні із частотою їх прояву в групі, яка одержувала ІФЛ плюс плацебо - такі відмінні риси значимості рандомізованих досліджень із плацебо як контролем для оцінки безпеки, а також ефективності. Однією новою потенційною побічною дією, що зустрічається в цьому дослідженні, є перфорація в шлунково-кишковому тракті. Це ускладнення зустрічається рідко й воно характеризується різними клінічними проявами. Важкі кишкові порушення, зокрема в пацієнтів з нейтропенією, спостерігалися у хворих, які одержують лікування за допомогою ІФЛ й іншу хіміотерапію, для лікування колоректального раку й в одній схемі, фістули спостерігалися більше ніж в 2 % пацієнтів, які одержують схему лікування на основі фторурацилу. Saltz та ін. (2000) New Engl. J. Med. 343:905-914; Rothenberg та ін. (2001) J. Clin. Oncol. 19:3801-7; Tebbutt та ін. (2003) Gut 52:568-73. Таких явищ не спостерігали в групі, яка одержувала ІФЛ плюс плацебо, тоді як шість випадків спостерігали в групі, яка одержувала ІФЛ плюс бевацизумаб (1,5 %), іноді при прояві сумарної пухлинної відповіді. Хоча три із цих шести пацієнтів були здатні відновити лікування без подальших ускладнень, один пацієнт помер, а два були змушені тимчасово припинити лікування внаслідок цього ускладнення.

В той час як при попередніх дослідженнях на тваринах і на ранній фазі клінічних досліджень було запропоновано застосовувати антиангіогенну терапію для лікування злоякісного новоутворення, при даному дослідженні вперше було показано, що застосування ангіогенного інгібітора, такого як анти-VEGF антитіло, дійсно приводить до статично достовірних й клінічно значимих переваг для пацієнтів зі злоякісними новоутвореннями.

Приклад 2. Додавання бевацизумабу до болюсу 5-ФУ/лейковорин при первинному лікуванні метастатичного колоректального раку.

У цьому рандомізованому дослідженні на стадії II порівнювали бевацизумаб плюс 5-фторурацил і лейковорин (5-ФУ/ЛВ) з дією плацебо плюс 5-ФУ/ЛВ як первинне лікування пацієнтів, які не були визнані як оптимальні кандидати для первинного лікування за допомогою іринотекану.

Пацієнти й методи.

Придатність пацієнтів.

Пацієнти з гістологічно підтвердженим, попередньо нелікованим, вимірюваним метастатичним колоректальним раком були підходящими для дослідження, якщо, на думку дослідника, вони не були оптимальними кандидатами для первинного лікування із застосуванням іринотекану й мали принаймні одну з наступних характеристик: вік понад 65 років, оцінка стану згідно із ECOG 1 або 2, концентрація альбуміну в сироватці 3,5 г/дл або менше, або попередня променева терапія черевної порожнини або таза. Пацієнтів не включали в дослідження, якщо вони піддавалися радикальному хірургічному втручанню або операційній біопсії, або перенесли значне травматичне ушкодження, протягом 28 днів до початку дослідження; мали потребу в радикальному хірургічному втручанні протягом дослідження; раніше або в цей час приймали терапевтичні антикоагулянти (за винятком тих, які необхідні для забезпечення прохідності катетера), піддавалися лікуванню тромболітиками або протягом тривалого часу щодня приймали аспірин (>325 мг/добу) або нестероїдні протизапальні лікарські засоби; мали значні, незагоювані рани, виразки або переломи кісток; мали в анамнезі або в цей час метастази в ЦНС; у період вагітності або годування грудьми; або мали протеїнурію або клінічно значиму ниркову недостатність на початку лікування. Всі пацієнти давали письмову згоду на їх участь у дослідженні.

Схема дослідження й лікування.

Інтерактивну систему з мовною відповіддю застосовували для випадкового розподілу пацієнтів одну із двох груп для лікування: 5-ФУ/ЛВ плюс плацебо або 5-ФУ/ЛВ плюс бевацизумаб. Використовували динамічний алгоритм рандомізації для досягнення сумарного балансу й у межах кожної з наступних категорій: дослідницький центр, початкова оцінка стану згідно із ECOG (0 або >1), локалізація первинного захворювання (ободова кишка або пряма кишка) і кількість метастатичних ділянок (1 або >1). Лікування з використанням 5-ФУ/ЛВ, що включає ЛВ 500 мг/м² протягом 2 годин й 5-ФУ 500 мг/м² у вигляді болюсу посередині інфузії ЛВ (схема лікування Roswell Park; Petrelli та ін. (1989) J. Clin. Oncol. 7:1419-1426), застосовували щотижня протягом перших 6 тижнів кожного 8-ти тижневого циклу. Хіміотерапію продовжували до закінчення дослідження (96 тижнів) або прогресування захворювання. Бевацизумаб 5 мг/кг або плацебо вводили кожні 2 тижні. Пацієнтам у групах, які одержують бевацизумаб, у яких підтверджували повну реакцію-відповідь або спостерігалася неприйнятна токсичність у результаті хіміотерапевтичного лікування, дозволяли припинити лікування 5-ФУ/ЛВ і продовжували вводити тільки бевацизумаб як первинне лікування. Під час прогресування

захворювання пацієнтам відкривали схему застосовуваного лікування й відповідно до думки дослідника, їм могли призначати будь-яке вторинне лікування. Тільки ті пацієнти, які були рандомізовані в групи, яка одержувала бевацизумаб, могли одержувати бевацизумаб як компонент вторинного лікування. Після завершення дослідження пацієнтів спостерігали щодо

5 призначення будь-якого наступного лікування й виживання кожні 4 місяці до смерті, зняття з обліку або закінчення дослідження.

