

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **034136**(13) **B1**

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2020.01.09**

(21) Номер заявки  
**201070585**

(22) Дата подачи заявки  
**2008.11.07**

(51) Int. Cl. **A61K 39/395** (2006.01)  
**A61K 35/00** (2006.01)  
**C07K 16/22** (2006.01)

### (54) ИЗОЛИРОВАННОЕ АНТИТЕЛО, КОТОРОЕ СВЯЗЫВАЕТСЯ С VEGF, И ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ

(31) **60/987,015; 61,106,047; 61/108,023**

(32) **2007.11.09; 2008.10.16; 2008.10.24**

(33) **US**

(43) **2010.12.30**

(86) **PCT/GB2008/003745**

(87) **WO 2009/060198 2009.05.14**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**ПЕРИГРИН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,  
ИНК. (US); АФФИТЕК РИСЕЧ АС  
(NO)**

(72) Изобретатель:  
**Кавлье Анита (NO), Шлунеггер Кайл  
(US)**

(74) Представитель:  
**Липатова И.И., Рыбаков В.М.,  
Новоселова С.В., Дощечкина В.В.,  
Хмара М.В. (RU)**

(56) **US-B1-6524583  
US-A1-2006280747  
WO-A-03102157**

**LIANG W-C. ET AL.: "Cross-species vascular endothelial growth factor (VEGF)-blocking antibodies completely inhibit the growth of human tumor xenografts and measure the contribution of stromal VEGF" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOCHEMICAL BIOLOGISTS, BIRMINGHAM, US, vol. 281, no. 2, 13 January 2006 (2006-01-13), pages 951-961, XP002481172 ISSN: 0021-9258 [retrieved on 2005-11-07] page 960, left-hand column table 1 figures 3-5**

**KLOHS W.D. ET AL.: "ANTIANGIOGENIC AGENTS" CURRENT OPINION IN BIOTECHNOLOGY, LONDON, GB, vol. 10, no. 6, 1 December 1999 (1999-12-01), pages 544-549, XP001206158 ISSN: 0958-1669 page 544, right-hand column, paragraph 3**

**FUH GERMAINE ET AL.: "Structure-function studies of two synthetic anti-vascular endothelial growth factor Fabs and comparison with the AVASTIN (TM) Fab" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOCHEMICAL BIOLOGISTS, BIRMINGHAM, US, vol. 281, no. 10, 1 March 2006 (2006-03-01), pages 6625-6631, XP002472297 ISSN: 0021-9258 page 6630, right-hand column, paragraph 2 - page 6631, paragraph 3**

(57) Предложены изолированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с VEGF, иммуноконъюгат, включающий указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, фармацевтическая композиция для связывания с VEGF, молекула нуклеиновой кислоты, включающая последовательность нуклеотидов, кодирующую указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вектор экспрессии, клетка-хозяин для получения указанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, вирусная частица, набор для применения в терапии заболевания, связанного с ангиогенезом или лимфоангиогенезом, набор для применения в визуализации или диагностике такого заболевания, способ получения указанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, способ обнаружения VEGF в образце, способ диагностики заболевания, связанного с ангиогенезом или лимфоангиогенезом, способ ингибирования ангиогенеза или лимфоангиогенеза, способы лечения заболевания, связанного с ангиогенезом, применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в производстве лекарственного средства для лечения заболевания, связанного с ангиогенезом или лимфоангиогенезом.

**034136 B1**

**034136 B1**

### Уровень техники

#### Ссылка на родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет согласно первой предварительной заявке на патент США, серийный номер 60/987015, поданной 09 ноября 2007 г., второй предварительной заявке на патент США, серийный номер 61/106047, поданной 16 октября 2008 г., и третьей предварительной заявке на патент США, серийный номер 61/108023, поданной 24 октября 2008 г., полное описание, формулы изобретения, последовательности и фигуры которых включены в данную заявку посредством ссылки без исключений.

### Область техники

Настоящее изобретение относится, как правило, к области антител, ангиогенеза и лечения опухолей. В частности, согласно настоящему изобретению предложены антитела человека к VEGF, которые специфично ингибируют связывание VEGF лишь с одним (VEGFR2) из двух рецепторов VEGF. Такие антитела разработаны для ингибирования ангиогенеза и индукции регрессии опухоли, и, кроме того, они обеспечивают повышенную безопасность вследствие специфичных блокирующих свойств. Композиции на основе указанных антител и способы согласно настоящему изобретению также охватывают применение иммуноконъюгатов и других терапевтических комбинаций, наборов и способов.

### Уровень техники

Устойчивость опухолевой клетки к химиотерапевтическим агентам представляет собой существенную проблему в клинической онкологии. Фактически, это является основной причиной того, почему многие из наиболее широко распространенных форм рака человека все еще резистентны эффективному химиотерапевтическому вмешательству, несмотря на некоторые достижения в этой области.

Другой стратегией лечения опухоли является применение "иммунотоксина", при которой антиопухолевое антитело применяется для доставки токсина к опухолевым клеткам. Тем не менее, наряду с химиотерапевтическими подходами, терапия иммунотоксином также имеет значительные недостатки при применении для лечения солидных опухолей. Например, антиген-негативные или антиген-дефицитные клетки могут выживать и репопулировать опухоль или приводить к дальнейшему метастазированию.

Дополнительная причина резистентности солидной опухоли к методам терапии на основе антител состоит в том, что опухолевое образование, как правило, непроницаемо для макромолекулярных агентов, таких как антитела и иммунотоксины (Burrows и др., 1992; Dvorak и др., 1991a; Baxter и Jain, 1991). Как протяженность физической диффузии, так и тканевое давление внутри опухоли являются существенными ограничениями для этого типа терапии. Вследствие этого, солидные опухоли, которые составляют более чем 90% всех раковых заболеваний человека, на сегодняшний день доказали резистентность к лечению антителами и иммунотоксинами.

Сравнительно недавно была разработана стратегия, согласно которой оказывают воздействие на сосудистую сеть солидных опухолей. Нацеливание на кровеносные сосуды опухолей вместо нацеливания на сами опухолевые клетки имеет некоторые преимущества, состоящие в том, что оно, вероятно, не приводит к появлению устойчивых опухолевых клеток, и в том, что целевые клетки оказываются легко доступными. Более того, разрушение кровеносных сосудов приводит к усилению противоопухолевого действия, так как многие опухолевые клетки зависят от одного сосуда для получения необходимого кислорода и питательных веществ (Burrows и Thorpe, 1993; 1994). Типичные стратегии, нацеленные на сосуды, описаны в патентах США №№ 5855866 и 5965132, в которых, в частности, описана целевая доставка направленных антиклеточных агентов и токсинов к маркерам сосудистой сети опухоли.

Другим эффективным вариантом нацеленного на сосуды подхода является нацеливание фактора свертывания крови (коагулирующего фактора) на маркер, экспрессируемый или адсорбированный внутри сосудистой сети опухоли (Huang и др., 1997; патенты США №№ 5877289, 6004555 и 6093399). Доставка коагулянтов вместо токсинов в сосудистую сеть опухоли имеет дополнительные преимущества, состоящие в пониженной иммуногенности и еще более низком риске возникновения токсичных побочных эффектов. В патенте США № 5877289 описан предпочтительный фактор свертывания крови для применения в таких опухолеспецифичных "коагулигандах", представляющий собой укороченный вариант индуцирующего коагуляцию белка человека - тканевого фактора (TF) - основного активатора свертывания крови.

Хотя специфичная доставка токсинов и факторов свертывания крови к опухолевым кровеносным сосудам представляет собой значительное достижение в лечении опухолей, некоторые периферические опухолевые клетки могут выжить при внутриопухолевом разрушении, вызванном такой терапией. Антиангиогенные стратегии, вследствие этого, будут полезны в комбинации со способами разрушения опухолей, описанными в патентах США №№ 5855866 и 6004555.

Антиангиогенные стратегии лечения опухолей основаны на ингибировании пролиферации прорастающих сосудов, как правило, на периферии солидной опухоли. Эти методы лечения особенно эффективны для снижения риска микрометастазирования и ингибирования роста солидной опухоли после или в сочетании с более традиционным вмешательством (таким как хирургическое вмешательство или химиотерапия).

Ангиогенез представляет собой развитие новой сосудистой сети из ранее существовавших крове-

носных сосудов и/или циркулирующих эндотелиальных стволовых клеток (Asahara и др., 1997; Springer и др., 1998; Folkman и Shing, 1992). Ангиогенез играет жизненно важную роль во многих физиологических процессах, таких как эмбриогенез, заживление ран и менструация. Ангиогенез также важен для некоторых патологических явлений. Вдобавок к его роли в росте и метастазировании солидной опухоли другими важными состояниями с ангиогенным компонентом являются артрит, псориаз и диабетическая ретинопатия (Hanahan и Folkman, 1996; Fidler и Ellis, 1994).

Ангиогенез контролируется в нормальных и злокачественных тканях с помощью равновесия ангиогенных стимулов и ангиогенных ингибиторов, которые продуцируются в целевой ткани и на удаленных участках (Fidler и др., 1998; McNamara и др., 1998). Фактор А роста эндотелия сосудов (VEGF, также называемый фактором сосудистой проницаемости, VPF) является первичным стимулирующим фактором ангиогенеза. VEGF представляет собой многофункциональный цитокин, который индуцируется гипоксией и онкогенными мутациями, и может продуцироваться большим количеством тканей (Kerbel и др., 1998; Mazure и др., 1996).

Обнаружение того, что VEGF является первичным стимулом ангиогенеза в патологических условиях, привело к различным попыткам блокировать активность VEGF. Ингибиторные антитела к рецептору VEGF, растворимые конструкции рецептора, антисмысловые стратегии, аптамеры РНК к VEGF и ингибиторы низкомолекулярного рецептора VEGF с тирозинкиназной активностью (RTK) были предложены для применения в препятствовании передаче сигналов VEGF (Siemeister и др., 1998). После ингибирования опухолевого роста у мышей с применением антитела мыши (Kim и др., 1993; Asano и др., 1998; Mesiano и др., 1998; Luo и др., 1998a; 1998b; Borgstrom и др., 1996; 1998) гуманизованное антитело к VEGF, названное Авастин (бевацизумаб) (Presta и др., 1997), было одобрено для клинического применения (Hugwitz и др., 2004).

Также сообщалось о других антителах мыши, которые узнают VEGF и ингибируют индуцируемые VEGF функции. Они включали антитело мыши, названное 2С3, которое имеет преимущество, состоящее в ингибировании связывания VEGF лишь с одним из двух первичных (первично-чувствующих) рецепторов VEGF (Brekken и др., 2000). Посредством блокирования связывания VEGF с VEGFR2, но не с VEGFR1, антитело мыши 2С3 имеет улучшенные показатели безопасности, сохраняя при этом благоприятное действие, опосредованное через VEGFR1 (Brekken и др., 2000; патенты США №№ 6342219, 6524583, 6342221).

Авторы настоящего изобретения, тем не менее, обнаружили, что идентификация дополнительных агентов, которые узнают VEGF и ингибируют индуцированный VEGF ангиогенез, будут полезны для расширения диапазона возможных методов лечения. Например, антитело мыши 2С3, являясь перспективным, имеет некоторые ограничения. В частности, антитело 2С3 не связывается с VEGF мыши, подразумевая, что его нельзя использовать в доклинических испытаниях с использованием сингенных опухолей мыши. Для наиболее эффективного продвижения от доклинических испытаний к клиническому применению будет полезна разработка нового антитела, которое связывается с VEGF как мыши, так и человека.

Кроме того, авторы настоящего изобретения обнаружили, что разработка терапевтических агентов для лечения людей, которые лучше переносятся, с точки зрения иммунологической перспективы будут иметь преимущества. В этом отношении антитела человека, как правило, имеют по меньшей мере три потенциальных преимущества для применения в терапии человека. Во-первых, иммунная система человека не должна узнавать антитело как чужеродное. Во-вторых, период полувыведения из кровотока человека будет аналогичным для встречающихся в природе антител человека, что позволит вводить меньшие дозы с большими интервалами. В-третьих, вследствие того, что эффекторный участок принадлежит человеку, она будет лучше взаимодействовать с другими компонентами иммунной системы человека, например, для эффективного уничтожения целевых клеток посредством комплементзависимой цитотоксичности (CDC) или антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC).

Тем не менее, хотя считают, что антитела человека, как правило, обеспечивают эти преимущества, известно, что разработка антител человека, которые имеют достаточно высокую аффинность и подходящие функциональные свойства в качестве возможных кандидатов успешной терапии человека, никоим образом не является очевидной. Вследствие этого, в данной области все еще отсутствуют агенты, которые ингибируют индуцированный VEGF ангиогенез, для безопасного и эффективного лечения людей, и ставятся задачи по разработке таких агентов.

#### **Краткое описание изобретения**

Настоящее изобретение преодолевает некоторые ограничения в известном уровне техники путем обеспечения новых терапевтических композиций и способов для применения при антиангиогенном и противоопухолевом лечении. Настоящее изобретение основано на антителах человека, которые имеют функциональное свойство специфичного ингибирования связывания VEGF лишь с одним (VEGFR2) из двух первично чувствующих рецепторов VEGF и имеют аффинность к VEGF, достаточно высокую для эффективных схем лечения. Такие антитела ингибируют ангиогенез и лечат опухоли также эффективно, как и другие антитела к VEGF, включая уже одобренные для клинического применения, и, кроме того, имеют повышенную безопасность вследствие их специфичных блокирующих свойств. Композиции и

способы согласно настоящему изобретению также распространяются на применение иммуноконъюгатов и комбинаций, включая пролекарства, включающих особую категорию предусмотренных в настоящей заявке антител.

Особое преимущество настоящего изобретения состоит в том, что предусмотренные антитела человека ингибируют связывание VEGF только с VEGFR2, но не с VEGFR1. Это отличие от ведущих антител известного уровня техники, включая A4.6.1 и гуманизированный вариант авастин, который ингибирует связывание VEGF с обоими VEGFR2 и VEGFR1. Так как VEGFR1 играет важную биологическую роль, не связанную с ангиогенезом, например, в функционировании остеокластов и хондрокластов, данная возможность ингибировать лишь VEGFR2-опосредованный ангиогенез обеспечивает явное преимущество. Это приводит к значительной клинической пользе, заключающейся в том, что не оказывается отрицательное влияние на метаболизм костной ткани, например, при лечении педиатрического рака. Неблагоприятное действие макрофагов на прогрессирование и метастазирование опухоли также ингибируется, так как эта популяция макрофагов экспрессирует VEGFR2, который ингибируется антителами согласно настоящему изобретению.

Дополнительное преимущество состоит в том, что так как связывание VEGF с VEGFR1 сохраняется в присутствии антител согласно настоящему изобретению, их можно применять для специфичной доставки присоединенных терапевтических агентов в сосудистую сеть опухоли посредством связывания с VEGF, который связан с VEGFR1, который чрезмерно экспрессируется на эндотелии опухоли. Следовательно с точки зрения иммуноконъюгатов, настоящее изобретение обеспечивает агенты, которые имеют как антиангиогенные свойства, так и способность разрушать опухоль в пределах одной молекулы.

Еще дополнительное преимущество состоит в способности предусмотренных композиций нейтрализовать сигнал выживания VEGF, который опосредуется через VEGFR2. Изолированные и конъюгированные антитела согласно настоящему изобретению, таким образом, образуют синергические комбинации с другими методами лечения и/или присоединенными агентами, особенно такими способами и агентами, которые не смогли достигнуть максимальной эффективности *in vivo* вследствие способности VEGF противодействовать их разрушающим свойствам.

Последовательности аминокислот и/или ДНК молекул антител согласно настоящему изобретению, которые связываются с VEGF, их домены VH и VL, включающие гипервариабельные участки (CDR), описаны в различных последовательностях SEQ ID NO, перечисленных в данной заявке.

Согласно данному изобретению предложено изолированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с VEGF и которое включает по меньшей мере одну вариабельную область тяжелой цепи (VH), которая включает три гипервариабельных участка (CDR), и по меньшей мере одну вариабельную область легкой цепи (VL), которая включает три гипервариабельных участка (CDR), в котором указанная вариабельная область легкой цепи включает:

(a) CDR1 VL, который имеет последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 8, или последовательность, по существу, гомологичную ей,

(b) CDR2 VL, который имеет последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 9, или последовательность, по существу, гомологичную ей, и

(c) CDR3 VL, который имеет последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 10, или последовательность, по существу, гомологичную ей, и указанная вариабельная область тяжелой цепи включает:

(a) CDR1 VH, который имеет последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 5, или последовательность, по существу, гомологичную ей,

(b) CDR2 VH, который имеет последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 6, или последовательность, по существу, гомологичную ей, и

(c) CDR3 VH, который имеет последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 7, или последовательность, по существу, гомологичную ей,

при этом указанная, по существу, гомологичная последовательность представляет собой последовательность, включающую 1, 2 или 3 консервативные замены аминокислот по сравнению с данной последовательностью гипервариабельного участка.

Целесообразно, когда указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит гипервариабельный участок CDR1 вариабельной области легкой цепи (VL), который имеет последовательность SEQ ID NO: 8, VL CDR2, который имеет последовательность SEQ ID NO: 9, VL CDR3, который имеет последовательность SEQ ID NO: 10, гипервариабельный участок CDR1 вариабельной области тяжелой цепи (VH), который имеет последовательность SEQ ID NO: 5, VH CDR2, который имеет последовательность SEQ ID NO: 6, VH CDR3, который имеет последовательность SEQ ID NO: 7.

В некоторых воплощениях указанная вариабельная область легкой цепи имеет последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 4, или последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности с указанной последовательностью, или указанная вариабельная область тяжелой цепи имеет последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 3, или последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности с указанной последовательностью. При этом вариабельная область легкой цепи может иметь последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 4, а вариабельная

область тяжелой цепи может иметь последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 3.

В другом воплощении указанный антигенсвязывающий фрагмент имеет последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 21, или последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности с указанной последовательностью.

Иногда целесообразно, чтобы указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляли собой полностью человеческое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

В одном воплощении указанное антитело представляет собой полноразмерное антитело, включающее константную область антитела. При этом указанное антитело может представлять собой IgG антитело. При этом также указанное антитело может включать тяжелую цепь, которая имеет последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 24, или последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности с указанной последовательностью, и легкую цепь, которая имеет последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 25, или последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности с указанной последовательностью. В этом случае также указанное антитело может включать тяжелую цепь, которая имеет последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 24 и легкую цепь, которая имеет последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 25.

В одном воплощении антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, scFv, Fv, dsFv, ds-scFv, димер TandAb, линейное антитело, миниантитело, диабодии или биспецифичный фрагмент антитела.

Предложенное антитело может проявлять аффинность связывания с VEGF, которая соответствует K<sub>d</sub>, равной менее чем 10 нМ, когда указанное антитело представляет собой IgG.

Предложенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут связываться, по меньшей мере, с VEGF человека и VEGF мыши.

Согласно изобретению также предложены иммуноконъюгаты, включающий указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, присоединенное к терапевтическому или диагностическому агенту.

Целесообразно, когда в данном конъюгате указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент присоединены к радиотерапевтическому агенту, химиотерапевтическому агенту, антиангиогенному агенту, индуцирующему апоптоз агенту, антитубулиновому лекарственному препарату, цитостатическому или цитотоксическому агенту, стероиду, цитокину, хемокину или коагулянту.

В частности, может быть целесообразно, например, когда указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент присоединены к

- (a) радиоактивному изотопу мышьяка;
- (b) таксолу, доцетакселу, паклитакселу, цисплатину, гемцитабину, комбретастантину, доксорубицину или адриамицину;
- (c) ризину, гелонину, абрину, дифтерийному, токсину *pseudomonas* или коклюшному токсину;
- (d) ингибитору АТФазы типа V;
- (e) IL-2, IL-12, TNF- $\alpha$ , интерферону или LEC или
- (f) усеченному тканевому фактору.

Предложена также фармацевтическая композиция для связывания с VEGF, включающая указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или иммуноконъюгат в эффективном количестве и один или более эксципиентов, носителей, растворителей, буферов или стабилизаторов.

Указанная композиция может дополнительно включать терапевтический агент, выбранный из группы, включающей радиотерапевтический агент, химиотерапевтический агент, антиангиогенный агент, индуцирующий апоптоз агент, антитубулиновый лекарственный препарат, цитостатический или цитотоксический агент, стероид, цитокин, хемокин или коагулянт.

В некоторых воплощениях указанный терапевтический агент является химиотерапевтическим агентом. Например, указанный терапевтический агент может быть выбран из группы, состоящей из аналогов пиридина, координационных комплексов платины, камптотецинов, ингибиторов тирозинкиназ и ингибиторов рецепторных тирозинкиназ. В частности, указанный терапевтический агент может представлять собой фторурацил, капецитабин, оксалиплатин, цисплатин, карбоплатин, иринотекан, акситиниб, сунитиниб или паклитаксел.

Предложена также молекула нуклеиновой кислоты, включающая последовательность нуклеотидов, кодирующую указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

В одном воплощении указанная последовательность нуклеотидов кодирует антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое имеет последовательность аминокислот scFv, указанную в SEQ ID NO: 21, или последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности с указанной последовательностью. Например, указанная последовательность нуклеотидов представлена в SEQ ID NO: 20.

В другом воплощении указанная последовательность нуклеотидов кодирует антитело, включающее тяжелую цепь, которая имеет последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 24, или последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности с указанной последовательностью, и легкую цепь, которая имеет последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 25, или последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности с указанной последовательностью. В частности, указанная последовательность нуклеотидов, кодирующая SEQ ID NO: 24, может быть представлена

в SEQ ID NO: 22, а указанная последовательность нуклеотидов, кодирующая SEQ ID NO: 25, может быть представлена в SEQ ID NO: 23.

Предложены также вектор экспрессии, включающий указанную молекулу нуклеиновой кислоты, клетка-хозяин для получения указанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, включающая указанную молекулу нуклеиновой кислоты или вектор экспрессии, а также предложена вирусная частица, включающая указанную молекулу нуклеиновой кислоты или вектор экспрессии.

Предложен набор для применения в терапии заболевания, связанного с ангиогенезом или лимфоангиогенезом, включающий, по меньшей мере, в первом контейнере:

- (a) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент;
- (b) иммуноконъюгат;
- (c) фармацевтическую композицию;

при этом указанный набор также содержит инструкцию по применению компонентов набора.

Предложен набор для применения в визуализации или диагностике заболевания, связанного с ангиогенезом или лимфоангиогенезом, включающий, по меньшей мере, в первом контейнере:

- (a) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент;
- (b) иммуноконъюгат;
- (c) фармацевтическую композицию;

при этом указанный набор также содержит инструкцию по применению компонентов набора.

Предложен способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, включающий:

- (a) культивирование клетки-хозяина, которая включает вектор экспрессии, при условиях, эффективных для экспрессии кодируемого антитела; и
- (b) выделение экспрессированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из указанной клетки-хозяина.

Предложен способ обнаружения VEGF в образце, включающий приведение во взаимодействие образца, тестируемого на наличие VEGF, с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом или иммуноконъюгатом, при условиях, эффективных для образования комплексов VEGF/антитело или VEGF/антигенсвязывающий фрагмент, причем обнаружение комплексов, полученных таким образом, свидетельствует о наличии VEGF в указанном образце.

Предложен способ диагностики заболевания, связанного с ангиогенезом или лимфоангиогенезом, у животного, включающий:

- (a) приведение во взаимодействие *in vitro* тестируемого образца, полученного от указанного животного, с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом или иммуноконъюгатом, при условиях, эффективных для обеспечения образования комплексов VEGF/антитело или VEGF/антигенсвязывающий фрагмент;
- (b) обнаружение комплексов VEGF/антитело или VEGF/антигенсвязывающий фрагмент, полученных таким образом, и определение количества VEGF в указанном тестируемом образце;
- (c) сравнение количества VEGF в указанном тестируемом образце с количеством VEGF в соответствующем контрольном образце, при этом повышенное количество VEGF в указанном тестируемом образце по сравнению с количеством VEGF в указанном контрольном образце свидетельствует о наличии заболевания, связанного с ангиогенезом или лимфоангиогенезом.

Указанное заболевание, связанное с ангиогенезом или лимфоангиогенезом, может представлять собой рак, офтальмологическое неоваскулярное заболевание, дистрофию желтого пятна, возрастную дистрофию желтого пятна, артрит, ревматоидный артрит, атеросклероз, диабетическую ретинопатию, гиперплазию щитовидной железы, болезнь Грейвса, гемангиому, неоваскулярную глаукому или псориаз.

Предложен способ ингибирования ангиогенеза или лимфоангиогенеза, включающий введение терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или иммуноконъюгата животному.

В некоторых воплощениях указанное животное страдает от рака или офтальмологического неоваскулярного заболевания.

В частности, указанное животное представляет собой человека.

Предложен способ лечения заболевания, связанного с ангиогенезом, включающий введение животному, в частности человеку, страдающему от указанного заболевания, терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или иммуноконъюгата.

Указанное заболевание может представлять собой офтальмологическое неоваскулярное заболевание, дистрофию желтого пятна, возрастную дистрофию желтого пятна, артрит, ревматоидный артрит, атеросклероз, диабетическую ретинопатию, гиперплазию щитовидной железы, болезнь Грейвса, гемангиому, неоваскулярную глаукому или псориаз.

В частности, указанное заболевание представляет собой рак.

В некоторых воплощениях предложенный способ дополнительно включает введение второго терапевтического агента, выбранного из группы, включающей радиотерапевтический агент, химиотерапевтический агент, антиангиогенный агент, индуцирующий апоптоз агент, антитубулиновый лекарственный препарат, цитостатический или цитотоксический агент, стероид, цитокин, хемокин или коагулянт, ука-

занному животному.

Предложен также способ лечения заболевания, связанного с лимфоангиогенезом, включающий введение животному, в частности человеку, страдающему от указанного заболевания, терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или иммуноконъюгата.

В частности, указанное заболевание представляет собой рак.

Предложено также применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или иммуноконъюгата в производстве лекарственного средства для лечения заболевания, связанного с ангиогенезом или лимфоангиогенезом. Указанное лечение, в частности, осуществляют в отношении человека.

При этом указанное заболевание может быть выбрано из группы, состоящей из рака, офтальмологического неоваскулярного заболевания, дистрофии желтого пятна, возрастной дистрофии желтого пятна, артрита, ревматоидного артрита, атеросклероза, диабетической ретинопатии, гиперплазии щитовидной железы, болезни Грейвса, гемангиомы, неоваскулярной глаукомы и псориаза.

В одном из воплощений это лекарственное средство дополнительно включает второй терапевтический агент, выбранный из группы, включающей радиотерапевтический агент, химиотерапевтический агент, антиангиогенный агент, индуцирующий апоптоз агент, антифибринозный лекарственный препарат, цитостатический или цитотоксический агент, стероид, цитокин, хемокин или коагулянт.

Здесь также раскрыто антитело, которое связывается с VEGF, включающее домен CDR1 тяжелой цепи, включающий последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 5, или последовательность, по существу, гомологичную ей.

В качестве альтернативы или дополнения антитело, которое связывается с VEGF, включает домен CDR2 тяжелой цепи, включающий последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 6, или последовательность, по существу, гомологичную ей.

В качестве альтернативы или дополнения антитело, которое связывается с VEGF, включает домен CDR3 тяжелой цепи, включающий последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 7, или последовательность, по существу, гомологичную ей.

В качестве альтернативы или дополнения антитело, которое связывается с VEGF, включает домен CDR1 легкой цепи, включающий последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 8, или последовательность, по существу, гомологичную ей.

В качестве альтернативы или дополнения антитело, которое связывается с VEGF, включает домен CDR2 легкой цепи, включающий последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 9, или последовательность, по существу, гомологичную ей.

В качестве альтернативы или дополнения антитело, которое связывается с VEGF, включает домен CDR3 легкой цепи, включающий последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 10, или последовательность, по существу, гомологичную ей.

Таким образом, здесь раскрыто антитело, которое связывается с VEGF, включающее один или более доменов CDR тяжелой цепи, при этом домен CDR тяжелой цепи выбран из группы, состоящей из

(a) домена CDR1 тяжелой цепи, включающего последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 5, или последовательность, по существу, гомологичную ей;

(b) домена CDR2 тяжелой цепи, включающего последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 6, или последовательность, по существу, гомологичную ей; и

(c) домена CDR3 тяжелой цепи, включающего последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 7, или последовательность, по существу, гомологичную ей.

Также раскрыто антитело, которое связывается с VEGF, включающее один или более доменов CDR легкой цепи, при этом домен CDR легкой цепи выбран из группы, состоящей из

(a) домена CDR1 легкой цепи, включающего последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 8, или последовательность, по существу, гомологичную ей;

(b) домена CDR2 легкой цепи, включающего последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 9, или последовательность, по существу, гомологичную ей; и

(c) домена CDR3 легкой цепи, включающего последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 10, или последовательность, по существу, гомологичную ей.

В некоторых примерах, приведенных здесь, антитело, которое связывается с VEGF, включает как

(a) гипервариабельный участок CDR3 тяжелой цепи, включающий последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 7, или последовательность, по существу, гомологичную ей, так и

(b) гипервариабельный участок CDR3 легкой цепи, включающий последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 10, или последовательность, по существу, гомологичную ей.

В других примерах домен CDR1 тяжелой цепи, включающий последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 5, или последовательность, по существу, гомологичную ей, и/или домен CDR1 легкой цепи, включающий последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 8, или последовательность, по существу, гомологичную ей; и/или домен CDR2 тяжелой цепи, включающий последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 6, или последовательность, по существу, гомологичную ей, и/или домен CDR2 легкой цепи, включающий последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 9, или последовательность, по существу, гомологичную ей, также присутствуют.





последовательностей, по существу, гомологичных им).

Другие некоторые предпочтительные антитела включают два или более гипервариабельных участка тяжелой цепи с последовательностями SEQ ID NO: 5, 6 или 7 или последовательностями, по существу, гомологичными любой из вышеуказанных последовательностей SEQ ID NO. Особенно предпочтительные связывающие молекулы включают 3 гипервариабельных участка тяжелой цепи с последовательностями SEQ ID NO: 5, 6 и 7 или последовательностями, по существу, гомологичными любой из вышеуказанных последовательностей SEQ ID NO (т.е. по одному из каждого вышеуказанного гипервариабельного участка CDR1, и гипервариабельного участка CDR2, и гипервариабельного участка CDR3 тяжелой цепи или последовательностей, по существу, гомологичных им).

Некоторые особенно предпочтительные антитела включают 3 гипервариабельных участка легкой цепи с последовательностями SEQ ID NO: 8, 9 или 10 или последовательностями, по существу, гомологичными любой из этих последовательностей (т.е. по одному из каждого вышеуказанного гипервариабельного участка CDR1, и гипервариабельного участка CDR2, и гипервариабельного участка CDR3 легкой цепи или последовательностей, по существу, гомологичных им), и 3 гипервариабельных участка тяжелой цепи с последовательностями SEQ ID NO: 5, 6 или 7 или последовательностями, по существу, гомологичными любой из этих последовательностей (т.е. по одному из каждого вышеуказанного гипервариабельного участка CDR1, и гипервариабельного участка CDR2, и гипервариабельного участка CDR3 тяжелой цепи или последовательностей, по существу, гомологичных им).

Некоторые особенно предпочтительные антитела включают домен CDR1 тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 5, домен CDR2 тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 6 и домен CDR3 тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 7 или с последовательностями, по существу, гомологичными любой из вышеуказанных последовательностей;

и/или включают

домен CDR1 легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 8,

домен CDR2 легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 9 и

домен CDR3 легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 10

или с последовательностями, по существу, гомологичными любой из вышеуказанных последовательностей.

В дополнительном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает антитело, которое связывается с VEGF, которое включает по меньшей мере одну вариабельную область тяжелой цепи, которая включает три гипервариабельных участка, и по меньшей мере одну вариабельную область легкой цепи, которая включает три гипервариабельных участка, при этом указанная вариабельная область легкой цепи включает:

(i) гипервариабельный участок CDR1 вариабельной области легкой цепи (VL), который имеет последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 8,

(ii) гипервариабельный участок CDR2 VL, который имеет последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 9, и

(iii) гипервариабельный участок CDR3 VL, который имеет последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 10.

В одном аспекте этого варианта реализации один или более из указанных гипервариабельных участков вариабельной области тяжелой цепи выбраны из группы, состоящей из

(i) гипервариабельного участка CDR1 VH, который имеет последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 5,

(ii) гипервариабельного участка CDR2 VH, который имеет последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 6, и

(iii) гипервариабельного участка CDR3 VH, который имеет последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 7.

В дополнительном аспекте этого варианта реализации два из указанных гипервариабельных участков вариабельной области тяжелой цепи выбраны из группы, состоящей из

(i) гипервариабельного участка CDR1 VH, который имеет последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 5,

(ii) гипервариабельного участка CDR2 VH, который имеет последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 6, и

(iii) гипервариабельного участка CDR3 VH, который имеет последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 7.

В еще одном дополнительном аспекте этого варианта реализации три указанных гипервариабельных участка вариабельной области тяжелой цепи выбраны из группы, состоящей из

(i) гипервариабельного участка CDR1 VH, который имеет последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 5,

(ii) гипервариабельного участка CDR2 VH, который имеет последовательность аминокислот, ука-

занную в SEQ ID NO: 6, и

(iii) гипервариабельного участка CDR3 VH, который имеет последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 7.

Некоторые дополнительные варианты реализации настоящего изобретения обеспечивают антитело, которое связывается с VEGF и которое включает домен VH, который включает один, два или три из гипервариабельных участков тяжелой цепи с последовательностями SEQ ID NO: 5, 6 или 7 или последовательности, по существу, гомологичные одной или более последовательностям SEQ ID NO: 5, 6 или 7, и/или домен VL, который включает один, два или три из гипервариабельных участков легкой цепи с последовательностями SEQ ID NO: 8, 9 или 10 или последовательности, по существу, гомологичные одной или более последовательностям SEQ ID NO: 8, 9 или 10.

Согласно настоящему изобретению домены VL включают 3 гипервариабельных участка легкой цепи с последовательностями SEQ ID NO: 8, 9 и 10 или последовательности, по существу, гомологичные одной или более последовательностям SEQ ID NO: 8, 9 или 10 (т.е. по одному из каждого гипервариабельного участка CDR1, гипервариабельного участка CDR2 и гипервариабельного участка CDR3 или последовательностей, по существу, гомологичных им).

Согласно настоящему изобретению домены VH включают 3 гипервариабельных участка тяжелой цепи с последовательностями SEQ ID NO: 5, 6 и 7 или последовательности, по существу, гомологичные одной или более последовательностям SEQ ID NO: 5, 6 или 7 (т.е. по одному из каждого гипервариабельного участка CDR1, гипервариабельного участка CDR2 и гипервариабельного участка CDR3 или последовательностей, по существу, гомологичных им).

В дополнительных предпочтительных вариантах реализации настоящего изобретения обеспечивается антитело, которое связывается с VEGF и которое включает домен VL, который включает 3 гипервариабельных участка легкой цепи с последовательностями SEQ ID NO: 8, 9 и 10, и домен VH, который включает 3 гипервариабельных участка тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO: 5, 6 и 7.

В некоторых предпочтительных вариантах реализации настоящего изобретения обеспечивается антитело, которое связывает VEGF, включающее домен VH, который имеет последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 3, или последовательность, по существу, гомологичную ей, и/или домен VL, который имеет последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 4, или последовательность, по существу, гомологичную ей.

В дополнительных предпочтительных вариантах реализации обеспечено антитело, которое связывает VEGF, включающее домен VL, который имеет последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 4, и домен VH имеет последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 3.

В еще одном дополнительном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает антитело, которое связывает VEGF, включающее последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 21 (указанное антитело также называют в данной заявке r84, или PGN311, или EJ173/112-C11), или включающее ее фрагмент, который связывает VEGF, или последовательность, по существу, гомологичную ей.

В дополнительном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает антитело, которое связывает VEGF, включающее последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 21 (указанное антитело также называют в данной заявке r84, или PGN311, или EJ173/112-C11), или включающее ее фрагмент, который связывает VEGF.

Примером настоящего изобретения является моноклональное антитело r84 (также называемое в данной заявке PGN311 и EJ-173-112-C11), одноцепочечная форма которого представлена на фиг. 1 (SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 20) и полноразмерная IgG-форма которого представлена в примере 6. Домены CDR, домены VH и VL r84 антитела представлены в табл. 1 и на фиг. 1. Антитела, включающие эти домены CDR или домены VH и VL (или последовательности, по существу, гомологичные им) представляют собой предпочтительные аспекты настоящего изобретения.

Предпочтительный вариант реализации настоящего изобретения представляет собой scFv-форму антитела r84, представленную в SEQ ID NO: 21 (аминокислоты), которая предпочтительно кодируется последовательностью SEQ ID NO: 20 (нуклеиновые кислоты).

Другой предпочтительный вариант реализации настоящего изобретения представляет собой полноразмерную IgG-форму антитела r84, тяжелая цепь которого представлена в SEQ ID NO: 24 (аминокислоты), которая предпочтительно кодируется последовательностью SEQ ID NO: 22 (нуклеиновые кислоты); и легкая цепь которого представлена в SEQ ID NO: 25 (аминокислоты), которая предпочтительно кодируется последовательностью SEQ ID NO: 23 (нуклеиновые кислоты).

Некоторые примеры, по существу, гомологичных последовательностей представляют собой последовательности, которые по меньшей мере на 70% идентичны описанным последовательностям аминокислот.

В некоторых вариантах реализации антитела согласно настоящему изобретению, которые связываются с VEGF, включают по меньшей мере одну вариабельную область легкой цепи, которая включает участок последовательности аминокислот, по меньшей мере, обладающий приблизительно 75%, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 80%, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 85%, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 90 или 95% и наиболее

предпочтительно по меньшей мере приблизительно 97, 98 или 99% идентичностью аминокислотной последовательности относительно последовательности аминокислот, указанной в SEQ ID NO: 4; и/или по меньшей мере одну переменную область тяжелой цепи, которая включает участок последовательности аминокислот, по меньшей мере, обладающий приблизительно 75%, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 80%, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 85%, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 90 или 95% и наиболее предпочтительно по меньшей мере приблизительно 97, 98 или 99% идентичностью аминокислотной последовательности относительно последовательности аминокислот, указанной в SEQ ID NO: 3.