Оцінка дослідження

У пацієнтів оцінювали стан пухлини на початку дослідження й після завершення кожного 8-ми тижневого циклу, використовуючи підходящі рентгенологічні дослідження, як правило,

10 спіральну комп'ютерну томографію. Відповідь пухлини або прогресію визначали як дослідники, так і за допомогою незалежних рентгенологів (IRF), застосовуючи критерії оцінки відповіді для солідних пухлин. Therasse та ін. (2000). Оцінку IRF здійснювали, не знаючи про оцінку лікування або оцінку дослідника. Додатково, пацієнти заповнювали дані щодо функціональної оцінки колоректальної протиракової терапії (FACT-C), версія 4, затверджений документ для оцінки

15 якості життя (QOL) у хворих з колоректальним раком, на початку дослідження й перед кожним циклом лікування до прогресування захворювання. Ward та ін. (1999) Qual. Life Res. 8:181-195.

Безпеку оцінювали згідно з даними про наявність побічних дій, результатами лабораторних досліджень й оцінкою основних показників життєдіяльності. Побічні дії й атипіві результати лабораторних досліджень класифікували відповідно до звичайних критеріїв токсичності

20 Національного інституту ракових захворювань (NCI-CTC), версія 2. Заздалегідь визначеними критеріями оцінки безпеки були чотири побічні дії, які представляють особливий інтерес (гіпертонія, протеїнурія, тромбоз і кровотечі), виходячи з результатів попередніх клінічних досліджень бевацизумабу.

Статистичний аналіз

Основним кінцевим оцінним критерієм була загальна тривалість життя. Додатковими кінцевими оцінними критеріями були прогресія виживання без захворювання, критерії об'єктивної реакції-відповіді (повна й часткова реакції-відповіді), тривалість реакції-відповіді й зміни, оцінені відповідно до шкали FACT-C QOL. Тривалість життя визначали як час від рандомізації до смерті. Для пацієнтів, які залишалися живими під час аналізу, дані про

30 виживаність перевіряли за часом їх останнього спостереження. Прогресування життя без захворювання визначали як час від рандомізації до раннього прогресування захворювання або смерті під час дослідження, при цьому смерть під час дослідження визначали як будь-який летальний результат, який мав місце протягом 30 днів від прийому останньої дози досліджуваного лікарського засобу або хіміотерапії. Для живих пацієнтів без прогресування

35 захворювання під час дослідження, дані прогресування без захворювання перевіряли під час останньої оцінки стану пухлини або в день 1 (перший день початку дослідження), якщо після початкових даних не здійснювали додаткової оцінки. При аналізі об'єктивної реакції-відповіді пацієнтів без оцінки дані пухлини кваліфікували як такі, у яких не спостерігалось реакції-відповіді. Прогресування захворювання й аналізи реакції-відповіді ґрунтувалися на оцінці згідно

40 із IRF. Зміни якості життя оцінювали як час до погіршення в QOL (TDQ), визначений як проміжок часу від рандомізації до найбільш раннього зниження ≥ 3 балів щодо початкових даних специфічної для раку ободової кишки FACT-C оцінної підпікали (CCS), прогресування захворювання або смерті під час дослідження. Також визначали TDQ для TOI-C (сума CCS, фізичного й функціонального здоров'я) і загального FACT-C для зміни відносно початкових

45 даних на 7 й 9 балів, відповідно.

Для виявлення коефіцієнта ризику 0,61 для смертельних випадків у групі, яка одержувала 5-ФУ/ЛВ/бевацизумаб, у порівнянні із групою, яка одержувала 5-ФУ/ЛВ/плацебо, необхідно було близько 133 смертельних випадків. Для підрахунків використовували двосторонній логарифмічний ранговий критерій при рівні вірогідності 0,05 з 80 % здатністю й двома

50 проміжними аналізами. Проміжні аналізи здійснювали за допомогою відкритої незалежної комісії зі спостереження за даними (DMC). Проміжний аналіз безпеки здійснювали після 44 смертельних випадків, а другий аналіз безпеки й проміжний аналіз ефективності здійснювали після 89 смертельних випадків. Проміжний аналіз ефективності проводили за допомогою правила послідовної зупинки для формальної групи на основі нейтралізуючої функції O'Brien-Fleming. Для оцінки середнього виживання, тривалості життя без захворювання й часу реакції-відповіді для кожної групи, підданої лікуванню, застосовували методологію Каплан-Мейєра. Коефіцієнти ризику для групи, яка одержувала бевацизумаб, відносно групи, яка одержувала

55 плацебо, визначали за допомогою стратифікованої пропорційної моделі ризиків Сох. Двосторонній стратифікований логарифмічний ранговий критерій використовували для порівняння двох груп. Стратифіковані аналізи включали визначення початкового статусу згідно

60

із ECOG, локалізації первинного захворювання й кількості метастатичних ділянок. Ступені об'єктивної реакції-відповіді порівнювали за допомогою перевірки за критерієм хі-квадрат. Як пробний аналіз, для оцінки дії факторів ризику на модифікацію лікувальної дії для тривалості життя й прогресування виживання без захворювання застосовували пропорційну модель ризиків Сох. Визначення ефективності здійснювали відповідно до принципу наміру лікувати, визначеним для всіх рандомізованих пацієнтів. У дослідження безпеки включали всіх пацієнтів, які одержували принаймні одну дозу досліджуваних лікарських засобів.

Результати.

Характеристики пацієнтів.