Другие предпочтительные примеры, по существу, гомологичных последовательностей представляют собой последовательности, включающие консервативные замены аминокислот в описанных последовательностях аминокислот.

Другие предпочтительные примеры, по существу, гомологичных последовательностей представляют собой последовательности, включающие 1, 2 или 3, предпочтительно 1 или 2 замененные аминокислоты в одном или более описанных гипервариабельных участках. Такие изменения могут представлять собой консервативные или неконсервативные замены аминокислот или их смеси.

Во всех таких вариантах реализации предпочтительные изменения представляют собой консервативные замены аминокислот.

Во всех вариантах реализации антитела, включающие, по существу, гомологичные последовательности, сохраняют способность связывать VEGF.

В вариантах реализации настоящего изобретения, в которых предполагаются изменения в домене CDR3 легкой цепи, предпочтительно, чтобы L остаток в положении 8 в указанном гипервариабельном участке оставался без изменения.

Другие варианты реализации настоящего изобретения обеспечивают связывающие белки, которые связываются с VEGF, и которые включают антитело согласно настоящему изобретению, домен VH или VL согласно настоящему изобретению или один или более из гипервариабельных участков согласно настоящему изобретению. В предпочтительном варианте реализации такие связывающие белки представляют собой антитела.

Предпочтительные антитела согласно настоящему изобретению включают по меньшей мере одну переменную область тяжелой цепи, которая включает три гипервариабельных участка, и по меньшей мере одну переменную область легкой цепи, которая включает три гипервариабельных участка. Типичные и предпочтительные последовательности для этих гипервариабельных участков описаны в данной заявке.

В данной заявке краткий термин "VEGF", если не указано иное или как очевидно из научной терминологии, означает Фактор А роста эндотелия сосудов (VEGF-A), также называемый фактором сосудистой проницаемости, VPF.

"VEGF" также означает любую форму VEGF, в частности потому, что VEGF устойчив среди видов млекопитающих. Антитела или фрагменты антител согласно настоящему изобретению могут, таким образом, связываться, например, с VEGF человека, обезьяны, коровы (быка), мыши, крысы, хомяка, хорька, морской свинки и/или кролика. Предпочтительно антитела или фрагменты антител согласно настоящему изобретению будут связываться, по меньшей мере, с VEGF человека. В некоторых предпочтительных вариантах реализации антитела или фрагменты антител согласно настоящему изобретению будут связываться, по меньшей мере, с VEGF человека и мыши.

В данной заявке термин "который связывает VEGF" с точки зрения антител или фрагментов антител согласно настоящему изобретению означает антитела или фрагменты антител человека, которые способны на одно или более из перечисленных далее действий; предпочтительно на более чем одно из перечисленных далее действий и наиболее предпочтительно на все из перечисленных далее действий:

- (a) связываться с неконформационно зависимым эпитопом VEGF по оценке в отношении связывания с VEGF в анализе вестерн-блоттинга;
- (b) связываться со свободным VEGF или с VEGF на твердой подложке;
- (c) связываться, по меньшей мере, с VEGF человека и VEGF мыши;
- (d) значительно ингибировать или значительно снижать связывание VEGF с рецептором к VEGF - VEGFR2 (KDR/Flk-1);
- (e) незначительно ингибировать VEGF или снижать связывание с рецептором к VEGF - VEGFR1 (Flt-1);
- (f) ингибировать и предпочтительно значительно ингибировать VEGF-индуцируемое фосфорилирование VEGFR2;
- (g) ингибировать и предпочтительно значительно ингибировать VEGF-индуцируемую сосудистую проницаемость;
- (h) ингибировать и предпочтительно значительно ингибировать VEGF-опосредованную пролиферацию эндотелиальных клеток;
- (i) ингибировать и предпочтительно значительно ингибировать ангиогенез;
- (j) ингибировать и предпочтительно значительно ингибировать лимфоангиогенез;

(к) незначительно ингибировать VEGFR1-опосредованную стимуляцию или активацию клеток, таких как VEGFR1-экспрессирующие остеокласты или хондрокласты; и/или

(l) локализоваться в сосудистой сети опухоли и/или строме опухоли при введении животному с васкуляризированной опухолью.

Наиболее предпочтительно антитело или фрагмент антитела человека согласно настоящему изобретению такие, что они значительно ингибируют связывание VEGF с рецептором VEGF - VEGFR2 (KDR/Flk-1), не вызывая значительного ингибирования связывания VEGF с рецептором VEGF - VEGFR1 (Flt-1).

Настоящее изобретение, таким образом, обеспечивает антитела человека, которые специфично блокируют связывание VEGF с рецептором VEGFR2, или которые блокируют связывание VEGF, по существу, только с рецептором VEGFR2. Такие антитела человека значительно ингибируют связывание VEGF с рецептором VEGFR2 (KDR/Flk-1), не вызывая значительного ингибирования связывания VEGF с рецептором VEGFR1 (Flt-1). Такие антитела человека, таким образом, ингибируют связывание VEGF с рецептором VEGFR2 (KDR/Flk-1), по существу, не ингибируют связывание VEGF с рецептором VEGFR1 (Flt-1), проявляют антиангиогенные и противоопухолевые эффекты *in vivo* и значительно не ингибируют VEGFR1-опосредованные явления, такие как функции остеокластов или хондрокластов.

Антитела человека согласно настоящему изобретению, таким образом, кратко называют "блокирующими VEGFR2, не блокирующими VEGFR1, антителами человека к VEGF". Еще короче их называют "блокирующими VEGFR2 антителами человека к VEGF", этот термин применяется для упрощения в отношении всех композиций, применений и способов согласно настоящему изобретению. "Блокирующее VEGFR2 антитело человека к VEGF" представляет собой антитело человека к VEGF, которое блокирует связывание VEGF с рецептором VEGFR2. Очевидно, что такие антитела не являются антителами к самому рецептору VEGFR2.

В свете настоящего изобретения, следовательно, можно получить диапазон блокирующих VEGFR2 антител человека к VEGF и применять их для целого ряда вариантов реализации, включая ингибирование ангиогенеза и лечение ангиогенных заболеваний и опухолей, не ингибируя при этом передачу сигналов VEGF через рецептор VEGFR1, без заметных недостатков и побочных эффектов, связанных с ним.

В некоторых вариантах реализации в настоящей заявке дополнительно описана методика получения подходящих блокирующих VEGFR2 антител человека к VEGF и стандартные технические аспекты проведения анализов, требуемых для идентификации фактических блокирующих VEGFR2 специфичных антител из числа возможных кандидатов.

"Антитело" в данной заявке означает "по меньшей мере, первое антитело". Рабочие пределы и параметры комбинаций, например количество какого-либо отдельного агента, известны рядовым специалистам в данной области техники в свете настоящего описания.

Антитела человека согласно настоящему изобретению, которые "специфично ингибируют связывание VEGF с рецептором VEGF - VEGFR2 (KDR/Flk-1)", можно идентифицировать с помощью конкурентных и/или функциональных тестов. Предпочтительными тестами для упрощения являются конкурентные тесты, основанные на твердофазном иммуноферментном анализе (ELISA). В конкурентных тестах предварительно смешивают или добавляют в смесь VEGF варьируемые количества тестируемых антител (например, от 100-кратного до 1000-кратного молярного избытка, например 500-кратный или 750-кратный молярный избыток) и определяют способность тестируемых антител ослаблять связывание VEGF с VEGFR2. VEGF можно предварительно пометить и детектировать непосредственно или можно детектировать, применяя (вторичное) антитело к VEGF или систему детектирования вторичным и третичным антителом. Формат ELISA такого конкурентного анализа представляет собой предпочтительный формат, но можно использовать любой тип иммуноконкурентного анализа.

Связывание VEGF с VEGFR2 в присутствии полностью неподходящего антитела (включая неблокирующие моноклональные антитела к VEGF) дает контрольное верхнее значение (100%) в таком конкурентном тесте. В тесте значительное снижение связывания VEGF с VEGFR2 в присутствии тестируемого антитела свидетельствует о том, что тестируемое антитело значительно ингибирует связывание VEGF с рецептором VEGF - VEGFR2 (KDR/Flk-1).

Значительное ослабление представляет собой "воспроизводимое", т.е. наблюдаемое постоянно, ослабление связывания. "Значительное ослабление" в аспекте настоящей заявки определено как воспроизводимое ослабление (связывания VEGF с VEGFR2) по меньшей мере на приблизительно 50%, приблизительно 55%, приблизительно 60% или приблизительно 65% при любом количестве между приблизительно 100-кратным и приблизительно 1000-кратным (например, приблизительно 500-кратным или приблизительно 750-кратным) молярным избытком антитела над VEGF. В альтернативном рассмотрении сигнал, меньший чем 50% (по сравнению с контрольным значением в 100%), рассматривают как значительное ингибирование связывания.

Предпочтительным признаком настоящего изобретения является то, что обеспеченные антитела человека существенно или значительно не ингибируют, не ослабляют или не блокируют связывание VEGF с VEGFR1. Антитела человека, которые проявляют умеренное ослабление связывания VEGF с VEGFR2, будут полезны при условии, что они, по существу, не ингибируют связывание VEGF с VEGFR1. Тем не

менее, более предпочтительными антителами будут такие, которые имеют более значительную способность ингибировать связывание VEGF с VEGFR2. Эти антитела представляют собой такие, которые проявляют воспроизводимую способность ослаблять связывание VEGF с VEGFR2 по меньшей мере на приблизительно 70%, приблизительно 75% или приблизительно 80% при любом количестве между приблизительно 100-кратным и приблизительно 1000-кратным (например, приблизительно 500-кратным или приблизительно 750-кратным) молярным избытком антитела над VEGF. Хотя это не является необходимым для реализации настоящего изобретения, но антитела, которые ослабляют связывание VEGF с VEGFR2 по меньшей мере на приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 95% или более, ни в коем случае не исключены.

Антитела человека к VEGF или их антиген-связывающие фрагменты, которые ингибируют связывание VEGF с рецептором VEGF - VEGFR2 (KDR/Flk-1), не вызывая значительного ингибирования связывания VEGF с рецептором VEGF - VEGFR1 (Flt-1), легко исследуют с помощью простых конкурентных тестов, таких как описанные выше, но с применением VEGFR1.

Отсутствие значительного ингибирования или ослабления представляет собой "воспроизводимое", т.е. наблюдаемое постоянно, "существенное сохранение связывания". "Существенное сохранение связывания" в аспекте настоящей заявки определено как воспроизводимое сохранение (связывания VEGF с VEGFR1) по меньшей мере на приблизительно 60%, приблизительно 75%, приблизительно 80% или приблизительно 85% при любом количестве между приблизительно 100-кратным и приблизительно 1000-кратным молярным избытком антитела над VEGF.

Идея применения антител человека, которые, по существу, не ингибируют связывание VEGF с VEGFR1, состоит в том, чтобы сохранить биологические функции, опосредованные VEGFR1. Вследствие этого, антитело должно лишь сохранить достаточное связывание VEGF с VEGFR1 таким образом, чтобы индуцировался биологический ответ на VEGF. Тем не менее, более предпочтительными антителами будут такие, которые проявляют более существенную способность сохранения связывания VEGF с VEGFR1. Эти антитела представляют собой такие, которые проявляют воспроизводимую способность сохранять связывание VEGF с VEGFR1 на уровне, составляющем по меньшей мере приблизительно 88%, приблизительно 90%, приблизительно 92%, приблизительно 95% или приблизительно 98-99% при любом количестве между приблизительно 100-кратным и приблизительно 1000-кратным молярным избытком антитела над VEGF.

Очевидно, что антитела человека, которые более существенно ингибируют связывание VEGF с VEGFR2, вероятно, могут допускать большее снижение связывания с VEGFR1. В равной мере, если антитело проявляет умеренное снижение связывания VEGF с VEGFR2, следует более настоятельно добиваться сохранения связывания с VEGFR1.

Другой предпочтительный тест на связывание для идентификации и/или подтверждения того, что антитело ингибирует связывание VEGF с рецептором VEGF - VEGFR2 (KDR/Flk-1), представляет собой тест на соосаждение (преципитацию). В тесте на соосаждение проверяется способность антитела блокировать связывание VEGF с одним или более рецепторами в растворе. В таком анализе VEGF или меченый детектируемой меткой VEGF инкубируют с подходящей формой рецептора.

Существует множество форматов для проведения иммунопреципитации или тестов на преципитацию. В данном случае "подходящая форма рецептора" может представлять собой рассматриваемый рецептор VEGFR2 или внеклеточный домен указанного рецептора. Для иммунопреципитации тогда потребуется помимо стандартных реагентов присутствие антитела к рецептору VEGFR2 или эпиту на внеклеточном домене указанного рецептора, отличного от сайта, с которым связывается VEGF. Настоящее изобретение обеспечивает другие "подходящие" формы рецепторов VEGF, а именно внеклеточные домены рецепторов, связанные с Fc-областью антитела. Такие конструкции рецептор/Fc можно осаждать путем инкубирования с эффективной иммунопреципитирующей композицией, такой как композиция, основанная на белке А.

Вне зависимости от подходящего рецептора тесты на иммунопреципитацию или преципитацию предпочтительно осуществляют в присутствии контрольных образцов. Способность VEGF исключительно связываться с выбранным рецептором следует подтверждать с помощью осаждения в отсутствие антитела к VEGF. Предпочтительно параллельные инкубации осуществляют в присутствии или в отсутствие антитела с известными связывающими свойствами, которое выступает в качестве контроля. Наиболее предпочтительно тесты с применением как блокирующего контрольного, так и неблокирующего контрольного антител проводят параллельно.

Любые связавшиеся иммунологические образцы затем иммунопреципитируют, например, путем инкубирования с эффективной иммунопреципитирующей композицией, такой как композиция с белком А или сефарозные гранулы с белком А. Полученный осадок (преципитат) затем тестируют на присутствие VEGF. Если VEGF при исходном инкубировании представлял собой меченный детектируемой меткой VEGF, такой как меченный радиоизотопной меткой VEGF, этот VEGF можно непосредственно детектировать в иммунопреципитатах. Немеченный VEGF можно детектировать в иммунопреципитатах с помощью других подходящих средств, например путем разделения в геле и путем иммунологического детектирования с помощью антитела к VEGF.

Способность антитела человека блокировать связывание VEGF с рецептором VEGF, таким как VEGFR2, в таком тесте на соосаждение можно легко проанализировать количественно, хотя качественные результаты также представляют ценность. Количественный анализ можно провести путем непосредственного измерения меченого VEGF или, например, с помощью денситометрических анализов иммунологически детектируемого VEGF. Таким образом, можно детектировать антитела, которые проявляют воспроизводимую, т.е. наблюдаемую постоянно, способность ингибировать связывание VEGF с VEGFR2, и можно выбрать эффективные антитела согласно количественным критериям, приведенным выше.

Антитела человека к VEGF, которые незначительно ингибируют связывание VEGF с рецептором VEGF - VEGFR1 (Fit-1), также можно легко идентифицировать путем проведения тестов на соосаждение, описанных выше, но с применением VEGFR1 вместо VEGFR2. Вследствие этого, антитела против VEGF, которые ингибируют связывание VEGF с рецептором VEGF - VEGFR2 (KDR/Flk-1), не вызывая значительного ингибирования связывания VEGF с рецептором VEGF - VEGFR1 (Flt-1), также можно легко идентифицировать, применяя такие способы.

Настоящая заявка также обеспечивает различные функциональные тесты для идентификации и/или подтверждения того, что антитело человека значительно ингибирует связывание VEGF с рецептором VEGF - VEGFR2 (KDR/Flk-1). Они, как правило, связаны с идентификацией VEGFR2 как рецептора, ответственного за некоторые определенные биологические ответы. Хотя предшествующие тесты конкурентного типа, которые осуществляются в бесклеточных системах, являются наиболее воспроизводимыми, достоверными, трудосберегающими и экономически эффективными, следующие тесты также полезны в контексте настоящего изобретения.

Например, блокирующее VEGFR2 антитело человека к VEGF можно идентифицировать с помощью тестирования на способность ингибировать опосредованный VEGF рост эндотелиальных клеток (ингибирование митогенной активности VEGF). Можно использовать любой подходящий анализ, применяя любые из множества эндотелиальных клеток в присутствии VEGF с добавлением или без тестируемых антител. Предпочтительно повторные тесты проводят параллельно, например тесты без VEGF и с контрольными антителами, обладающими определенными свойствами (как блокирование, так и отсутствие блокирования). Рост эндотелиальных клеток можно определить и предпочтительно точно перевести в количественное выражение с помощью любых приемлемых средств определения количества клеток, включая колориметрические анализы.

Антитело человека, обладающее способностью ингибировать опосредованный VEGF рост эндотелиальных клеток, как правило, будет проявлять постоянно наблюдаемое ингибирование опосредованного VEGF роста эндотелиальных клеток на приблизительно 25, 30, 35, 40 45 или 50% или около того. Ингибирование в таких диапазонах будет свидетельствовать о свойствах антитела, достаточных для ингибирования ангиогенеза *in vivo*. Антитела с более значительной ингибиторной активностью не исключаются из настоящего изобретения.

Дополнительные функциональные тесты для идентификации антител человека в соответствии с настоящим изобретением представляют собой анализы для проверки блокирования VEGF-индуцируемого фосфорилирования. Можно использовать любой подходящий анализ, применяя любые из множества эндотелиальных клеток, которые экспрессируют любую форму нативного или рекомбинантного фосфорилируемого VEGFR2. Клетки инкубируют с VEGF в присутствии или отсутствии антитела, которое нужно протестировать, в течение подходящего периода времени. Предпочтительно повторные тесты проводят параллельно, например тесты без VEGF и с контрольными антителами, обладающими определенными свойствами (как блокирование, так и отсутствие блокирования).

VEGF-индуцируемое фосфорилирование VEGFR2 можно определить и предпочтительно точно перевести в количественное выражение с помощью любых приемлемых средств. Как правило, VEGFR2 иммунопреципитируют для проведения дополнительных анализов. Степень фосфорилирования VEGFR2 можно определить непосредственно, например клетки можно инкубировать с  $^{32}\text{P}$ -меченым АТФ, обеспечивая непосредственный количественный анализ  $^{32}\text{P}$  в иммунопреципитированном VEGFR2. Предпочтительно, иммунопреципитированный VEGFR2 анализируют с помощью других средств, например путем разделения в геле и иммунологического детектирования с антителом, которое связывается с остатками фосфотирозина. Антитело человека, обладающее способностью ингибировать VEGF-индуцируемое фосфорилирование VEGFR2, как правило, будет проявлять постоянно наблюдаемое снижение уровней фосфорилирования VEGFR2.

Дополнительные функциональные тесты для идентификации блокирующих VEGFR2 антител человека к VEGF в соответствии с настоящим изобретением представляют собой тесты для проверки ингибирования VEGF-индуцируемой сосудистой проницаемости. Хотя можно применять любой из таких тестов, особенно подходящим тестом является анализ проницаемости сосудов по Майлсу, в котором животным, таким как морские свинки, инъецируют краситель, такой как синий краситель Эванса, и определяют появление красителя на коже животного после введения VEGF в присутствии или отсутствии тестируемых антител. Предпочтительно повторные испытания проводят параллельно, например тесты без VEGF и с контрольными антителами, обладающими определенными свойствами (как блокирование, так

и отсутствие блокирования). Появление красителя на коже животного обычно происходит в виде пятен, таких как голубые пятна, на спине животного, которые можно сфотографировать и измерить.

Блокирующие VEGFR2 антитела человека к VEGF будут ингибировать VEGF-индуцируемую сосудистую проницаемость в виде постоянно наблюдаемого ингибирования при низких концентрациях, таких как 100-кратный или 1000-кратный молярный избыток над VEGF. Антитела, которые не блокируют связывание VEGF с VEGFR2, не проявят значительного ингибирования VEGF-индуцируемой сосудистой проницаемости. Как правило, антитела, которые блокируют VEGF-индуцируемую проницаемость лишь при высоких концентрациях, таких как 10-кратный молярный избыток над VEGF, не будут являться антителами со свойствами в соответствии с настоящим изобретением.

Общепринятыми функциональными тестами для ангиогенеза и, следовательно, антиангиогенных агентов являются анализ неоваскуляризации методом микрокармана в роговице и анализ хориоаллантоисной мембраны цыпленка (CAM). Патент США № 5712291 специально включен в данную заявку посредством ссылки, чтобы показать, что анализы микрокармана в роговице и CAM достаточно хорошо прогнозируются для идентификации агентов для применения при лечении чрезвычайно широкого диапазона ангиогенных заболеваний.

Патент США № 5001116 также специально включен в данную заявку посредством ссылки с целью описания теста CAM. По существу, оплодотворенных куриных зародышей удаляли из скорлупы на 3 или 4 день и имплантировали метилцеллюлозный диск, включающий тестируемое соединение, на хориоаллантоисную мембрану. Зародышей исследовали приблизительно через 48 ч после этого и, если появлялась четкая бессосудистая зона вокруг метилцеллюлозного диска, измеряли диаметр этой зоны. В патенте США № 5712291, специально для этого включенном в данную заявку посредством ссылки, в контексте настоящего изобретения, описано, что появление какой-либо бессосудистой зоны достаточно для доказательства антиангиогенности антитела. Чем больше эта зона, тем более эффективно указанное антитело.

Анализ неоваскуляризации методом микрокармана в роговице можно осуществить, используя роговицы крысы или кролика. Эта модель *in vivo* широко распространена для предсказания клинической пользы, о чем свидетельствуют патенты США №№ 5712291 и 5871723, которые специально включены в данную заявку посредством ссылки для наглядности. Хотя не предполагается, что эти тесты особенно уместны в настоящем изобретении, тесты с роговицей являются предпочтительными над тестом CAM, потому что они, как правило, позволят выявить соединения, которые неактивны *per se*, но метаболизируются с получением активных соединений.

В настоящем изобретении анализ методом микрокармана в роговице применяется для идентификации антиангиогенного агента. Об этом свидетельствует значительное снижение ангиогенеза, представленное постоянно наблюдаемым и предпочтительно выраженным уменьшением количества кровеносных сосудов в роговице. Такие ответы предпочтительно определяют в роговицах, в которых возникают лишь случайные отростки и/или петли шпильки, которые не проявляют признаков продолжительного роста при приведении во взаимодействие с тестируемым веществом.

Заявленное изобретение является возможным (реализуемым) в соответствии с настоящим описанием и легкодоступными технологическими рекомендациями, "ноу-хау" и исходными материалами.

Некоторыми предпочтительными вариантами реализации настоящего изобретения, следовательно, являются композиции, включающие, по меньшей мере, первое антитело человека к VEGF согласно настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент.

Антитела человека к VEGF или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфично ингибируют связывание VEGF с рецептором VEGF - VEGFR2 (KDR/Flk-1); и антитела к VEGF или их антигенсвязывающие фрагменты, которые ингибируют связывание VEGF с рецептором VEGF - VEGFR2 (KDR/Flk-1), не вызывая значительного ингибирования связывания VEGF с рецептором VEGF - VEGFR1 (Flt-1), образуют другие аспекты настоящего изобретения.

Антитела человека с требуемыми комбинациями свойств можно легко идентифицировать с помощью одного или более или комбинации тестов конкурентирования рецепторов, ELISA, соосаждения и/или функциональных тестов, описанных выше. Руководство, касающееся количественной оценки антител, которые постоянно значительно ослабляют связывание VEGF с VEGFR2 и которые постоянно значительно не ингибируют связывание VEGF с VEGFR1, приведено выше.

В данной заявке показано, что r84 уменьшает количество VEGF, который связывается с покрытыми VEGFR2 лунками ELISA, до приблизительно 11 и 2%, соответственно, при 100-кратном и 500-кратном молярном избытке над VEGF. Эти данные соответствуют снижению связывания VEGF с VEGFR2 приблизительно на 89% и приблизительно на 98% соответственно. В данной заявке показано, что r84 сохраняет количество VEGF, который связывается с покрытыми VEGFR1 лунками ELISA, на уровне приблизительно 94 и 84%, соответственно, при 100-кратном и 500-кратном молярном избытке над VEGF. Даже при 1000-кратном молярном избытке над VEGF r84 все еще сохраняет связывание VEGF с VEGFR1 на уровне приблизительно 65%. Очевидно, что антитела, которые более существенно ингибируют связывание VEGF с VEGFR2, вероятно, могут допускать большее снижение связывания с VEGFR1. В равной мере, если антитело проявляет умеренное снижение связывания VEGF с VEGFR2, следует более настоя-

тельно добиваться сохранения связывания с VEGFR1. Таким образом, очевидно, что важна "сравнительная" разница между этими двумя значениями.

Молекулы нуклеиновых кислот, включающие последовательности нуклеотидов, которые кодируют антитела человека согласно настоящему изобретению, определенные в данной заявке, или их части или фрагменты, или молекулы нуклеиновых кислот, по существу, гомологичные им, образуют дополнительные аспекты настоящего изобретения. Предпочтительные молекулы нуклеиновых кислот включают последовательности, которые кодируют последовательность аминокислот, приведенную в SEQ ID NO: 21 (которая предпочтительно кодируется последовательностью SEQ ID NO: 20). Другие предпочтительные молекулы нуклеиновых кислот включают последовательности, которые кодируют тяжелую цепь, которая имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 24 (которая предпочтительно кодируется последовательностью SEQ ID NO: 22) и кодируют легкую цепь, которая имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 25 (которая предпочтительно кодируется последовательностью SEQ ID NO: 23).

Другие предпочтительные молекулы нуклеиновых кислот включают последовательности, которые кодируют IgG-формы антител согласно настоящему изобретению или мышинные химерные формы, например, описанные в примере 6.

Как указано выше, другие молекулы нуклеиновых кислот, входящие в объем настоящего изобретения, представляют собой такие, которые кодируют части или фрагменты антител человека согласно настоящему изобретению, например кодирующие тяжелую цепь антитела (например, такие, которые кодируют SEQ ID NO: 24, такие как SEQ ID NO: 22) или кодирующие легкую цепь антитела (например, такие, которые кодируют SEQ ID NO: 25, такие как SEQ ID NO: 23). Другие предпочтительные молекулы нуклеиновых кислот представляют собой такие, которые кодируют VH-область антитела согласно настоящему изобретению (например, такие, которые кодируют SEQ ID NO: 3, такие как SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 26). Другие предпочтительные молекулы нуклеиновых кислот представляют собой такие, которые кодируют VL-область антитела согласно настоящему изобретению (например, такие, которые кодируют SEQ ID NO: 4, такие как SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 27).

Таким образом, фрагменты антител согласно настоящему изобретению, определенные в данной заявке, или последовательности, по существу, гомологичные им, или молекулы нуклеиновых кислот, включающие последовательности, кодирующие такие фрагменты, образуют еще один дополнительный аспект настоящего изобретения.

Преимущество состоит в том, что антитела согласно настоящему изобретению, если они находятся в IgG-формате, имеют высокую аффинность связывания с VEGF, т.е. имеют  $K_d$  в диапазоне от  $1 \times 10^{-8}$  М или меньше. Важно отметить, что антитела с такой аффинностью находятся в пределах установленного диапазона, который был показан как эффективный для терапии. Предпочтительно антитела согласно настоящему изобретению, если они находятся в IgG-формате, имеют аффинность связывания с VEGF (предпочтительно VEGF человека), которая соответствует  $K_d$ , равной менее чем 20, 15 или 10 нМ, более предпочтительно равной менее чем 10, 9,5, 9, 8,5, 8, 7,5, 7, 6,5, 6, 5,5, 5, 4,5, 4, 3,5, 3, 2,5, 2, 1,5 или 1 нМ. Например, аффинность связывания антител согласно настоящему изобретению, если они находятся в IgG-формате, может быть  $6,7 \times 10^{-9}$  М или меньше, как, например, равной приблизительно  $7 \times 10^{-9}$  М или приблизительно  $6 \times 10^{-9}$  М или, например, равной  $6,7 \times 10^{-9}$  М. Можно применять любой подходящий способ определения  $K_d$ . Тем не менее, предпочтительно  $K_d$  определяют с помощью тестирования различных концентраций тестируемого антитела к различным концентрациям антигена (VEGF) *in vitro*, чтобы построить кривую насыщения, например, применяя способ Лайнуивера-Берка или предпочтительно применяя доступное для приобретения программное обеспечение для модели связывания, такой как модель связывания 1:1 в программном обеспечении Biacore 3000 Evaluation. Подходящий анализ описан в примере 5 в качестве иллюстрации. Предпочтительно  $K_d$  определяют путем иммобилизации антигена (VEGF) на твердой подложке, например на чипе Biacore, и оценки связывания антитела с антигеном. Предпочтительно аффинность связывания оценивают при комнатной температуре, например при температуре 25°C, хотя ее также можно оценивать при других температурах, например 37°C (например, при температуре тела).

В других местах в данной заявке обсуждалось, что предпочтительные антитела согласно настоящему изобретению связываются как с VEGF человека, так и с VEGF мыши. Это является важным преимуществом, чтобы обеспечить наиболее эффективный переход от доклинических испытаний к клиническому применению. Например, способность антитела согласно настоящему изобретению связываться как с VEGF человека, так и с VEGF мыши означает, что такие антитела можно тестировать в доклинических испытаниях, применяя модели как сингенных, так и ксенотрансплантатных опухолей. Антитела, которые не связываются с VEGF мыши, невозможно применять в сингенных моделях на мышах.

Вдобавок, способность связывать VEGF как мыши, так и человека означает, что результаты, полученные для таких антител согласно настоящему изобретению в ксенотрансплантатных моделях на мышах, более вероятно будут отражать активность указанных антител у людей. Причина этого состоит в том, что антитела, которые могут связываться с VEGF человека, но не с VEGF мыши (например, Авастин и 2C3), будут связываться с VEGF, продуцируемым опухолевыми клетками человека в модели на мышах,



но не смогут связываться с эндогенным VEGF мыши. Это, конечно, отличается от ситуации в отношении человека, у которого будут присутствовать VEGF, продуцируемый опухолью, и эндогенный VEGF.

Потенциальный недостаток такой ситуации состоит в том, что антитело, которое связывается с VEGF человека, но не с VEGF мыши, может хорошо работать в ксенотрансплантатной модели на мышах, но это может не воспроизводиться аналогичным образом в системе человека, где присутствует гораздо большее количество VEGF. Другими словами, противоопухолевый эффект, обнаруживаемый в ксенотрансплантатной системе мыши с антителом, которое может связываться с VEGF человека, но не с VEGF мыши, может выглядеть лучше, чем клиническая реальность. Напротив, при работе с антителом, которое может связываться с VEGF как человека, так и мыши, оно будет связываться со всеми формами VEGF, присутствующими в системе модели на мышах, и, вероятно, будет вернее отражать ситуацию, когда это антитело будут вводить людям.

В следующих описаниях композиций, иммуноконъюгатов, фармацевтических препаратов, комбинаций, коктейлей, наборов, первого и второго медицинских применений и всех способов в соответствии с настоящим изобретением термины "антитело" и "иммуноконъюгат" или антигенсвязывающий участок или его фрагмент, если конкретно не указано иное или как очевидно из научной терминологии, относятся к диапазону блокирующих VEGFR2 антител человека к VEGF, а также к специфичным антителам t84.

Термины "антитело" и "иммуноглобулин" в данной заявке в широком смысле относятся к иммунологическому связывающему агенту или молекуле, которая включает человеческий антигенсвязывающий домен, включая поликлональные и моноклональные антитела. В зависимости от типа константной области в тяжелых цепях, целые антитела классифицируют по пяти основным классам: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM. Некоторые из них дополнительно подразделяются на подклассы или изоотипы, такие как IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 и т.п. Константные области тяжелых цепей, которые соответствуют различным классам иммуноглобулинов, обозначают  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  и  $\mu$  соответственно. Субъединичные структуры и трехмерные конфигурации различных классов иммуноглобулинов хорошо известны.

Как правило, если вместо антигенсвязывающих участков в настоящем изобретении используются целые антитела, IgG и/или IgM являются предпочтительными, потому что они представляют собой наиболее типичные антитела в физиологической ситуации и потому что их легче всего получить в лабораторных условиях.

"Легкие цепи" антител млекопитающих приписывают одному из двух совершенно разных типов  $\kappa$  и  $\lambda$  на основании последовательностей аминокислот их константных доменов и некоторых аминокислот в каркасных областях их вариабельных доменов. По существу, нет предпочтения относительно применения  $\kappa$  или  $\lambda$  константных областей легкой цепи в антителах согласно настоящему изобретению.

Для специалиста в данной области техники очевидно, что иммунологические связывающие реагенты, входящие в объем термина "антитело", распространяются на все антитела человека и их антигенсвязывающие фрагменты, включая целые антитела, димерные, тримерные и мультимерные антитела; биспецифичные антитела; химерные антитела; рекомбинантные и сконструированные антитела и их фрагменты.

Термин "антитело", таким образом, используется по отношению к любой подобной антителу человека молекуле, которая включает антигенсвязывающий участок, и этот термин включает фрагменты антител, которые включают антигенсвязывающий домен, такие как Fab', Fab, F(ab')<sub>2</sub>, антитела с одним доменом (DAB), димер TandAbs, Fv, scFv (одноцепочечный Fv), dsFv, ds-scFv, Fd, линейные антитела, миниантитела, диабоды, биспецифичные фрагменты антител и т.п.

Методики получения и применения различных основанных на антителах конструкций и фрагментов хорошо известны в данной области техники (см. Kabat и др., 1991, специально включенный в данную заявку посредством ссылки). Диабоды, в частности, дополнительно описаны в EP 404 097 и WO 93/11161; тогда как линейные антитела дополнительно описаны у Zapata и др. (1995).

Антитела можно фрагментировать, применяя обычные методики. Например, фрагменты F(ab')<sub>2</sub> можно получить путем обработки антитела пепсином. Полученный фрагмент F(ab')<sub>2</sub> можно обработать, чтобы восстановить дисульфидные мостики, с получением фрагментов Fab'. Расщепление папаином приводит к образованию фрагментов Fab. Fab, Fab' и F(ab')<sub>2</sub>, scFv, Fv, dsFv, Fd, dAbs, TandAbs, ds-scFv, димеры, миниантитела, диабоды, биспецифичные фрагменты антител и другие фрагменты также можно синтезировать с помощью рекомбинантных методик или можно синтезировать химически. Методики получения фрагментов антител хорошо известны и описаны в данной области техники. Например, в перечисленных Beckman и др., 2006; Holliger & Hudson, 2005; Le Gall и др., 2004; Reff & Heard, 2001; Reiter и др., 1996; и Young и др., 1995 дополнительно описаны эффективные фрагменты антител и способы их получения.

Антитела человека или фрагменты антител можно получить естественным образом (из природных источников) или можно получить полностью или частично синтетическим путем. Таким образом, антитело может быть получено из любого подходящего источника, например рекомбинантных источников, и/или получено в трансгенных животных или трансгенных растениях или в яйцах с применением технологии IgY. Таким образом, молекулы антител можно получить *in vitro* или *in vivo*.

Предпочтительно антитело или фрагмент антитела человека включает переменную область легкой цепи (VL) антитела, которая включает три домена CDR, и переменную область тяжелой цепи (VH) антитела, которая включает три домена CDR. Указанные VL и VH, как правило, образуют сайт связывания антигена.

Фрагмент "Fv" представляет собой минимальный фрагмент антитела, который включает полный сайт узнавания и связывания антигена. Этот участок включает димер переменных доменов одной тяжелой цепи и одной легкой цепи в тесном, нековалентном взаимодействии. Он находится в такой конфигурации, что три гиперпеременных участка (CDR) каждого из переменных доменов взаимодействуют с образованием сайта связывания антигена на поверхности димера VH-VL. В совокупности, шесть гиперпеременных участков (CDR) придают антителу антигенсвязывающую специфичность.

Тем не менее, в данной области техники хорошо известно, что присутствие трех гиперпеременных участков из переменного домена легкой цепи и трех гиперпеременных участков из переменного домена тяжелой цепи антитела не требуется для связывания антигена. Таким образом, известно, что конструкции, меньшие чем описанный выше классический фрагмент антитела, могут быть эффективны.

Например, антитела верблюдовых (Hamers-Casterman и др., 1993; Arbabi Ghahroudi и др., 1997) имеют обширный антигенсвязывающий репертуар, но они лишены легких цепей. Также результаты, полученные для антител с одним доменом, включающих только домены VH (Ward и др., 1989; Davies и Riechmann, 1995) или только домены VL (van den Beucken и др., 2001), показали, что эти домены могут связываться с антигеном с достаточно высокой аффинностью. Таким образом, три гиперпеременных участка могут эффективно связывать антиген.

Также известно, что один гиперпеременный участок или два гиперпеременных участка могут эффективно связывать антиген. В качестве первого примера один гиперпеременный участок можно вставить в гетерологичный белок и придать гетерологичному белку антигенсвязывающую способность, например гиперпеременный участок CDR3 VH, вставленный в гетерологичный белок, например в белок GFP, придает антигенсвязывающую способность гетерологичному белку (Kiss и др., 2006; Nicaise и др., 2004).

Дополнительно известно, что два гиперпеременных участка могут эффективно связывать антиген и даже обеспечивать лучшие свойства, чем проявляемые родительским антителом. Например, было показано (Qiu и др., 2007), что два гиперпеременных участка из родительского антитела (гиперпеременный участок CDR1 VH и гиперпеременный участок CDR3 VL) сохраняют свойства распознавания антигена родительской молекулы, но проявляют лучшую способность проникать в опухоли. Соединение этих доменов CDR с помощью подходящей линкерной последовательности (например, из VH FR2), для ориентирования гиперпеременных участков таким образом, чтобы они располагались, как в нативном родительском антителе, позволило получить даже лучшее распознавание антигена. Следовательно, в данной области техники известно, что можно сконструировать связывающие антиген миметики антитела, включающие два домена CDR (предпочтительно один из домена VH и один из домена VL, более предпочтительно один из двух доменов CDR представляет собой домен CDR3), ориентированные с помощью подходящей каркасной области, для сохранения конформации, обнаруженной у родительского антитела.

Таким образом, хотя предпочтительные антитела согласно настоящему изобретению могут включать шесть гиперпеременных участков (три из легкой цепи и три из тяжелой цепи), антитела с менее чем шестью гиперпеременными участками и с таким небольшим количеством, как один или два гиперпеременных участка, входят в объем настоящего изобретения. Вдобавок, также предполагаются антитела с гиперпеременными участками только из тяжелой цепи или из легкой цепи.