Протягом двадцяти трьох місяців рандомізували 209 пацієнтів в 60 населених пунктах США, Австралії /Нової Зеландії. Аналіз наміру лікувати в первинній кінцевій точці (загальне виживання) охоплював 105 пацієнтів у групі, яка одержувала 5-ФУ/ЛВ/плацебо, і 104 пацієнтів у групі, яка одержувала 5-ФУ/ЛВ/бевацизумаб. Вибрані демографічні й початкові характеристики були ідентичні до тих, які описані в прикладі 1, і вони були достатньо збалансовані між групами, підданими лікуванню. Низький початковий рівень альбуміну в сироватці ($\leq 3,5$ г/дл) був менш поширеним у групі, яка одержувала бевацизумаб, у порівнянні із групою, яка одержувала плацебо.

Лікування.

Середня тривалість лікування становила 23 тижні в групі, яка одержувала 5-ФУ/ЛВ/плацебо, і 31 тиждень у групі, яка одержувала 5-ФУ/ЛВ/бевацизумаб, при цьому протягом курсу лікування інтенсивність дози 5-ФУ (% запланованої дози 5-ФУ відносно реально отриманої) у двох групах був аналогічним (92 % проти 84 %). На день зняття результатів, 1 пацієнт у групі, яка одержувала 5-ФУ/ЛВ/плацебо, і 7 пацієнтів у групі, яка одержувала 5-ФУ/ЛВ/бевацизумаб, знаходилися на запланованому початковому лікуванні. Наступне лікування, яке може впливати на виживання, застосовувалося приблизно для 50 % пацієнтів в обох групах, хоча в групі, яка одержувала 5-ФУ/ЛВ/плацебо, більша кількість пацієнтів піддавалися лікуванню із застосуванням таких активних компонентів, як іринотекан й оксаліплатин.

Ефективність.

Загальне виживання, визначене в первинній кінцевій точці, було більше в групі, яка одержувала 5-ФУ/ЛВ/бевацизумаб (у середньому 16,6 місяця), у порівнянні із групою, яка одержувала 5-ФУ/ЛВ/плацебо (у середньому 12,9 місяця), виявляючи тенденцію до вірогідності. Коефіцієнт ризику смерті становив 0,79 (95 % CI, 0,56 до 1,10; $P=0,16$; таблиця 5 і фігура 4). Додавання бевацизумабу до 5-ФУ/ЛВ було зв'язане з підвищенням середньої тривалості життя без захворювання (9,2 проти 5,5 місяця; коефіцієнт ризику =0,50; 95 % CI, 0,34 до 0,73; $P=0,0002$, таблиця 5 і фігура 4), ступеня реакції-відповіді (26,0 % проти 15,2 %, $P=0,055$) і середньої тривалості реакції-відповіді (9,2 місяця проти 6,8 місяця; коефіцієнт ризику =0,42; 95 % CI, 0,15 до 1,17; $P=0,088$). Подальший аналіз дії лікування на загальне виживання на основі початкових даних показав, що в пацієнтів з низьким початковим вмістом альбуміну в плазмі ($< 3,5$ г/дл) спостерігалися достовірні переваги щодо виживання (коефіцієнт ризику =0,46; 95 % CI, 0,29 до 0,74; $P=0,001$).

Таблиця 5

Узагальнені дані дослідження ефективності

Параметр ефективності	5-ФУ/ЛВ/ плацебо (N=105)	5-ФУ/ЛВ/ бевацизумаб (N=104)	Значення P
Середнє виживання (місяці)	12,9	16,6	
Коефіцієнт ризику		0,79	0,160
95 % CI		0,56 до 1,10	
Прогресування виживання без захворювання (місяці)	5,5	9,2	
Коефіцієнт ризику		0,50	0,0002
95 % CI		0,34 до 0,73	
Ступінь загальної реакції-відповіді (%)	15,2	26,0	0,055
Повна відповідь	0	0	
Часткова відповідь	15,2	26,0	
Тривалість реакції-відповіді (місяці)	6,8	9,2	
Коефіцієнт ризику		0,42	0,088
95 % CI		0,15 до 1,17	
5-ФУ/ЛВ=5 фторурацил/лейковорин			

Лікування із застосуванням бевацизумабу не виявляло негативного впливу на якість життя, і результати TDQ свідчили про ймовірну позитивну дію. Середнє TDQ, як було виміряно відповідно до шкали CCS, становило 3,0 місяці в групі, яка одержувала 5-ФУ/ЛВ/плацебо, і 3,1 місяця в групі, яка одержувала 5-ФУ/ЛВ/бевацизумаб (коефіцієнт ризику =0,79, P=0,188).

5 Середнє TDQ для пацієнтів, які одержували плацебо, і пацієнтів, які одержували бевацизумаб, як визначено за допомогою додаткових TDQ вимірювань, становило 2,3 й 3,2 місяця (TOI-C; коефіцієнт ризику =0,71, P=0,048) і 2,6 й 3,6 місяця (загальне FACT-C; коефіцієнт ризику =0,66, P=0,016).

Безпека.