Предпочтительные антитела согласно настоящему изобретению, которые связываются с VEGF, включают по меньшей мере одну переменную область тяжелой цепи, которая включает три гиперпеременных участка, и по меньшей мере одну переменную область легкой цепи, которая включает три гиперпеременных участка, при этом указанная переменная область легкой цепи включает:

(a) гиперпеременный участок CDR1 переменной области легкой цепи (VL), который имеет последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 8 или последовательность, по существу, гомологичную ей,

(b) гиперпеременный участок CDR2 VL, который имеет последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 9 или последовательность, по существу, гомологичную ей, и

(c) гиперпеременный участок CDR3 VL, который имеет последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 10 или последовательность, по существу, гомологичную ей.

Предпочтительные гиперпеременные участки тяжелой цепи для применения в сочетании с предусмотренными гиперпеременными участками легкой цепи описаны в других местах в данной заявке. Тем не менее, также предполагаются другие переменные области тяжелой цепи, которые включают три гиперпеременных участка для применения в сочетании с переменными областями легкой цепи согласно настоящему изобретению.

Подходящие переменные области тяжелой цепи, которые можно применять в комбинации с переменными областями легкой цепи согласно настоящему изобретению и которые позволяют получить

антитело, которое связывает VEGF, может легко идентифицировать специалист в данной области техники.

Например, вариабельную область легкой цепи согласно настоящему изобретению можно объединить с одной вариабельной областью тяжелой цепи или репертуаром вариабельных областей тяжелой цепи и полученные антитела протестировать на связывание с VEGF. Следует ожидать, что разумное количество таких комбинаций вариабельных областей легкой цепи согласно настоящему изобретению с различными вариабельными областями тяжелой цепи будет сохранять способность связывания VEGF. Действительно, это было продемонстрировано для предпочтительного антитела согласно настоящему изобретению (r84/PGN311), для которого было показано, что домен VL этого антитела можно объединить с несколькими различными доменами VH, сохранив при этом способность связывания VEGF. В этих экспериментах 3 из 7 доменов VH, которые были протестированы в комбинации с доменом VL антитела r84, проявили значительное связывание с VEGF, что представляет собой разумное количественное соотношение и свидетельствует о том, что вариабельная область легкой цепи антител согласно настоящему изобретению особенно важна для определения специфичности связывания VEGF, а также что можно легко идентифицировать другие вариабельные области тяжелой цепи, которые можно объединить с вариабельными областями легкой цепи согласно настоящему изобретению и получить антитела, которые связывают VEGF. Предпочтительные вариабельные области тяжелой цепи для применения в комбинации с вариабельными областями легкой цепи антител согласно настоящему изобретению представляют собой такие участки, которые получены или происходят от антител или фрагментов антител, про которые известно, что они связываются с VEGF.

Аналогичные способы можно применять для идентификации альтернативных вариабельных областей легкой цепи для применения в комбинации с предпочтительными вариабельными областями тяжелой цепи согласно настоящему изобретению.

В некоторых вариантах реализации антитело или фрагмент антитела включает всю или часть константной области тяжелой цепи, такой как константная область IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgE, IgM или IgD. Предпочтительно константная область тяжелой цепи представляет собой константную область тяжелой цепи IgG1 или ее часть. Более того, антитело или фрагмент антитела может включать всю или часть константной области легкой цепи или константной области легкой  $\lambda$  цепи или ее часть. Всю или часть таких константных областей можно получить естественным образом, или они могут быть полностью или частично синтетическими. Подходящие последовательности для таких константных областей хорошо известны и представлены в данной области техники. Если в антитела согласно настоящему изобретению включен полный комплект константных областей из тяжелых и легких цепей, такие антитела обычно называют в данной заявке "полноразмерными" антителами или "целыми" антителами.

Антитела, включающие Fc-область, являются предпочтительными для некоторых применений, особенно терапевтических применений *in vivo*, где Fc-область опосредует эффекторные функции, такие как ADCC и CDC.

Термин "по существу, гомологичный" в данной заявке применительно к последовательности аминокислот или нуклеиновых кислот включает последовательности, имеющие по меньшей мере 70% или 75%, предпочтительно по меньшей мере 80% и еще более предпочтительно по меньшей мере 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности последовательности с описанной последовательностью аминокислот или нуклеиновых кислот. По существу, гомологичные последовательности согласно настоящему изобретению, таким образом, включают одно или множество изменений оснований или аминокислот (добавления, замены, вставки или делеции) в последовательностях согласно настоящему изобретению. На уровне аминокислот предпочтительные, по существу, гомологичные последовательности включают лишь 1, 2, 3, 4 или 5, предпочтительно 1, 2 или 3, более предпочтительно 1 или 2 измененные аминокислоты в одной или более каркасных областях и/или одном или более гипервариабельных участках, составляющих последовательности согласно настоящему изобретению. Указанные изменения могут быть произведены на консервативные или неконсервативные аминокислоты. Предпочтительно указанные изменения представляют собой консервативные замены аминокислот.

По существу, гомологичные последовательности нуклеиновых кислот также включают последовательности нуклеотидов, которые гибридизуются с описанными последовательностями нуклеиновых кислот (или комплементарными им последовательностями), например гибридизуются с последовательностями нуклеотидов, кодирующими один или более гипервариабельных участков легкой цепи или тяжелой цепи согласно настоящему изобретению, вариабельные области легкой или тяжелой цепи согласно настоящему изобретению или антитела согласно настоящему изобретению (или гибридизуются с комплементарными им последовательностями), по меньшей мере, при умеренно жестких условиях гибридизации.

Термин "по существу, гомологичный" также включает модификации или химические эквиваленты последовательностей аминокислот и нуклеотидов согласно настоящему изобретению, которые выполняют, по существу, те же функции, что и белки или молекулы нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению, по существу, таким же путем. Например, любое, по существу, гомологичное антитело (или, по существу, гомологичная нуклеиновая кислота, кодирующая его) должно сохранять способность

связываются с VEGF, описанную выше. Предпочтительно любой, по существу, гомологичный связывающий белок должен сохранять способность специфично связываться с тем же эпитопом VEGF, который распознается обсуждаемым связывающим белком, например, с тем же эпитопом, который распознается доменами CDR согласно настоящему изобретению или доменами VH и VL согласно настоящему изобретению, описанными в данной заявке. Связывание с тем же эпитопом/антигеном можно легко проверить с помощью способов, хорошо известных и описанных в данной области техники, например, применяя тесты на связывание, например конкурентный тест.

Таким образом, для специалиста в данной области техники очевидно, что тесты на связывание можно применять для проверки того, имеют ли "по существу, гомологичные" антитела такие же специфичности связывания, что и антитела и фрагменты антител согласно настоящему изобретению, например тесты на связывание, такие как тесты ELISA или тесты Вiasoge, можно легко применять для проверки, могут ли такие "по существу, гомологичные" антитела связываться с VEGF. Ниже описано, что конкурентный тест на связывание можно применять для проверки, сохраняют ли "по существу, гомологичные" антитела способность специфично связываться, по существу, с тем же эпитопом VEGF, который распознается антителами согласно настоящему изобретению. Описанный ниже способ представляет собой лишь один пример подходящего конкурентного анализа. Специалист должен знать другие подходящие способы и варианты.

Типичный конкурентный анализ включает оценку связывания различных эффективных концентраций антитела согласно настоящему изобретению с VEGF в присутствии изменяющихся концентраций тестируемого антитела (например, по существу, гомологичного антитела). Можно оценить степень ингибирования связывания, индуцированного тестируемым антителом. Тестируемое антитело, которое проявит повышенную конкуренцию с антителом согласно настоящему изобретению при возрастающих концентрациях (т.е. возрастающие концентрации тестируемого антитела приводят к соответствующему снижению количества связывающегося с VEGF антитела согласно настоящему изобретению) свидетельствует о связывании, по существу, с тем же эпитопом. Предпочтительно тестируемое антитело значительно уменьшает количество связывающегося с VEGF антитела согласно настоящему изобретению. Предпочтительно тестируемое антитело уменьшает количество антитела согласно настоящему изобретению, которое связывается с VEGF, по меньшей мере на приблизительно 80%. Тесты ELISA подходят для оценки ингибирования связывания в таком конкурентном анализе, но другие подходящие методики также должны быть хорошо известны специалисту в данной области техники.

По существу, гомологичные последовательности белков согласно настоящему изобретению включают, без ограничения, консервативные замены аминокислот или, например, изменения, которые не влияют на домены VH, VL или CDR антител, например включают scFv антитела, в которых используются различные линкерные последовательности или антитела, в которые добавлены маркерные последовательности или другие компоненты, которые не участвуют в связывании антигена, или изменения, произведенные для превращения одного типа или формата молекулы или фрагмента антитела в другой тип или формат молекулы или фрагмента антитела (например, превращение Fab в scFv или наоборот), или превращение молекулы антитела в конкретный класс или подкласс молекулы антитела (например, превращение молекулы антитела в IgG или его подкласс, например IgG1 или IgG3).

"Консервативная замена аминокислоты" в данной заявке представляет собой такую замену, при которой аминокислотный остаток замещается на другой аминокислотный остаток, включающий аналогичную боковую цепь. Семейства аминокислотных остатков, включающих аналогичные боковые цепи, определены в данной области техники, включая основные боковые цепи (например, лизин, аргинин, гистидин), кислые боковые цепи (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженные полярные боковые цепи (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярные боковые цепи (например, глицин, цистеин, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан),  $\beta$ -разветвленные боковые цепи (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматические боковые цепи (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин).

Гомологию можно оценить с помощью любого удобного способа. Тем не менее, для определения степени гомологии между последовательностями полезны компьютерные программы, которые совершают множество выравниваний последовательностей, например Clustal W (Thompson и др., 1994). При желании алгоритм Clustal W можно применять вместе с матрицей переходов BLOSUM 62 (Henikoff и Henikoff, 1992) и штрафом за открытие гэпов, равным 10, а штрафом за продление гэпов, равным 0.1, чтобы получить соответствие наиболее высокого порядка между двумя последовательностями, при этом по меньшей мере 50% всей длины одной из последовательностей участвует в выравнивании. Другие способы, которые можно применять для выравнивания последовательностей, представляют собой способ выравнивания по Нидельману и Вуншу (1970), исправленный Смитом и Уотерманом (1981) таким образом, что получают соответствие наиболее высокого порядка между двумя последовательностями, и определяют количество идентичных аминокислот между двумя последовательностями. Другие способы вычисления процента идентичности между двумя последовательностями аминокислот, как правило, известны в данной области техники и включают, например, описанные Carillo и Lipton (1988) и описанные в Computational Molecular Biology, Lesk, ред. Oxford University Press, Нью-Йорк, 1988, Biocomputing: Informatics

and Genomics Projects.

Как правило, для таких расчетов используют компьютерные программы. Программы, которые сравнивают и выравнивают пары последовательностей, такие как ALIGN (Myers и Miller, 1988), FASTA (Pearson и Lipman, 1988; Pearson, 1990) и Gapped BLAST (Altschul и др., 1997), BLASTP, BLASTN или GCG (Devereux и др., 1984), также полезны для этой цели. Более того, сервер Dali Европейского института биоинформатики предлагает основанные на структуре выравнивания белковых последовательностей (Holm, 1993; 1995; 1998).

С целью обеспечения опорной точки последовательности согласно настоящему изобретению, имеющие 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% гомологии, идентичности последовательностей и т.д., можно определить, применяя программу ALIGN с параметрами по умолчанию (например, доступную в сети Интернет на сетевом сервере GENESTREAM, IGH, Монпелье, Франция).

Под термином "по меньшей мере, умеренно жесткие условия гибридизации" подразумевается, что выбраны условия, которые способствуют избирательной гибридизации между двумя комплементарными молекулами нуклеиновых кислот в растворе. Гибридизация может произойти по всей или части молекулы последовательности нуклеиновых кислот. Гибридирующаяся часть обычно состоит по меньшей мере из 15 (например, 20, 25, 30, 40 или 50) нуклеотидов в длину. Для специалистов в данной области техники очевидно, что стабильность дуплекса нуклеиновых кислот, или гибридов, определяется  $T_m$ , которая в буферах, включающих натрий, представляет собой функцию концентрации ионов натрия и температуры ( $T_m = 81.5^\circ\text{C} - 16.6 (\text{Log}_{10} [\text{Na}^+]) + 0.41(\% (\text{G}+\text{C}) - 600/1)$ , или аналогичное уравнение). Соответственно, параметры условий промывки, которые определяют стабильность гибрида, представляют собой концентрацию ионов натрия и температуру. Чтобы идентифицировать молекулы, которые аналогичны, но не идентичны известной молекуле нуклеиновой кислоты, может допускаться несовпадение в 1%, что приведет к снижению  $T_m$  на приблизительно  $1^\circ\text{C}$ . Например, если ищут молекулы нуклеиновых кислот, которые имеют >95% идентичности, температура окончательной промывки будет снижена на приблизительно  $5^\circ\text{C}$ . На основании этих соображений, специалисты в данной области техники смогут легко выбрать подходящие условия гибридизации. В предпочтительных вариантах реализации выбирают жесткие условия гибридизации. В качестве примера можно использовать следующие условия, чтобы достигнуть жесткой гибридизации: гибридизация в  $5\times$  растворе хлорида натрия/цитрата натрия (SSC)/ $5\times$  растворе Денхардта/1.0% SDS при  $T_m - 5^\circ\text{C}$  на основании описанного выше уравнения, а затем промывка в  $0.2\times$  SSC/0.1% SDS при  $60^\circ\text{C}$ . Умеренно жесткие условия гибридизации включают стадию промывки в  $3\times$  SSC при  $42^\circ\text{C}$ .

В качестве дополнительного примера последовательности, которые "гибридизуются", представляют собой последовательности, связывающиеся (гибридирующиеся) при нежестких условиях (например,  $6\times$  SSC, 50% формамид при комнатной температуре) и промываемые при условиях малой жесткости (например,  $2\times$  SSC, комнатная температура, более предпочтительно  $2\times$  SSC,  $42^\circ\text{C}$ ) или условиях более высокой жесткости (например,  $2\times$  SSC,  $65^\circ\text{C}$ ) (где SSC = 0.15 M NaCl, 0.015 M цитрат натрия, pH 7.2).

Тем не менее, очевидно, что эквивалентной жесткости можно достигнуть, применяя альтернативные буферы, соли и температуры. Дополнительное руководство относительно условий гибридизации можно найти в: Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y., 1989, 6.3.1-6.3.6 и в Sambrook и др., Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, т. 3.

Вообще говоря, последовательности, которые гибридизуются при условиях высокой жесткости, являются предпочтительными, также как и последовательности, которые, если бы не вырожденность кода, гибридизовались бы при условиях высокой жесткости.

В других предпочтительных вариантах реализации обеспечены антитела второго поколения, которые имеют улучшенные или превосходящие свойства по сравнению с исходным блокирующим VEGFR2 антителом человека к VEGF, таким как g84. Например, антитела второго поколения могут проявлять более высокую аффинность связывания, более эффективное блокирование связывания VEGF с VEGFR2, более специфичное блокирование связывания VEGF с VEGFR2, еще меньшее блокирование связывания VEGF с VEGFR1, повышенную способность ингибировать VEGF-индуцируемую пролиферацию и/или миграцию эндотелиальных клеток, лучшую способность ингибировать VEGF-индуцируемую сосудистую проницаемость и предпочтительно повышенную способность ингибировать VEGF-индуцируемый ангиогенез *in vivo*, и для лечения ангиогенных заболеваний, включая васкуляризированные опухоли.

Сравнительный анализ для идентификации эффективных антител второго поколения легко осуществить и перевести в количественное выражение, например, применяя один или более из различных тестов, подробно описанных в данной заявке. Антитела второго поколения, которые проявляют улучшенное биологическое свойство или активность, составляющую по меньшей мере приблизительно 2-кратную, 5-кратную, 10-кратную, 20-кратную и предпочтительно по меньшей мере приблизительно 50-кратную по сравнению с блокирующими VEGFR2 антителами человека к VEGF согласно настоящему изобретению, примером которых является антитело g84, входят в объем настоящего изобретения.

Антитело, связывающий белок и молекулы нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению, как правило, представляют собой "изолированные (выделенные)" или "очищенные" молекулы в

такой степени, что они отличимы от любых таких компонентов, которые могут присутствовать *in situ* в организме человека или животного или образце ткани, полученном из организма человека или животного. Указанные последовательности, тем не менее, могут соответствовать или быть, по существу, гомологичными последовательностям, обнаруживаемым в организме человека или животного. Таким образом, термин "изолированный" или "очищенный" в данной заявке в отношении молекул или последовательностей нуклеиновых кислот и белков или полипептидов, например антител, относится к таким молекулам, которые выделены, очищены или, по существу, свободны от природного окружения, например выделены или очищены из организма человека или животного (если они действительно встречаются в природе), или относятся к таким молекулам, которые получены с помощью технического процесса, т.е. включает рекомбинантные и полученные синтетическим путем молекулы.

Таким образом, применительно к молекуле нуклеиновой кислоты такие термины могут относиться к нуклеиновой кислоте, по существу, свободной от материала, с которым она ассоциирована в природе, такого как другие нуклеиновые кислоты/гены или полипептиды. Эти термины также могут относиться к нуклеиновой кислоте, по существу, свободной от клеточного материала или культуральной среды, если она получена с помощью методов рекомбинантной ДНК, или, по существу, свободной от химических предшественников, или других химических соединений, если она синтезирована химически. Выделенная или очищенная нуклеиновая кислота также может быть, по существу, свободной от последовательностей, которые в природе фланкируют указанную нуклеиновую кислоту (т.е. последовательностей, расположенных на 5'- и 3'-концах нуклеиновой кислоты), от которых происходит нуклеиновая кислота или от последовательностей, которые были вставлены и фланкируют нуклеиновую кислоту (например, последовательности метки или другая последовательность, которая не имеет терапевтического значения), например, с помощью генетической инженерии.

Таким образом, применительно к белку или полипептидной молекуле, такой как гипервариабельные участки легкой цепи 1, 2 и 3, гипервариабельные участки тяжелой цепи 1, 2 и 3, вариабельные области легкой цепи, вариабельные области тяжелой цепи, и связывающие белки или антитела согласно настоящему изобретению, включая полноразмерные антитела, термин "изолированный" или "очищенный" обычно относится к белку, по существу, свободному от клеточного материала или других белков источника, из которого он был получен. В некоторых вариантах реализации, особенно когда белок должен вводиться людям или животным, такие выделенные или очищенные белки являются, по существу, свободными от культуральной среды, если они были получены с помощью рекомбинантных методов, или химических предшественников или других химических соединений, если они были синтезированы химически. Такие выделенные или очищенные белки также могут быть свободны от фланкирующих последовательностей, таких как описанные выше для изолированных молекул нуклеиновых кислот.