10 У цілому 204 пацієнти (104 пацієнти, які одержували 5-ФУ/ЛВ/плацебо, і 100 пацієнтів, які одержували 5-ФУ/ЛВ/бевацизумаб), які одержували принаймні одну дозу досліджуваного лікарського засобу, становили вибірку для визначення безпеки. Спостерігали в цілому підвищення на 16 % (71 % проти 87 %) токсичності 3-ого й 4-ого ступеня для пацієнтів, які одержували бевацизумаб. Побічні дії, які приводять до смерті або припинення дослідження,

15 були аналогічними у двох групах, також як і побічні дії, які, як відомо, зв'язані із застосуванням 5-ФУ/ЛВ (особливо діарея й лейкопенія). У двох пацієнтів із групи, яка одержувала 5-ФУ/ЛВ/бевацизумаб, був зафіксований випадок перфорації кишечника. Ці випадки відбувалися на 110-ий й 338-ий день лікування й обидва були зв'язані з дивертикулом ободової кишки при хірургічному дослідженні. Один пацієнт помер внаслідок цього ускладнення. У попередніх клінічних дослідженнях як можливі побічні дії, зв'язані з токсичністю бевацизумаб, називалися

20 крововиливи, тромбоемболія, протеїнурія й гіпертонія; однак у цьому дослідженні не спостерігали підвищення випадків венозного тромбозу, кровотечі ≥ 3 -ого ступеня або клінічно значимої (≥ 3 -ого ступеня) протеїнурії. Випадки артеріального тромбозу (інфаркт міокарда, удар або випадки тромбозу периферичних артерій) спостерігалися в 10 пацієнтів у групі, яка одержувала 5-ФУ/ЛВ/бевацизумаб, у порівнянні з 5 пацієнтами в групі, яка одержувала 5-ФУ/ЛВ/плацебо.

25

У групі, яка одержувала 5-ФУ/ЛВ/плацебо, був вище показник смертності внаслідок будь-якої причини протягом 60-ти днів у порівнянні із групою, яка одержувала 5-ФУ/ЛВ/бевацизумаб (13,5 % проти 5,0 %). Смертність внаслідок прогресування захворювання протягом перших 60-ти днів

30 була подібною у двох групах (5,8 % проти 4,0 %). У групі, яка одержувала 5-ФУ/ЛВ/плацебо, смертність протягом перших 60-ти днів не внаслідок прогресування захворювання, а внаслідок однієї з наступних причин, розподілялася в такий спосіб: серцева недостатність (1), сепсис (3), діарея (2), дихальна недостатність (1) і емболія легень (1). У групі, яка одержувала 5-ФУ/ЛВ/бевацизумаб, один випадок ранньої смерті не внаслідок прогресування захворювання, а з іншої причини, був викликаний інфарктом міокарда.

35

Результати цього клінічного дослідження додатково свідчать про те, що бевацизумаб, гуманізоване моноклональне антитіло проти VEGF, забезпечує значні клінічні переваги при додаванні до первинної хіміотерапії для лікування метастатичного колоректального раку. У порівнянні із застосуванням тільки 5-ФУ/ЛВ, додавання бевацизумабу викликає збільшення

40 середньої тривалості життя на 3,7 місяця, тривалості життя без захворювання на 3,7 місяця, тривалості реакції-відповіді на 2,4 місяця й підвищення ступеня реакції-відповіді на 11 %.

Ці результати повинні бути розглянуті в контексті дослідження популяції. Окремо були виділені пацієнти, які були поганими кандидатами для первинного лікування із застосуванням іринотекану, або у зв'язку з низькою ймовірністю користі лікування або високою ймовірністю токсичності, зв'язаної з лікуванням. Ретельний аналіз основного застосування іринотекану показав, що користь клінічного застосування цього засобу обмежена пацієнтами з нормальною оцінкою стану згідно із ECOG (PS=0).^{21, 22} Наявність таких факторів, як літній вік, попередня променева терапія ділянки таза, погіршена оцінка станів і низька концентрація альбуміну в сироватці, супроводжуються підвищеною токсичністю при застосуванні іринотекану. 23-27

50 Пацієнти з такими характеристиками потребували альтернативних терапевтичних підходів. Ретроспективний субпопуляційний аналіз для невеликої рандомізованої фази дослідження II дозволив попередньо оцінити бевацизумаб і 5-ФУ/ЛВ в CRC і припустити, що бевацизумаб забезпечує істотну лікувальну дію на ту субпопуляцію пацієнтів, у яких початкові характеристики PS становили 1 або 2 (середня тривалість виживання 6,3 місяця проти 15,2 місяця), в субпопуляції пацієнтів, вік яких був 65 років і старше (11,2 місяця проти 17,7 місяця) і в субпопуляції пацієнтів з концентрацією альбуміну в сироватці $< 3,5$ (8,1 місяця проти 14,1 місяця). Ці результати підтвердили наміри авторів даного винаходу створити дане дослідження, специфічне для оцінки популяції з поганим прогнозом і здійснити дослідження для визначення значного лікувального впливу на виживання. Автори даного винаходу виявили значні

55 сприйнятливі впливи при здійсненні дослідження популяції, яка відрізняється від тієї популяції,

60

для якої здійснювали одночасне основне дослідження порівняння дій ІФЛ/плацебо і ІФЛ/бевацизумаб. В порівнянні з основним дослідженням, пацієнти в даному дослідженні були старшими (середній вік 72 років проти 61) і значно більше пацієнтів мали оцінку стану >0 (72 % проти 43 %) і концентрацію альбуміну $\leq 3,5$ мг/дл (46 % проти 33 %).

Незважаючи на високий ризик досліджуваної популяції, схема лікування із застосуванням 5-ФУ/ЛВ/бевацизумаб характеризувалася хорошою переносимістю. Гіпертонія 3-ого ступеня, яка є відомою побічною дією, зв'язаною із застосуванням бевацизумабу, спостерігалася в 16 % пацієнтів у групі, яка одержувала 5-ФУ/ЛВ/бевацизумаб, у порівнянні з 3 % пацієнтів у групі, яка одержувала 5-ФУ/ЛВ/плацебо. Випадків гіпертонії 4-ого ступеня не спостерігалось. Протеїнурія будь-якого ступеня спостерігалася в 38 % пацієнтів у групі, яка одержувала 5-ФУ/ЛВ/бевацизумаб, у порівнянні з 19 % пацієнтів у групі, яка одержувала 5-ФУ/ЛВ/плацебо; однак лише в одного пацієнта в групі, яка одержувала бевацизумаб, розвинулася протеїнурія 3-ого ступеня, а випадків протеїнурії 4-ого ступеня не спостерігалось. У групі пацієнтів, які одержували лікування бевацизумабом, не виявлялося підвищення частоти кровотеч 3-ого або 4-ого ступеня або венозних тромбозів. При аналізі випадків артеріальних тромбозів виявився дисбаланс: 10 % у групі, яка одержувала 5-ФУ/ЛВ/бевацизумаб, у порівнянні з 4,8 % у групі, яка одержувала 5-ФУ/ЛВ плацебо. Аналогічний дисбаланс був виявлений при здійсненні основного лікування бевацизумабом (1,0 % у групі, яка одержувала ІФЛ/плацебо, і 3,3 % у групі, яка одержувала ІФЛ/бевацизумаб). Більш літній вік популяції даного дослідження міг спричинитися більш високий загальний прояв цієї побічної дії, однак такий дисбаланс в обох дослідженнях заслуговував на увагу. Для подальшого аналізу цього явища й визначення його можливих факторів ризику, а також інших нетипових побічних дій, зв'язаних з лікуванням бевацизумабом, може знадобитися значні спостереження і дослідження для визначення безпеки.

На закінчення, ці отримані дані свідчать про те, що бевацизумаб, у комбінації з болюсом 5-ФУ/ЛВ, забезпечує значну клінічну користь у пацієнтів з раніше нелікованим метастатичним колоректальним раком, які, як вважають, є поганими кандидатами для здійснення лікування із застосуванням іринотекану. Разом з результатами основного дослідження ці дані підтверджують висновок про те, що лікування із застосуванням бевацизумабу й 5-ФУ/ЛВ може бути стандартним варіантом первинного лікування метастатичного колоректального раку.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Спосіб лікування злоякісного новоутворення в людини, який передбачає введення пацієнтові ефективною кількістю бевацизумабу та моніторинг гастроінтестинальної перфорації у пацієнта.
2. Спосіб за п. 1, який передбачає додаткове введення пацієнтові протипухлинної композиції, де вказана протипухлинна композиція містить принаймні один хіміотерапевтичний засіб.
3. Спосіб за п. 1 або 2, у якому бевацизумаб вводиться шляхом внутрішньовенної інфузії.
4. Спосіб за п. 1 або 2, у якому бевацизумаб вводиться пацієнтові в дозі приблизно 5 мг/кг кожні 2-3 тижні.
5. Спосіб за п. 1 або 2, у якому злоякісне новоутворення вибирають із групи, яка включає рак молочної залози, колоректальний рак, рак прямої кишки, недрібноклітинний рак легені, неходжкінську лімфому (НХЛ), рак нирки, рак передміхурової залози, рак печінки, рак підшлункової залози, саркому м'яких тканин, саркому Капоши, карциноїдну пухлину, рак голови й шиї, меланому, рак яєчників, мезотеліому, множинну мієлому й гліобластому.
6. Спосіб за п. 1 або 2, у якому злоякісне новоутворення є метастатичним.
7. Спосіб за п. 1 або 2, у якому пацієнта попередньо не піддавали лікуванню.
8. Спосіб за п. 2, у якому хіміотерапевтичний засіб вибирають із групи, яка включає алкілувальні агенти, антиметаболіти, аналоги фолієвої кислоти, аналоги піримідину, аналоги пурину й споріднені інгібітори, алкалоїди барвінку, епіподофілотоксини, антибіотики, L-аспарагіназу, інгібітор топоізомерази, інтерферони, координаційні комплекси платини, антрацендіонзаміщену сечовину, похідні метилгідразину, препарати для пригнічення кори наднирників, адренкортикостероїди, прогестини, естрогени, антиестроген, андрогени, антиандроген й аналог гонадротропін-релізінг гормону.
9. Спосіб за п. 8, у якому хіміотерапевтичний засіб вибирають із групи, яка включає 5-фторурацил (5-ФУ), лейковорин, іринотекан, оксаліплатин, капецитабін, паклітаксел і доксетаксел.
10. Спосіб за п. 2, у якому протипухлинна композиція містить принаймні два хіміотерапевтичні засоби.
11. Спосіб за п. 10, у якому протипухлинна композиція містить 5-ФУ й лейковорин.
12. Спосіб за п. 10, у якому протипухлинна композиція містить 5-ФУ, лейковорин й іринотекан.

13. Спосіб за п. 1, у якому при завершенні лікування за допомогою бевацизумабу пацієнт одержує додаткове хіміотерапевтичне лікування із застосуванням принаймні одного хіміотерапевтичного засобу.

14. Спосіб за п. 13, у якому хіміотерапевтичний засіб, застосовуваний для додаткового хіміотерапевтичного лікування, вибирають із групи, яка включає 5-ФУ, лейковорин, іринотекан, оксаліплатин, капецитабін, паклітаксел і доксетаксел.

15. Спосіб за п. 14, у якому хіміотерапевтичний засіб являє собою оксаліплатин.

16. Спосіб лікування людини, сприйнятливої до або з діагностованим колоректальним раком, який передбачає введення пацієнтові ефективних кількостей бевацизумабу та моніторинг гастроінтестинальної перфорації у пацієнта.

17. Спосіб за п. 16, у якому колоректальний рак є метастатичним.