Термин "последовательность нуклеиновых кислот" или "молекула нуклеиновой кислоты" в данной заявке относится к последовательности мономеров нуклеозидов или нуклеотидов, состоящей из встречающихся в природе оснований, сахаров и межсахарных (каркасных) связей. Термин также включает модифицированные или содержащие заместители последовательности, включающие не встречающиеся в природе мономеры или их части. Последовательности нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению могут представлять собой последовательности дезоксирибонуклеиновых кислот (ДНК) или последовательности рибонуклеиновых кислот (РНК) и могут включать встречающиеся в природе основания, включая аденин, гуанин, цитозин, тимидин и урацил. Указанные последовательности также могут включать модифицированные основания. Примеры таких модифицированных оснований включают ази- и деазааденин, гуанин, цитозин, тимидин и урацил; ксантин и гипоксантин. Молекулы нуклеиновых кислот могут быть дунитевыми или одонитевыми. Молекулы нуклеиновых кислот могут быть полностью или частично синтетическими или рекомбинантными.

Термин "человеческие" в данной заявке применительно к молекулам антител и связывающим белкам, во-первых, относится к антителам и связывающим белкам, включающим вариабельные области (например, VH, VL, гипервариабельный участок или FR-области) и, возможно, константные области антитела, выделенные или полученные из репертуара человека или полученные из последовательностей или соответствующие последовательностям, обнаруживаемым у людей, например, в зародышевых или соматических клетках человека. Антитело г84 представляет собой пример такой молекулы антитела человека, в которой вариабельные области были выделены из репертуара человека.

"Человеческие" антитела и связывающие белки согласно настоящему изобретению дополнительно включают аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями человека, например, мутации, введенные путем неспецифического или сайт-направленного мутагенеза *in vitro*, например мутации введенные путем клонирования *in vitro* или с помощью ПЦР. Конкретные примеры таких мутаций представляют собой мутации, которые включают консервативные замены или другие мутации в небольшом количестве остатков антитела или связывающего белка, например, в 5, 4, 3, 2 или 1 из остатков антитела или связывающего белка, предпочтительно, например, в 5, 4, 3, 2 или 1 из остатков, составляющих один или более из гипервариабельных участков антитела или связывающего белка. Некоторые примеры таких "человеческих" антител включают антитела и вариабельные области, которые подвергали стандартным методикам модификации для уменьшения количества потенциально иммуногенных сайтов.

Таким образом, "человеческие" антитела согласно настоящему изобретению включают последовательности, полученные из последовательностей и родственные последовательностям, обнаруживаемым у людей, но которые могут не присутствовать в природе в зародышевом репертуаре антител человека *in vivo*. Вдобавок, антитела и связывающие белки человека согласно настоящему изобретению включают белки, включающие консенсусные последовательности человека, идентифицированные в последовательностях человека, или в последовательностях, по существу, гомологичных последовательностям человека.

Вдобавок, антитела и связывающие белки человека согласно настоящему изобретению не ограничены комбинациями VH, VL, гипервариабельных участков или FR-областей, которые сами обнаруживаются в комбинации в молекулах антител человека. Таким образом, антитела и связывающие белки человека согласно настоящему изобретению могут включать или соответствовать комбинациям таких областей, которые не обязательно присутствуют в природе у людей.

В предпочтительных вариантах реализации, антитела человека будут представлять собой полностью человеческие антитела. "Полностью человеческие" антитела в данной заявке представляют собой антитела, включающие "человеческие" домены вариабельных областей и/или гипервариабельные участки, определенные выше, без существенных не принадлежащих человеку последовательностей антител или вообще без не принадлежащих человеку последовательностей антител. Например, антитела, включающие домены вариабельных областей и/или гипервариабельные участки человека "без существенных не принадлежащих человеку последовательностей антител", представляют собой антитела, домены и/или гипервариабельные участки, в которых лишь приблизительно 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислот представляют собой аминокислоты, которые не кодируются последовательностями антител человека. Таким образом, "полностью человеческие" антитела отличимы от "гуманизированных" антител, которые основаны, по существу, на не принадлежащих человеку доменах вариабельных областей, например доменах вариабельных областей мыши, в которых некоторые аминокислоты были заменены, чтобы лучше соответствовать аминокислотам, обычно присутствующим в антителах человека.

"Полностью человеческие" антитела согласно настоящему изобретению могут представлять собой домены вариабельных областей и/или гипервариабельные участки человека без других существенных последовательностей антител, как, например, одноцепочечные антитела. В качестве альтернативы "полностью человеческие" антитела согласно настоящему изобретению могут представлять собой домены вариабельных областей и/или гипервариабельные участки антитела человека, составляющие единое целое или функционально связанные с одной или более константных областей антитела человека. Некоторые предпочтительные полностью человеческие антитела представляют собой антитела IgG с полным комплектом константных областей IgG.

В других вариантах реализации "человеческие" антитела согласно настоящему изобретению будут представлять собой частично человеческие химерные антитела. "Частично человеческие химерные" антитела в данной заявке представляют собой антитела, включающие "человеческие" домены вариабельных областей и/или гипервариабельные участки, функционально связанные или привитые на константную область видов, не принадлежащих человеку, таких как крыса или мышь. Такие частично человеческие химерные антитела можно применять, например, в доклинических испытаниях, при этом константная область предпочтительно должна быть от того же вида животного, что и используемое в доклинических испытаниях. Эти частично человеческие химерные антитела также можно применять, например, в диагностике *ex vivo*, при этом константная область видов, не принадлежащих человеку, может обеспечить дополнительные варианты детектирования антитела.

Термин "фрагмент" в данной заявке относится к фрагментам, имеющим биологическое значение, например фрагментам, которые участвуют в связывании антигена, например образуют часть сайта связывания антигена, и/или участвуют в ингибировании или ослаблении функции антигена VEGF, и/или участвуют в предотвращении взаимодействия антигена VEGF с природным лигандом VEGFR2. Некоторые предпочтительные фрагменты включают вариабельную область тяжелой цепи (домен VH) и/или вариабельную область легкой цепи (домен VL) антител согласно настоящему изобретению. Другие предпочтительные фрагменты включают один или более из гипервариабельных участков тяжелой цепи антител согласно настоящему изобретению (или из доменов VH согласно настоящему изобретению), или один или более из гипервариабельных участков легкой цепи антител согласно настоящему изобретению (или из доменов VL согласно настоящему изобретению). Некоторые предпочтительные фрагменты состоят по меньшей мере из 5 аминокислот в длину и включают по меньшей мере один гипервариабельный участок, предпочтительно гипервариабельный участок CDR3, более предпочтительно гипервариабельный участок CDR3 тяжелой цепи.

В вариантах реализации, в которых антитела согласно настоящему изобретению включают фрагмент любой из определенных последовательностей (например, включают фрагмент последовательности SEQ ID NO: 21, например, как антитела, включающие домены VH и/или VL согласно настоящему изобретению, или как антитела или связывающие белки, включающие один или более гипервариабельных участков согласно настоящему изобретению), тогда эти участки/домены, как правило, разделены внутри антитела или связывающего белка так, что каждый участок/домен может осуществлять свою биологическую функцию и что вклад в связывание антигена сохраняется. Таким образом, домены VH и VL пред-

почтительно разделены подходящими каркасными последовательностями/линкерными последовательностями, и гипервариабельные участки предпочтительно разделены подходящими каркасными областями, такими как обнаруживаемые во встречающихся в природе антителах и/или эффективных сконструированных антителах. Таким образом, VH, VL и отдельные последовательности гипервариабельных участков согласно настоящему изобретению предпочтительно обеспечены внутри или включены в подходящий каркас или остов, чтобы обеспечить связывание антигена. Такие каркасные последовательности или участки могут соответствовать встречающимся в природе каркасным областям, FR1, FR2, FR3 и/или FR4, которые подходят для образования подходящего остова или могут соответствовать консенсусным каркасным областям, например, идентифицированным путем сравнения различных встречающихся в природе каркасных областей. В качестве альтернативы можно использовать не входящие в антитела каркасы или остовы, например каркасы Т-клеточного рецептора.

Подходящие последовательности, которые можно применять для каркасных областей, хорошо известны и представлены в данной области техники, и можно использовать любую из них. Предпочтительные последовательности для каркасных областей представляют собой одну или более каркасных областей, составляющих домены VH и/или VL согласно настоящему изобретению, т.е. одну или более каркасных областей, описанных в SEQ ID NO: 21 или в табл. 1, или каркасных областей, по существу, гомологичных им, и, в частности, каркасных областей, которые обеспечивают сохранение антиген-специфичности, например, каркасных областей, которые позволяют получить, по существу, такую же или такую же трехмерную структуру антитела. В некоторых предпочтительных вариантах реализации все четыре вариабельные области легкой цепи (SEQ ID NO: 15, 16, 17 и 18) и/или вариабельные области тяжелой цепи (SEQ ID NO: 11, 12, 13 и 14), в случае необходимости, FR-области с последовательностью SEQ ID NO: 21 (также представленные в табл. 1) или FR-области, по существу, гомологичные им, обнаруживаются в антителах согласно настоящему изобретению.

Вдобавок, хотя предпочтительные антитела согласно настоящему изобретению состоят из VH, VL или гипервариабельных участков согласно настоящему изобретению, следует отметить, что антитела согласно настоящему изобретению также включают один или более VH, VL или гипервариабельных участков согласно настоящему изобретению в комбинации с другими VH, VL или гипервариабельными участками, не входящими в настоящее изобретение, в том случае, если свойства связывания VEGF антител или связывающих белков согласно настоящему изобретению, описанные выше, все еще присутствуют.

Термин "область, определяющая комплементарность, тяжелой цепи" ("гипервариабельный участок тяжелой цепи") в данной заявке относится к участкам гипервариабельности внутри вариабельной области тяжелой цепи (домен VH) молекулы антитела. Вариабельная область тяжелой цепи включает три гипервариабельных участка, названных гипервариабельный участок CDR1 тяжелой цепи, гипервариабельный участок CDR2 тяжелой цепи и гипервариабельный участок CDR3 тяжелой цепи, от аминоконца к карбоксильному концу. Вариабельная область тяжелой цепи также включает четыре каркасные области (FR1, FR2, FR3 и FR4 от аминоконца к карбоксильному концу). Эти каркасные области разделяют гипервариабельные участки.

Термин "вариабельная область тяжелой цепи" (домен VH) в данной заявке относится к вариабельной области тяжелой цепи молекулы антитела.

Термин "область, определяющая комплементарность, легкой цепи" ("гипервариабельный участок легкой цепи") в данной заявке относится к участкам гипервариабельности внутри вариабельной области легкой цепи (домен VL) молекулы антитела. Вариабельные области легкой цепи включают три гипервариабельных участка, названных гипервариабельный участок CDR1 легкой цепи, гипервариабельный участок CDR2 легкой цепи и гипервариабельный участок CDR3 легкой цепи, от аминоконца к карбоксильному концу. Вариабельная область легкой цепи также включает четыре каркасные области (FR1, FR2, FR3 и FR4 от аминоконца к карбоксильному концу). Эти каркасные области разделяют гипервариабельные участки.

Термин "вариабельная область легкой цепи" (домен VL) в данной заявке относится к вариабельной области легкой цепи молекулы антитела.

Следует отметить, что в данной заявке следуют номенклатуре по Kabat, в случае необходимости, чтобы определить расположение гипервариабельных участков (Kabat и др., 1991, особенно включена в данную заявку посредством ссылки).

Для специалиста в данной области техники очевидно, что белки и полипептиды согласно настоящему изобретению, такие как гипервариабельные участки легкой и тяжелой цепи, вариабельные области легкой и тяжелой цепи, антитела, фрагменты антител и иммуноконъюгаты, можно получить любым из нескольких способов, хорошо известных и описанных в данной области техники, но наиболее предпочтительно их получают, применяя рекомбинантные способы.

Фрагменты нуклеиновых кислот, кодирующие вариабельные области легкой и тяжелой цепи антител согласно настоящему изобретению, можно произвести или получить любым подходящим способом, например с помощью клонирования или синтеза. Такие последовательности, например, можно получить путем клонирования подходящих последовательностей, например, из зародышевой линии генов человека и затем введения необходимых модификаций в зародышевые последовательности с получением после-



довательностей согласно настоящему изобретению, применяя способы, хорошо известные и описанные в данной области техники. Альтернативным и более эффективным способом будет синтез подходящей последовательности вариабельной области легкой или тяжелой цепи в виде перекрывающихся праймеров, и использование удлинения праймеров с получением полной последовательности. Эту полную последовательность затем можно амплифицировать с помощью ПЦР с праймерами, включающими подходящие сайты рестрикции, для дальнейшего клонирования и других манипуляций, например для клонирования в подходящий вектор экспрессии. От пяти до семи перекрывающихся праймеров на вариабельную область обычно достаточно, что делает эту методику очень эффективной и точной.

Как только были получены фрагменты нуклеиновых кислот, кодирующие вариабельные области легкой и тяжелой цепи антител согласно настоящему изобретению, этими фрагментами можно дополнительно оперировать с помощью стандартных методик рекомбинантной ДНК, например, чтобы превратить фрагменты вариабельной области в полноразмерные молекулы антител с подходящими доменами константной области, или в конкретные форматы фрагмента антитела, обсуждаемые в других местах в данной заявке, например фрагменты Fab, фрагменты scFv и т.д. Обычно или в рамках этой дополнительной процедуры манипуляции фрагменты нуклеиновых кислот, кодирующие молекулы антител согласно настоящему изобретению, как правило, включают в подходящий вектор экспрессии, чтобы облегчить получение антител согласно настоящему изобретению.

Возможные векторы экспрессии включают, но не ограничены перечисленными, космиды, плазмиды или модифицированные вирусы (например, ретровирусы с нарушенной репликацией, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), при условии, что вектор совместим с используемой клеткой-хозяином. Векторы экспрессии являются "подходящими для трансформирования клетки-хозяина", что означает, что указанные векторы экспрессии включают молекулу нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению и регуляторные последовательности, выбранные исходя из клеток-хозяев, которые будут использоваться для экспрессии, которые функционально связаны с молекулой нуклеиновой кислоты. "Функционально связан" означает, что нуклеиновая кислота связана с регуляторными последовательностями таким образом, что обеспечивает экспрессию указанной нуклеиновой кислоты.

Настоящее изобретение, следовательно, предполагает рекомбинантный вектор экспрессии, включающий молекулу нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению, или ее фрагмент, и регуляторные последовательности, необходимые для транскрипции и трансляции белковой последовательности, кодируемой молекулой нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению.

Подходящие регуляторные последовательности можно получить из целого ряда источников, включая бактериальные, грибковые, вирусные гены, гены млекопитающего или насекомого (например, см. регуляторные последовательности, описанные в Goeddel, 1990). Выбор подходящих регуляторных последовательностей зависит от выбранной клетки-хозяина, как обсуждается ниже, и его может легко осуществить рядовой специалист в данной области техники. Примеры таких регуляторных последовательностей включают транскрипционный промотор и энхансер или последовательность, связывающую РНК-полимеразу, последовательность участка связывания рибосомы, включая сигнал инициации трансляции. Дополнительно в зависимости от выбранной клетки-хозяина и используемого вектора другие последовательности, такие как точка начала репликации, дополнительные сайты рестрикции ДНК, энхансеры и последовательности, придающие способность к индуцированию транскрипции, могут быть включены в вектор экспрессии.

Рекомбинантные векторы экспрессии согласно настоящему изобретению также могут включать селектируемый маркерный ген, который облегчает селекцию клеток-хозяев, трансформированных или трансфицированных рекомбинантной молекулой согласно настоящему изобретению. Примеры селектируемых маркерных генов представляют собой гены, кодирующие белок, такой как неомидин и гигромицин, который придает устойчивость к некоторым лекарственным препаратам,  $\beta$ -галактозидаза, хлорамфеникол-ацетилтрансфераза, люцифераза светлячка или иммуноглобулин или его часть, такая как Fc-область иммуноглобулина, предпочтительно IgG. Транскрипцию селектируемых маркерных генов отслеживают по изменению концентрации селектируемого маркерного белка, такого как  $\beta$ -галактозидаза, хлорамфеникол-ацетилтрансфераза или люцифераза светлячка. Если селектируемый маркерный ген кодирует белок, придающий устойчивость к антибиотику, такую как устойчивость к неомидину, трансформированные клетки можно отобрать с помощью G418. Клетки, которые включили в себя селектируемый маркерный ген, выживут, тогда как другие клетки погибнут. Это позволяет визуализировать и анализировать экспрессию рекомбинантных векторов экспрессии согласно настоящему изобретению и, в частности, определять влияние мутации на экспрессию и фенотип.

Очевидно, что селектируемые маркеры можно ввести на отдельном от интересующей нуклеиновой кислоты векторе.

Рекомбинантные векторы экспрессии также могут включать гены, которые кодируют слитую группу, которая обеспечивает повышенную экспрессию рекомбинантного белка; повышенную растворимость рекомбинантного белка; и способствует очистке целевого рекомбинантного белка, действуя как лиганд при аффинной очистке (например, могут присутствовать подходящие "метки" для облегчения очистки

и/или идентификации, например гистидиновые метки или метки тус). Например, можно добавить сайт протеолитического расщепления в целевой рекомбинантный белок, чтобы обеспечить отделение рекомбинантного белка от слитой с ним группы после очистки слитого белка. Типичные слитые векторы экспрессии включают pGEX (Amrad Corp., Мельбурн, Австралия), pMal (New England Biolabs, Беверли, Массачусетс) и pRIT5 (Pharmacia, Пискатавэй, Нью-Джерси), которые сливают глутатион-S-трансферазу (GST), мальтоза-связывающий белок E или белок A, соответственно, с рекомбинантным белком.

Рекомбинантные векторы экспрессии можно ввести в клетки-хозяева для получения трансформированной клетки-хозяина. Термины "трансформированный", "трансфицированный", "трансформация" и "трансфекция" предполагаются включающими введение нуклеиновой кислоты (например, вектора) в клетку с помощью одной из многих возможных методик, известных в данной области техники. Термин "трансформированная клетка-хозяин" в данной заявке предполагается также включающим клетки, способные осуществлять гликозилирование, которые были трансформированы рекомбинантным вектором экспрессии согласно настоящему изобретению. Прокариотические клетки можно трансформировать нуклеиновой кислотой, например, путем электропорации или трансформации, опосредованной хлоридом кальция. Например, нуклеиновую кислоту можно ввести в клетки млекопитающих с помощью обычных методик, таких как соосаждение фосфатом кальция или хлоридом кальция, трансфекция, опосредованная DEAE-декстраном, липофекция, электропорация или микроинъекция. Подходящие способы трансформирования и трансфицирования клеток-хозяев можно найти в Sambrook и др., 1989, и других лабораторных руководствах.

Подходящие клетки-хозяева включают большое разнообразие эукариотических клеток-хозяев и прокариотических клеток. Например, белки согласно настоящему изобретению можно экспрессировать в дрожжевых клетках или клетках млекопитающих. Других подходящих клеток-хозяев можно найти в Goeddel, 1990. Вдобавок, белки согласно настоящему изобретению можно экспрессировать в прокариотических клетках, таких как *Escherichia coli* (Zhang и др., 2004).

Дрожжевые и грибковые клетки-хозяева, подходящие для осуществления настоящего изобретения, включают, но не ограничены перечисленными, *Saccharomyces cerevisiae*, вид *Pichia* или *Kluyveromyces* и различные виды рода *Aspergillus*. Примеры векторов для экспрессии в дрожжах *S. cerevisiae* включают pYepSec1 (Baldari и др., 1987), pMFa (Kurjan и Herskowitz, 1982), pJRY88 (Schultz и др., 1987) и pYES2 (Invitrogen Corporation, Сан-Диего, Калифорния). Протоколы для трансформации дрожжей и грибов хорошо известны рядовым специалистам в данной области техники (см. Hinnen и др., 1978; Ito и др., 1983 и Cullen и др. 1987).

Клетки млекопитающих, подходящие для осуществления настоящего изобретения, включают, среди прочих, клетки COS (например, ATCC No. CRL 1650 или 1651), BHK (например, ATCC No. CRL 6281), CHO (ATCC No. CCL 61), HeLa (например, ATCC No. CCL 2), 293 (ATCC No. 1573) и NS-1. Подходящие векторы экспрессии для направления экспрессии в клетках млекопитающих, как правило, включают промотор (например, полученный из вирусного материала, такого как полиома, аденовирус 2, цитомегаловирус и вирус обезьяны 40), а также другие последовательности, контролируемые транскрипцию и трансляцию. Примеры векторов экспрессии млекопитающих включают pCDM8 (Seed, B., 1987) и pMT2PC (Kaufman и др., 1987).

Учитывая идеи, приведенные в данной заявке, промоторы, терминаторы и способы введения векторов экспрессии подходящего типа в клетки растения, птицы и насекомого, эти способы также можно легко осуществить. Например, в одном варианте реализации белки согласно настоящему изобретению можно экспрессировать в клетках растений (см. Sinkar и др., 1987, в которой приводится обзор применения векторов *Agrobacterium rhizogenes*; см. также Zambryski и др., 1984, в которой описано применение векторов экспрессии для клеток растений, включая, среди прочих, PAPS2022, PAPS2023, и PAPS2034).

Клетки насекомых, подходящие для осуществления настоящего изобретения, включают клетки и линии клеток видов *Bombux*, *Trichoplusia* или *Spodotera*. Бакуловирусные векторы, доступные для экспрессии белков в культивируемых клетках насекомых (клетках SF 9), включают серию pAc (Smith и др., 1983) и серию pVL (Luckow и Summers 1989). Некоторые бакуловирусные системы экспрессии в клетках насекомых, подходящие для экспрессии рекомбинантных белков согласно настоящему изобретению, описаны в PCT/US 02442.

В качестве альтернативы белки согласно настоящему изобретению также можно экспрессировать в не принадлежащих человеку трансгенных животных, таких как крысы, кролики, овцы и свиньи (Hammer и др. 1985; Palmiter и др. 1983; Brinster и др. 1985; Palmiter и Brinster 1985, и патент США № 4736866).

Белки согласно настоящему изобретению также можно получить путем химического синтеза, применяя методики, хорошо известные в химии белков, такие как твердофазный синтез (Merrifield (1964); Frische и др., 1996) или синтез в гомогенном растворе (Houbenweyl, 1987).

Белки, слитые по N-концу или C-концу, включающие антитела и белки согласно настоящему изобретению, конъюгированные с другими молекулами, такими как белки, можно получить путем слияния с помощью рекомбинантных методик. Полученные слитые белки включают антитело или белок согласно настоящему изобретению, слитый с селективируемым белком, или маркерным белком, или белком-меткой, описанными в данной заявке. Антитела и белки согласно настоящему изобретению также можно конъю-

гировать с другими белками с помощью известных методик. Например, белки можно соединить, применяя гетеробифункциональные тиолсодержащие линкеры, описанные в WO 90/10457, N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитиопропионат) или N-сукцинимидил-5-тиоацетат. Примеры белков, которые можно применять для получения слитых белков или конъюгатов, включают связывающиеся с клетками белки, такие как иммуноглобулины, гормоны, факторы роста, лектины, инсулин, липопротеин низкой плотности, глюкагон, эндорфины, трансферрин, бомбезин, асиалогликопротеин, глутатион-S-трансфераза (GST), гемагглютинин (HA) и укороченный мус.

Вне зависимости от способа получения фрагмента нуклеиновой кислоты первого блокирующего VEGFR2 антитела к VEGF, фрагменты нуклеиновых кислот дополнительного подходящего антитела можно легко получить с помощью стандартных молекулярно-биологических методик. Для подтверждения того, что любой вариант, мутант или фрагмент нуклеиновой кислоты блокирующего VEGFR2 антитела к VEGF второго поколения подходит для применения в настоящем изобретении, указанный фрагмент нуклеиновой кислоты тестируют для подтверждения экспрессии блокирующего VEGFR2 антитела к VEGF в соответствии с настоящим изобретением. Предпочтительно указанный вариант, мутант или фрагмент нуклеиновой кислоты антитела второго поколения также тестируют для подтверждения гибридизации при стандартных, более предпочтительно стандартных строгих условиях гибридизации. Типичные подходящие условия гибридизации включают гибридизацию в приблизительно 7% додецилсульфате натрия (SDS), приблизительно 0.5 M NaPO<sub>4</sub>, приблизительно 1 mM EDTA при приблизительно 50°C и промывку приблизительно 1% SDS при приблизительно 42°C.

Так как можно легко получить множество антител человека, способы лечения согласно настоящему изобретению можно осуществить путем введения животному или пациенту, по меньшей мере, первого фрагмента нуклеиновой кислоты или молекулы, которая приводит к экспрессии биологически эффективного количества, по меньшей мере, первого блокирующего VEGFR2 антитела человека к VEGF согласно настоящему изобретению у пациента. "Фрагмент нуклеиновой кислоты или молекула, которая приводит к экспрессии блокирующего VEGFR2 антитела человека к VEGF", как правило, будет находиться, по меньшей мере, в виде экспрессионной конструкции или вектора и может находиться в виде экспрессионной конструкции или вектора, включенной в вирус или в рекомбинантную клетку-хозяина. Предпочтительные векторы для генотерапии согласно настоящему изобретению, как правило, будут представлять собой вирусные векторы, такие как включенные в рекомбинантный ретровирус, вирус простого герпеса (HSV), аденовирус, аденоассоциированный вирус (AAV), цитомегаловирус (CMV) и т.п.

Таким образом, настоящее изобретение дополнительно обеспечивает фрагменты нуклеиновых кислот или молекулы, включающие последовательности нуклеотидов, которые кодируют антитела согласно настоящему изобретению. Молекулы нуклеиновых кислот, по существу, гомологичные таким последовательностям, также включены. Предпочтительные молекулы нуклеиновых кислот кодируют последовательность аминокислот, приведенную в SEQ ID NO: 21. Более предпочтительные молекулы нуклеиновых кислот включают последовательность нуклеиновых кислот, определенную в SEQ ID NO: 20, или последовательность, по существу, гомологичную ей.

В еще одном дополнительном аспекте обеспечена экспрессионная конструкция или вектор экспрессии, включающий один или более фрагментов нуклеиновых кислот или молекул согласно настоящему изобретению. Предпочтительно экспрессионные конструкции или векторы являются рекомбинантными. Предпочтительно указанные конструкции или векторы дополнительно включают регуляторные последовательности, необходимые для транскрипции и трансляции белковой последовательности, кодируемой молекулой нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению.

В еще одном дополнительном аспекте обеспечены клетка-хозяин или вирус, включающий одну или более экспрессионных конструкций или векторов экспрессии согласно настоящему изобретению. Также обеспечены клетки-хозяева или вирусы, включающие одну или более молекул нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению. Клетка-хозяин или вирус, экспрессирующий антитело согласно настоящему изобретению, составляют еще один дополнительный аспект.

В еще одном дополнительном аспекте настоящего изобретения обеспечен способ получения антитела согласно настоящему изобретению, включающий стадию культивирования клеток-хозяев согласно настоящему изобретению. Предпочтительные способы включают стадии (i) культивирования клетки-хозяина, включающей один или более рекомбинантных векторов экспрессии или одну или более последовательностей нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению, при условиях, подходящих для экспрессии кодируемого антитела или белка; и возможно (ii) выделения антитела или белка из клетки-хозяина или из ростовой среды/супернатанта. Такие способы получения также могут включать стадию очистки антитела или белкового продукта и/или составления с антителом или продуктом композиции, включающей по меньшей мере один дополнительный компонент, такой как фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество.

В вариантах реализации, если антитело или белок согласно настоящему изобретению состоит из более чем одной полипептидной цепи (например, некоторые фрагменты, такие как фрагменты Fab), тогда все полипептиды предпочтительно экспрессируются в клетке-хозяине либо с того же, либо с отличного

вектора экспрессии, так что целые белки, например связывающие белки согласно настоящему изобретению, можно собрать в клетке-хозяине, а затем выделить или очистить из нее.

Антитела согласно настоящему изобретению также можно применять для получения дополнительных антител, которые связываются с VEGF. Такое применение включает, например, добавление, делецию, замену или вставку одной или более аминокислот в последовательность аминокислот родительского антитела с получением нового антитела, при этом указанное родительское антитело представляет собой одно из антител согласно настоящему изобретению, определенных в других местах в данной заявке, и тестирование полученного нового антитела, чтобы идентифицировать антитела, специфичные к VEGF. Такие способы можно применять для получения множества новых антител, которые можно протестировать на способность связывать VEGF. Предпочтительно указанное добавление, делеция, замена или вставка одной или более аминокислот происходит в одном или более доменах CDR.

Такую модификацию или мутацию родительского антитела можно осуществить любым подходящим способом, применяя методики, хорошо известные и представленные в данной области техники, например, путем осуществления способов неспецифического или направленного мутагенеза. Если будет применяться направленный мутагенез, тогда в одной стратегии, чтобы идентифицировать подходящие остатки для мутагенеза, используют разрешение кристаллической структуры комплекса связывающий белок-антиген, например, комплекса АТ-АГ, чтобы идентифицировать ключевые остатки, вовлеченные в связывание антигена (Davies и Cohen, 1996). Впоследствии, эти остатки можно подвергнуть мутации, чтобы усилить взаимодействие. В качестве альтернативы один или более аминокислотных остатков можно просто подвергнуть направленному мутагенезу и оценить влияние этой мутации на связывание с опухолевыми клетками.

Неспецифический мутагенез можно осуществить любым подходящим способом, например, с помощью допускающей ошибки ПЦР (ПЦР пониженной точности), перетасовки цепей или мутаторных штаммов *E. coli*.

Таким образом, один или более доменов VH согласно настоящему изобретению можно объединить с одним доменом VL или репертуаром доменов VL из любого подходящего источника, и полученные новые антитела протестировать, чтобы идентифицировать антитела, специфичные к VEGF. С другой стороны, один или более доменов VL согласно настоящему изобретению можно объединить с одним доменом VH или репертуаром доменов VH из любого подходящего источника, и полученные новые антитела протестировать, чтобы идентифицировать антитела, специфичные к VEGF. Например, выше обсуждалось, что было показано, что домен VL предпочтительного антитела согласно настоящему изобретению (r84/PGN311) можно объединить с несколькими различными доменами VH, при этом еще сохраняется способность связывать VEGF.

Аналогично, один или более или предпочтительно все три гипервариабельных участка доменов VH и/или VL согласно настоящему изобретению можно привить на один домен VH и/или VL или репертуар доменов VH и/или VL, в случае необходимости, и полученные новые антитела протестировать, чтобы идентифицировать антитела, специфичные к VEGF.

Было показано, что направленное введение мутаций в гипервариабельные участки, особенно в гипервариабельный участок CDR3 легкой и/или тяжелой цепи, представляет собой эффективную методику повышения аффинности антитела и является предпочтительным. Предпочтительно блоки из 3-4 аминокислот гипервариабельного участка CDR3 или специфические участки, названные "горячие точки", являются целевыми для мутагенеза.

"Горячие точки" представляют собой последовательности, в которых происходят *in vivo* соматические гипермутации (Neuberger и Milstein, 1995). Последовательности горячих точек можно определить как консенсусные последовательности нуклеотидов в некоторых кодонах. Консенсусная последовательность представляет собой тетрануклеотид, RGYW, в котором R может быть либо А, либо G, Y может быть С или Т и W может быть либо А, либо Т (Neuberger и Milstein, 1995). Вдобавок, остатки серина, кодируемые нуклеотидами AGY, преимущественно присутствуют в гипервариабельных участках вариабельного домена относительно кодируемых TCN, соответствующим потенциальным последовательностям горячих точек (Wagner и др., 1995).

Таким образом, последовательность нуклеотидов гипервариабельных участков тяжелых и легких цепей каждого антитела согласно настоящему изобретению можно исследовать на присутствие последовательностей горячих точек и кодонов AGY. Идентифицированные горячие точки гипервариабельных участков легкой и тяжелой цепи можно затем сравнить с зародышевыми последовательностями тяжелых и легких цепей, используя базу данных International ImmunoGen Tics (IMGT, <http://imgt.cines.fr/textes/vquest/>) (Davies и др., 1990). Если последовательность окажется идентичной зародышевой, это позволит предположить, что соматической мутации не произошло; следовательно, можно ввести неспецифические мутации, имитируя соматические явления, происходящие *in vivo* или в качестве альтернативы можно осуществить сайт-направленный мутагенез, например, в горячих точках и/или кодонах AGY. Напротив, обнаружение различия в последовательности показывает, что уже произошли некоторые соматические мутации. Останется только определить, является ли соматическая мутация *in vivo* оптимальной.

Предпочтительными горячими точками для введения мутаций являются такие, которые кодируют обращенные к поверхности аминокислоты, и предпочтительно такие, которые кодируют аминокислоты, которые образуют часть сайтов связывания антигена. Другие предпочтительные горячие точки для введения мутаций представляют собой такие, которые кодируют неконсервативные аминокислоты. Горячие точки, которые кодируют не выступающие наружу или консервативные аминокислоты внутри гипервариабельных участков, предпочтительно не подвергают мутагенезу. Эти остатки, как правило, важны для поддержания общей структуры и, скорее всего, не взаимодействуют с антигеном, так как они являются внутренними (не выступают наружу).

Способы осуществления описанных выше манипуляций над аминокислотами и доменами белков хорошо известны специалисту в данной области техники. Например, указанные манипуляции можно легко осуществить с помощью генетической инженерии на уровне нуклеиновых кислот, при этом молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие подходящие связывающие белки и их домены, модифицируют таким образом, что последовательность аминокислот полученного экспрессированного белка оказывается, в свою очередь, модифицированной подходящим способом.

Тестирование способности одного или более новых антител специфично связываться с VEGF можно осуществить с помощью любого подходящего способа, который хорошо известен и описан в данной области техники. Образцы VEGF широко доступны (см. примеры) и их можно легко использовать для анализа связывания, например, с помощью обычных способов, таких как ELISA, аффинная хроматография и т.д.

Новые антитела, полученные с помощью этих способов, предпочтительно будут иметь более высокую или улучшенную аффинность (или, по меньшей мере, эквивалентную аффинность) к VEGF, чем родительские антитела, и с ними можно обращаться и применять их таким же образом, что и антитела согласно настоящему изобретению, как описано в других местах в данной заявке (например, для терапии, диагностики, в композициях и т.д.).

Новые антитела, произведенные, полученные или которые можно получить с помощью этих способов, образуют еще один дополнительный аспект настоящего изобретения.

Настоящее изобретение дополнительно обеспечивает композиции, включающие по меньшей мере одно антитело или фрагмент антитела человека согласно настоящему изобретению, возможно включающие разбавитель. Такие композиции могут представлять собой фармацевтически приемлемые композиции или композиции для применения в лабораторных исследованиях. В аспекте фармацевтических композиций они могут предпочтительно входить в состав лекарственной формы для парентерального введения, такой как для внутривенного введения, или для офтальмологического введения.

Настоящее изобретение обеспечивает целый ряд способов и применений антител человека и фрагментов антител согласно настоящему изобретению. Применительно ко всем способам форма неопределенного артикля означает "по меньшей мере один", "по меньшей мере, первый", "один или более" или "множество" стадий в описываемых способах, если не указано иначе. Это особенно относится к стадиям введения в способах лечения. Таким образом, можно использовать не только различные дозы в рамках настоящего изобретения, но также можно применять различные количества доз, например инъекций, вплоть до и включая многократные инъекции. Можно применять комбинированное лечение, при котором введение агента осуществляют перед, после или во время введения терапевтического антитела к VEGF.

Предусмотрены различные полезные *in vitro* способы и применения антител согласно настоящему изобретению, которые играют важную биологическую роль. Во-первых, предусмотрены способы, и применения, связывания VEGF, которые, как правило, включают эффективное приведение во взаимодействие композиции, включающей VEGF, предпочтительно свободный (не связанный с рецептором) VEGF, по меньшей мере с первым блокирующим VEGFR2 антителом к VEGF согласно настоящему изобретению, или его антигенсвязывающим фрагментом.

Предусмотрены способы и применения, обнаружения VEGF, которые, как правило, включают введение во взаимодействие композиции, в которой прогнозируют наличие VEGF, по меньшей мере, с первым антителом человека согласно настоящему изобретению, или его антигенсвязывающим фрагментом, при условиях, эффективных для обеспечения образования комплексов VEGF/антитело, и обнаружение образованных таким образом комплексов. Способы детектирования и применения можно использовать применительно к биологическим образцам, например, при диагностике ангиогенеза и опухолей, и также обеспечены диагностические наборы, основанные на них.

Настоящее изобретение обеспечивает способы и применения предпочтительного или специфического ингибирования связывания VEGF с рецептором VEGF - VEGFR2, которые, как правило, включают приведение во взаимодействие в присутствии VEGF популяции клеток или тканей, которые включают эндотелиальные клетки, которые экспрессируют VEGFR2 (KDR/Flk-1), с композицией, включающей биологически эффективное количество, по меньшей мере, первого блокирующего VEGFR2 антитела человека к VEGF согласно настоящему изобретению, или его антигенсвязывающего фрагмента, при условиях, эффективных для ингибирования связывания VEGF с рецептором VEGF - VEGFR2.

Предусмотрены способы и применения значительного ингибирования связывания VEGF с рецепто-

ром VEGF - VEGFR2, не вызывая значительного ингибирования связывания VEGF с рецептором VEGF - VEGFR1. Эти способы включают приведение во взаимодействие в присутствии VEGF популяции клеток или тканей, которые включают популяцию эндотелиальных клеток, которые экспрессируют VEGFR2 (KDR/Flk-1) и VEGFR1 (Flt-1), с композицией, включающей биологически эффективное количество, по меньшей мере, первого блокирующего VEGFR2 антитела человека к VEGF согласно настоящему изобретению, или его антигенсвязывающий фрагмент, при условиях, эффективных для ингибирования связывания VEGF с рецептором VEGF - VEGFR2, не вызывая значительного ингибирования связывания VEGF с рецептором VEGF - VEGFR1.

Дополнительные способы и применения согласно настоящему изобретению состоят в анализе биологических ролей рецепторов VEGF, определенных как VEGFR2 и VEGFR1, и включают следующие стадии:

(a) приведение во взаимодействие биологической композиции или ткани, которые включают VEGF, и популяции клеток, которые экспрессируют рецепторы VEGFR2 (KDR/Flk-1) и VEGFR1 (Flt-1), с композицией, включающей биологически эффективное количество, по меньшей мере, первого блокирующего VEGFR2 антитела человека к VEGF согласно настоящему изобретению, или его антигенсвязывающего фрагмента; и

(b) определение влияния блокирующего VEGFR2 антитела к VEGF согласно настоящему изобретению, по меньшей мере, на первый биологический ответ на VEGF; при этом

(i) изменение биологического ответа в присутствии блокирующего VEGFR2 антитела к VEGF согласно настоящему изобретению свидетельствует о том, что ответ опосредован рецептором VEGFR2; и

(ii) сохранение биологического ответа в присутствии блокирующего VEGFR2 антитела к VEGF согласно настоящему изобретению свидетельствует о том, что ответ опосредован рецептором VEGFR1.