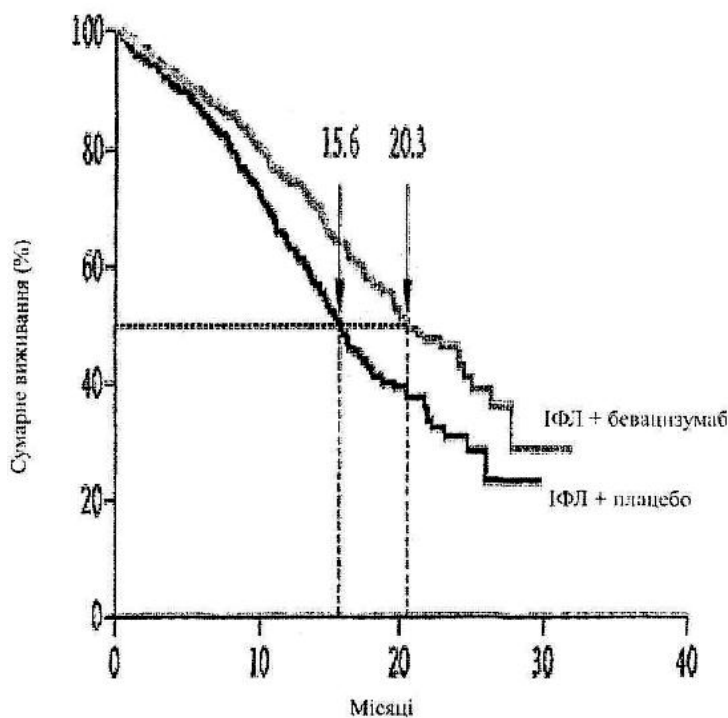
18. Спосіб за п. 16, у якому бевацизумаб вводиться шляхом внутрішньовенної інфузії.

19. Спосіб за п. 16, у якому бевацизумаб вводиться пацієнтові в дозі приблизно 5 мг/кг кожні 2-3 тижні.

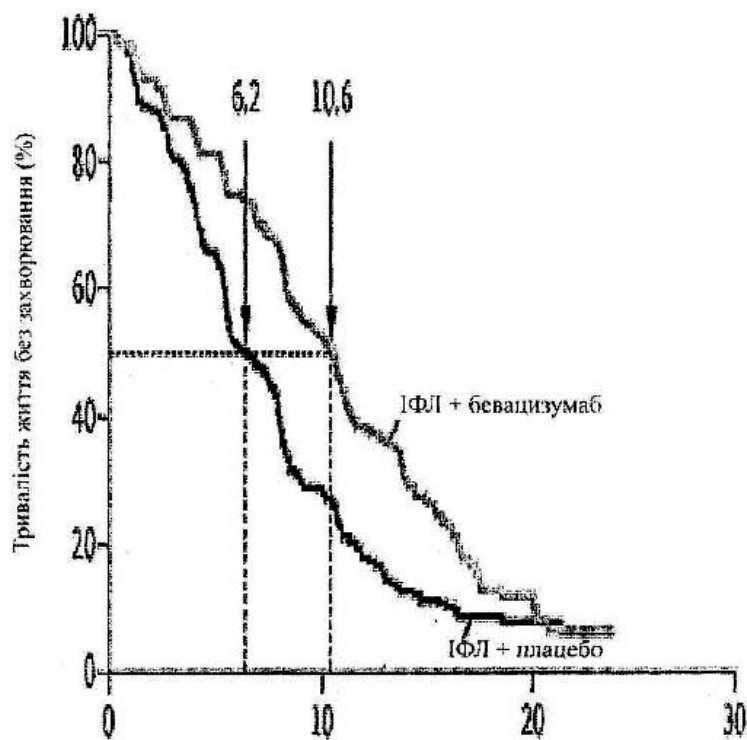
20. Спосіб за п. 16, який передбачає додаткове введення пацієнтові одного або декількох хіміотерапевтичних засобів.

21. Спосіб за п. 20, у якому хіміотерапевтичний засіб вибирають із групи, яка включає алкілувальні агенти, антиметаболіти, аналоги фолієвої кислоти, аналоги піримідину, аналоги пурину й споріднені інгібітори, алкалоїди барвінку, епіподофілотоксини, антибіотики, L-аспарагіпазу, інгібітор топоізомерази, інтерферони, координаційні комплекси платини, антрацепдіон-заміщену сечовину, похідні метилгідразину, препарати для пригнічення кори наднирників, адренкортикостероїди, прогестини, естрогени, антиестроген, андрогени, антиандроген й аналог гонадротропін-релізінг гормону.

22. Спосіб за п. 20, у якому хіміотерапевтичний засіб вибирають із групи, яка включає 5-фторурацил, лейковорин, іринотекан, оксаліплатин, капецитабін, паклітаксел і доксетаксел.



Фігура 1.



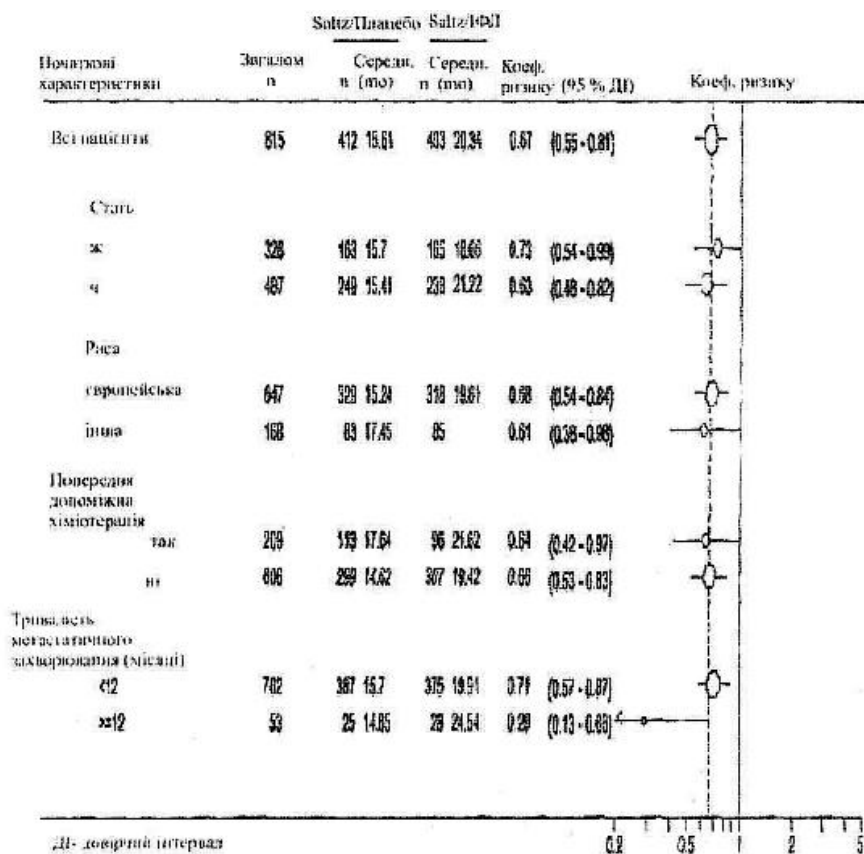
Місяці

Фігура 2.

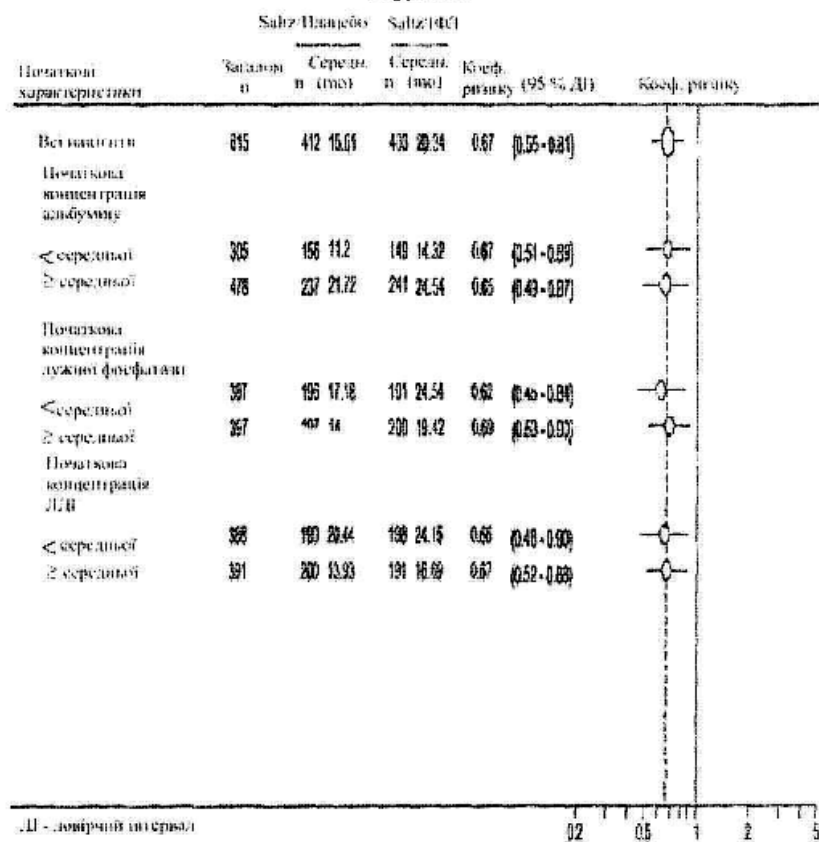
Початкові характеристики	Saliz/Плaцeбo		Saliz/1FL		Коеф. ризику
	Загалом n	Середн. n (мо)	Середн. n (мо)	Коеф. ризику (95% ДІ)	
Всі пацієнти	815	412 15.61	403 20.34	0.57 (0.55-0.59)	
Стан життя за ECOG					
0	463	220 17.67	235 24.18	0.55 (0.48-0.67)	
≥1	352	194 12.12	168 14.92	0.59 (0.53-0.66)	
Кількість метастатичних ділянок					
1	306	159 17.94	147 20.6	0.75 (0.53-1.04)	
≥1	509	253 14.59	256 19.91	0.62 (0.48-0.79)	
Локалізація первинної пухлини					
ободова кишка	646	335 15.7	311 19.61	0.73 (0.58-0.94)	
пряма кишка	169	77 14.92	92 24.15	0.47 (0.30-0.75)	
Вік (роки)					
<40	35	17 15.61	18 22.03	0.50 (0.19-1.30)	
40-64	507	253 15.6	254 19.81	0.71 (0.55-0.92)	
≥65	273	142 14.62	131 24.15	0.60 (0.42-0.85)	

ДІ - довірчий інтервал

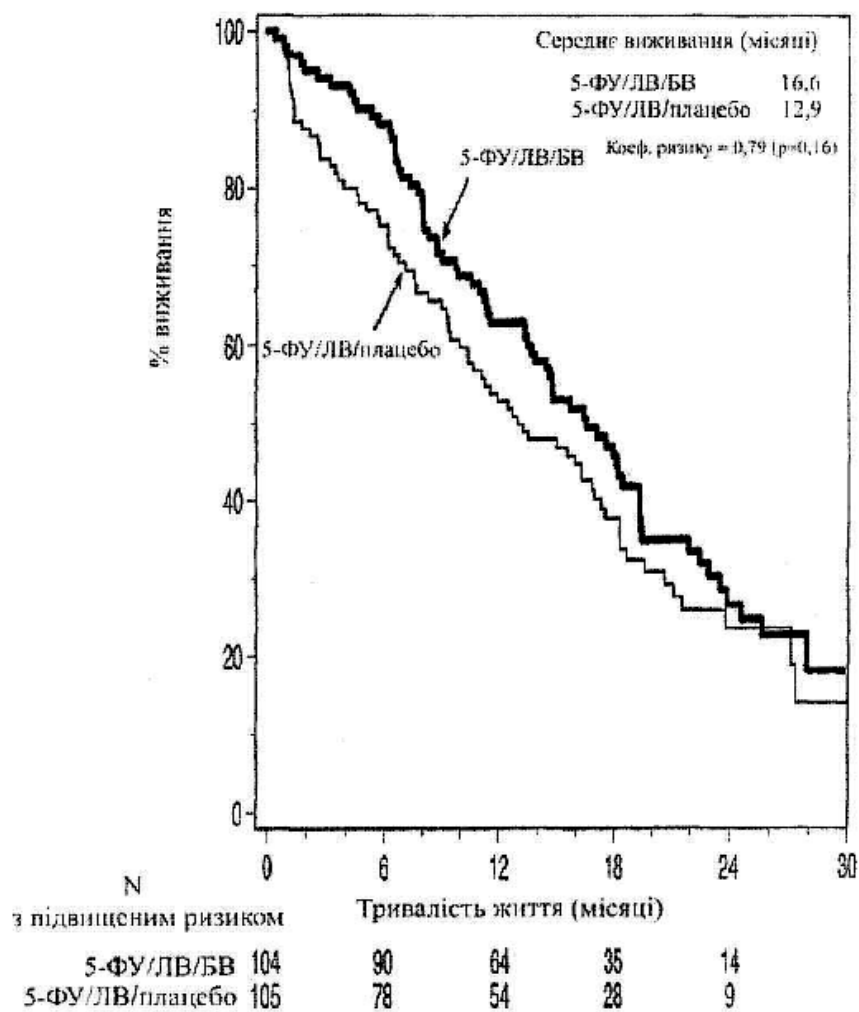
Фігура 3А.



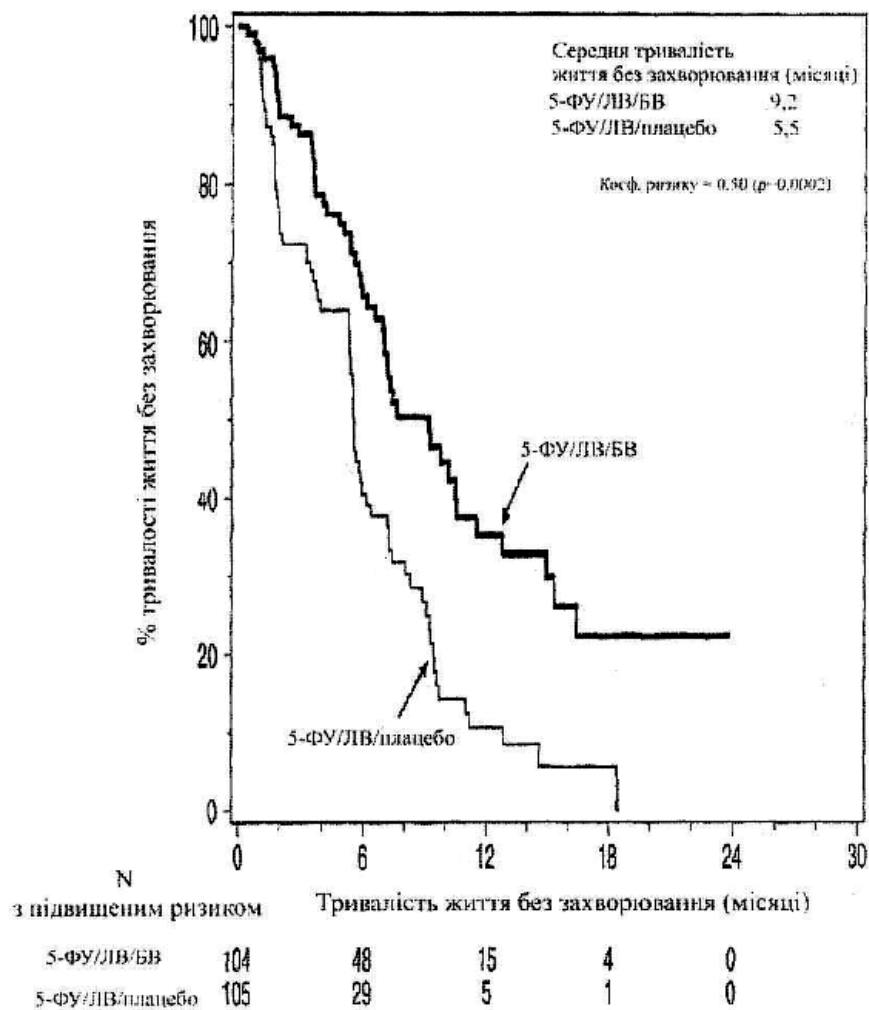
Фігура 3Б.



Фігура 3В.



Фігура 4.



Фігура 5.

Комп'ютерна верстка В. Мацело

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601