Предусмотрены способы ингибирования пролиферации и их применения, включающие специфичное ингибирование VEGF-индуцируемой пролиферации и/или миграции эндотелиальных клеток, которые, как правило, включают приведение во взаимодействие популяции клеток или тканей, которые включают популяцию эндотелиальных клеток и VEGF, с композицией, включающей биологически эффективное количество, по меньшей мере, первого блокирующего VEGFR2 антитела человека к VEGF согласно настоящему изобретению, или антигенсвязывающего фрагмента блокирующего VEGFR2 антитела к VEGF согласно настоящему изобретению, при условиях, эффективных для ингибирования VEGF-индуцируемой пролиферации и/или миграции эндотелиальных клеток.

Также предусмотрены способы и применения для ингибирования индуцированной VEGFR2 функции макрофагов, которые, как правило, включают приведение во взаимодействие популяции клеток или тканей, которые включают макрофаги и VEGF, с композицией, включающей биологически эффективное количество, по меньшей мере, первого блокирующего VEGFR2 антитела человека к VEGF согласно настоящему изобретению, или антигенсвязывающего фрагмента антитела к VEGF, при условиях, эффективных для ингибирования VEGFR2-индуцируемой функции макрофагов.

Предшествующие способы предпочтительно применяют при лечении опухолей, при этом указанные способы позволяют ингибировать индуцированную VEGFR2 функцию макрофагов, тем самым снижая способность инфильтрирующих опухоль макрофагов, которые экспрессируют VEGFR2, вызывать прогрессирование и/или метастазирование опухоли.

Дополнительно предусмотрены способы, и применения, ингибирования VEGF-индуцируемой пролиферации и/или миграции эндотелиальных клеток и, возможно, ангиогенеза, не вызывая при этом значительного ингибирования опосредованной VEGFR1 стимуляции остеокластов или хондрокластов. Указанные способы, как правило, включают приведение во взаимодействие популяции клеток или тканей, которые включают эндотелиальные клетки и по меньшей мере один из остеокластов или хондрокластов, с композицией, включающей биологически эффективное количество, по меньшей мере, первого блокирующего VEGFR2 антитела человека к VEGF согласно настоящему изобретению, или антигенсвязывающего фрагмента антитела, при условиях, эффективных для ингибирования VEGF-индуцируемой пролиферации и/или миграции эндотелиальных клеток или ангиогенеза, не вызывая при этом значительного ингибирования опосредованной VEGFR1 стимуляции остеокластов или хондрокластов.

Предшествующие способы и применения можно осуществить *in vitro* и *in vivo*, в последнем случае, когда указанные ткани или клетки находятся внутри животного и человека, антитело к VEGF вводят животному. В обоих случаях указанные способы и применения становятся способами и применениями для ингибирования ангиогенеза, включающими приведение во взаимодействие ткани, включающей ангиогенные или потенциально ангиогенные кровеносные сосуды, или совокупностей (популяции) ангиогенных или потенциально ангиогенных кровеносных сосудов, т.е. таких, которые подвержены или потенциально подвержены действию VEGF, с антиангиогенной композицией, включающей биологически эффективное количество, по меньшей мере, первого блокирующего VEGFR2 антитела к VEGF согласно настоящему изобретению, или его антигенсвязывающего фрагмента, при условиях, эффективных для ингибирования ангиогенеза.

Если совокупности потенциально ангиогенных кровеносных сосудов поддерживают *ex vivo*, настоящее изобретение полезно для программ поиска новых лекарственных препаратов. Скрининговые

тесты *in vitro*, с достоверными положительным и отрицательным контролями, полезны в качестве первого этапа при разработке лекарственных препаратов для ингибирования или активирования ангиогенеза, а также при установлении дополнительных сведений об ангиогенном процессе. Если совокупность потенциально ангиогенных кровеносных сосудов расположена внутри животного или пациента, антиангиогенную композицию вводят животному в качестве терапии.

"Биологически эффективные количества", в аспекте каждого из предшествующих способов ингибирования, следовательно, представляют собой такие количества блокирующих VEGFR2 антител человека к VEGF согласно настоящему изобретению, которые эффективно ингибируют индуцированную VEGF пролиферацию и/или миграцию эндотелиальных клеток; ингибируют индуцированную VEGF пролиферацию и/или миграцию эндотелиальных клеток, не вызывая значительного ингибирования индуцированных VEGFR1 клеточных явлений; ингибируют индуцированную VEGF пролиферацию и/или миграцию эндотелиальных клеток или ангиогенез, не вызывая значительного ингибирования стимуляции VEGFR1 остеокластов или хондрокластов; и, в целом, снижают пролиферацию и/или миграцию сосудистых эндотелиальных клеток таким образом, чтобы эффективно ингибировать рост кровеносных сосудов или ангиогенез.

Настоящее изобретение, таким образом, обеспечивает способы и применения для ингибирования индуцированного VEGF ангиогенеза и предпочтительно лечения ангиогенных заболеваний, не вызывая значительного ингибирования стимуляции VEGF остеокластов или хондрокластов. Указанные способы, как правило, включают приведение во взаимодействие популяции клеток или тканей, которые включают эндотелиальные клетки и по меньшей мере один из остеокластов или хондрокластов, с композицией, включающей биологически эффективное количество, по меньшей мере, первого блокирующего VEGFR2 антитела человека к VEGF согласно настоящему изобретению, или антигенсвязывающего фрагмента антитела, при условиях, эффективных для ингибирования индуцированного VEGF ангиогенеза и для лечения ангиогенного заболевания, не вызывая значительного ингибирования стимуляции VEGF остеокластов или хондрокластов.

Дополнительно предусмотрены способы и применения для ингибирования индуцированного VEGF ангиогенеза и предпочтительно лечения ангиогенного заболевания, не оказывая при этом значительных побочных эффектов на метаболизм костей (костной ткани). Указанные способы, как правило, включают приведение во взаимодействие ткани или совокупности ангиогенных сосудов, которые включают сосудистые эндотелиальные клетки и по меньшей мере один из остеокластов или хондрокластов, с композицией, включающей биологически эффективное количество, по меньшей мере, первого блокирующего VEGFR2 антитела человека к VEGF согласно настоящему изобретению, или антигенсвязывающего фрагмента антитела, при условиях, эффективных для ингибирования индуцированного VEGF ангиогенеза и для лечения ангиогенного заболевания, не оказывая при этом значительных побочных эффектов на метаболизм костей, так как при этом не происходит значительного нарушения активности остеокластов или хондрокластов.

Скрининг антиангиогенных лекарственных препаратов (*in vitro*) и терапия (*in vivo*) предусмотрены для животных и пациентов, которые страдают, или находятся в группе риска развития, от любого заболевания или расстройства, описываемого нежелательной, неприемлемой, нарушенной, избыточной и/или патологической васкуляризацией. Для рядовых специалистов в данной области техники очевидно, что так как нарушенный ангиогенез встречается при множестве заболеваний и расстройств, данную антиангиогенную терапию, как только была доказана ее эффективность в любой приемлемой модельной системе, можно применять для лечения полного диапазона заболеваний и расстройств, связанных с ангиогенезом.

Способы и применения согласно настоящему изобретению особенно предназначены для применения у животных и пациентов, которые страдают, или находятся в группе риска развития, от любой формы васкуляризированной опухоли; дистрофии желтого пятна, включая возрастную дистрофию желтого пятна; артрита, включая ревматоидный артрит; атеросклероза и атеросклеротических бляшек; диабетической ретинопатии и других ретинопатий; гиперплазии щитовидной железы, включая болезнь Грейвса; гемангиомы; неоваскулярной глаукомы и псориаза.

Способы и применения согласно настоящему изобретению дополнительно предназначены для лечения животных и пациентов, которые страдают, или находятся в группе риска развития, от артериовенозных мальформаций (AVM), менингиомы и сосудистого рестеноза, включая рестеноз, возникающий после ангиопластики. Другими предполагаемыми мишенями терапевтических способов и применений являются животные и пациенты, которые страдают, или находятся в группе риска развития, от ангиофибромы, дерматита, эндометриоза, гемофилической артропатии, гипертрофических рубцов, воспалительных заболеваний и расстройств, пиогенной гранулемы, склеродермии, синовита, трахомы и адгезии сосудов.

В патентах США №№ 5712291 и 6524583, каждый из которых специально включен в данную заявку посредством ссылки, описано, что каждая из описанных отчасти предпочтительных групп лечения ни в коей мере не являются исчерпывающими для типа состояний, которые можно лечить с помощью настоящего изобретения. Каждый из патентов США №№ 5712291 и 6524583 включен в данную заявку по-

средством ссылки для некоторых определенных целей, включая цель определения целого ряда других состояний, которые можно эффективно лечить антиангиогенными терапевтическими препаратами; цель показать, что лечение всех ангиогенных заболеваний представляет собой единую концепцию, как только определенная категория ингибирующих ангиогенез соединений была описана и заявлена (в данном случае, блокирующие VEGFR2 антитела человека к VEGF согласно настоящему изобретению), и цель показать, что лечение всех ангиогенных заболеваний становится возможным благодаря результатам всего лишь одной модельной системы.

В других дополнительных аспектах, и как описано в патентах США №№ 5712291 и 6524583, каждый из которых включен в данную заявку посредством ссылки, способы и применения согласно настоящему изобретению предназначены для лечения животных и пациентов, которые страдают, или находятся в группе риска развития, от аномальной пролиферации сосудиисто-волоконистой ткани, розовых угрей, синдрома приобретенного иммунодефицита, закупорки артерии, атопического кератита, бактериальных язв, болезни Бехчета, гемопоэтических опухолей, обструктивной болезни сонных артерий, химических ожогов, хориоидальной неоваскуляризации, хронического воспаления, хронического отслоения сетчатки, хронического увеита, хронического витрита, чрезмерного использования контактных линз, отторжения имплантата роговицы, неоваскуляризации роговицы, неоваскуляризации имплантата роговицы, болезни Крона, болезни Илза, эпидемического кератоконъюнктивита, грибковых язв, инфекций вирусом простого герпеса, инфекций вирусом опоясывающего герпеса, синдромов повышенной вязкости крови, саркомы Капоши, лейкемии, разрушения липидов, болезни Лайма, краевого кератолиза, язвы Морена, инфицирования микобактериями, отличного от лепры, миопии, офтальмологического неоваскулярного заболевания, ямки диска зрительного нерва, синдрома Осслера-Вебера (Осслера-Вебера-Рандю), остеоартрита, болезни Педжета, среднего увеита (*pars planitis*), пемфигоида, фликтенулеза, полиартериита, осложнений после лазерной хирургии, инфекций простейшими, эластической псевдоксантомы, сухого кератита птеригиума (*pterygium keratitis sicca*), радиальной кератотомии, неоваскуляризации сетчатки, ретинопатии недоношенных, ретролентальных фиброплазий, саркоида, склерита, серповидноклеточной анемии, синдрома Шегрена, солидных опухолей, болезни Штаргардта, болезни Стивенса-Джонсона, верхнего лимбального кератита, сифилиса, системной волчанки, краевой дегенерации Терье, токсоплазмоза, травмы, опухолей саркомы Юинга, опухолей нейробластомы, опухолей остеосаркомы, опухолей ретинобластомы, опухолей рабдомиосаркомы, язвенного колита, закупорки вен, дефицита витамина А и саркоидоза Вегенера.

Настоящее изобретение дополнительно обеспечивает способы и применения для лечения животных и пациентов, которые страдают, или находятся в группе риска развития, от артрита, наряду с лечением артрита с применением иммунологических агентов, описанных в патенте США № 5753230, специально включенном в данную заявку посредством ссылки. Патент США № 5972922 также специально включен в данную заявку посредством ссылки, чтобы еще лучше дополнительно проиллюстрировать применение антиангиогенной стратегии для лечения нежелательного ангиогенеза, связанного с диабетом, паразитарными заболеваниями, аномальным заживлением ран, гипертрофией после хирургического вмешательства, ожогов, повреждения или травмы, ингибированием роста волос, ингибированием овуляции и образованием желтого тела, ингибированием имплантации и ингибированием развития зародыша в матке. Все из перечисленных состояний следовательно можно лечить с помощью способов и применений согласно настоящему изобретению.

Патент США № 5639757 дополнительно специально включен в данную заявку посредством ссылки, чтобы проиллюстрировать применение антиангиогенных стратегий для общего лечения отторжения трансплантата. Лечение воспаления легких, нефротического синдрома, преэклампсии, перикардального выпота, такого как связанный с перикардитом, и плеврального выпота с применением антиангиогенных стратегий, основанных на ингибировании VEGF, описано в WO 98/45331, специально включенной в данную заявку посредством ссылки. Животные и пациенты, которые страдают, или находятся в группе риска развития, от любого из предшествующих состояний, следовательно, можно лечить с помощью способов и применений согласно настоящему изобретению.

В WO 98/16551, специально включенной в данную заявку посредством ссылки, описано, что биологические молекулы, которые антагонизируют функцию VEGF, также подходят для применения для лечения заболеваний и расстройств, описываемых нежелательной сосудистой проницаемостью. Соответственно, антагонизирующие VEGF антитела, способы и применения согласно настоящему изобретению применимы для лечения животных и пациентов, которые страдают, или находятся в группе риска развития, от заболеваний и расстройств, описываемых нежелательной сосудистой проницаемостью, например от отека, связанного с опухолями мозга, асцита, связанного со злокачественными новообразованиями, синдрома Мейгса, воспаления легких, нефротического синдрома, перикардального выпота и плеврального выпота и т.п.

Хотя лечение всех перечисленных заболеваний возможно с помощью настоящего унифицированного изобретения, особенно предпочтительный аспект способов и применений согласно настоящему изобретению представляет собой применение антиангиогенной терапии у животных и пациентов, которые страдают, или находятся в группе риска развития, от васкуляризированной солидной опухоли, метаста-



тической опухоли или метастаз от первичной опухоли.

Дополнительно предусмотрены способы и применения для ингибирования индуцированного VEGF ангиогенеза, и предпочтительно оказывающие противоопухолевый или улучшенный противоопухолевый эффект, не вызывая при этом значительного ингибирования стимуляции VEGF остеокластов или хондрокластов. Указанные способы, как правило, включают приведение во взаимодействие ткани, опухолевого окружения или совокупности ангиогенных сосудов, которые включают сосудистые эндотелиальные клетки и по меньшей мере один из макрофагов, остеокластов или хондрокластов, с композицией, включающей биологически эффективное количество, по меньшей мере, первого блокирующего VEGFR2 антитела человека к VEGF согласно настоящему изобретению, или антигенсвязывающего фрагмента антитела, при условиях, эффективных для ингибирования индуцированного VEGF ангиогенеза и для оказания противоопухолевого или улучшенного противоопухолевого эффекта, не вызывая при этом значительного ингибирования стимуляции VEGF остеокластов или хондрокластов.

Настоящее изобретение, таким образом, дополнительно обеспечивает способы и применения для лечения заболевания, связанного с ангиогенезом, включая все формы рака, связанные с ангиогенезом, включающие введение животному или пациенту, страдающему от такого заболевания или рака, терапевтически эффективного количества, по меньшей мере, первой фармацевтической композиции, которая включает блокирующее VEGFR2 антитело человека к VEGF согласно настоящему изобретению, или антигенсвязывающий фрагмент, или иммуноконъюгат такого антитела к VEGF.

Вдобавок, способы и применения согласно настоящему изобретению включают способы и применения для ингибирования лимфоангиогенеза, которые включают приведение во взаимодействие ткани, включающей лимфатические сосуды или совокупности лимфатических сосудов, особенно лимфатических сосудов, подвергнутых или потенциально подвергнутых действию VEGF, с антиангиогенной композицией, включающей биологически эффективное количество, по меньшей мере, первого блокирующего VEGFR2 антитела к VEGF согласно настоящему изобретению или его антигенсвязывающего фрагмента, при условиях, эффективных для ингибирования лимфоангиогенеза.

Если совокупности лимфатических сосудов поддерживают *ex vivo*, настоящее изобретение полезно для программы поиска новых лекарственных препаратов. Если совокупность лимфатических сосудов расположена внутри животного или пациента, композицию согласно настоящему изобретению вводят животному в качестве терапии.

В аспекте ингибирования лимфоангиогенеза "биологически эффективные количества" представляют собой такие количества блокирующих VEGFR2 антител человека к VEGF согласно настоящему изобретению, которые эффективно ингибируют индуцированный VEGF лимфоангиогенез, т.е. стимулированный VEGF-А лимфоангиогенез, индуцированный VEGFR2. Предпочтительно индуцированный VEGF лимфоангиогенез будет индуцирован, не вызывая значительного ингибирования стимулированных VEGFR1 явлений, таких как стимуляция остеокластов или хондрокластов.

Настоящее изобретение, таким образом, включает способы и применения для лечения заболевания, связанного с лимфоангиогенезом, включая все формы рака, связанного с лимфоангиогенезом, включающие введение животному или пациенту, страдающему от такого заболевания или рака, терапевтически эффективного количества, по меньшей мере, первой фармацевтической композиции, которая включает блокирующее VEGFR2 антитело человека к VEGF согласно настоящему изобретению, или антигенсвязывающий фрагмент, или иммуноконъюгат такого антитела к VEGF.

В еще одном дополнительном аспекте настоящего изобретения предусмотрено применение антител человека согласно настоящему изобретению, или антигенсвязывающего фрагмента, или иммуноконъюгата такого антитела в производстве композиции или лекарственного средства для применения в терапии, визуализации или диагностике.

В еще одном дополнительном аспекте обеспечены антитела человека согласно настоящему изобретению, или антигенсвязывающий фрагмент, или иммуноконъюгат такого антитела для применения в терапии, диагностике или визуализации.

Вдобавок, настоящее изобретение обеспечивает композиции, включающие антитела человека согласно настоящему изобретению, или антигенсвязывающий фрагмент, или иммуноконъюгат такого антитела, с одним или более фармацевтически приемлемым вспомогательным веществом, носителем, разбавителем, буфером или стабилизатором.

Способы *in vivo*, описанные в данной заявке, как правило, осуществляют в отношении млекопитающего. Можно лечить любое млекопитающее, например людей и любой домашний скот, домашнее или лабораторное животное. Конкретные примеры включают мышей, крыс, свиней, кошек, собак, овец, кроликов, коров и обезьян. Предпочтительно, тем не менее, млекопитающее представляет собой человека.

Таким образом, термин "животное" или "пациент" в данной заявке включает любое млекопитающее, например людей и любой домашний скот, домашнее или лабораторное животное. Конкретные примеры включают мышей, крыс, свиней, кошек, собак, овец, кроликов, коров и обезьян. Предпочтительно, тем не менее, животное или пациент представляет собой человека.

Настоящее изобретение соединяет как антиангиогенные способы с применением неконъюгирован-

ных или изолированных антител и их фрагментов, так и нацеленные на сосуды способы с применением иммуноконъюгатов, в которых антитело человека согласно настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент функционально связан с терапевтическим агентом. Если конкретно не указано иначе или как очевидно из научной терминологии, термин "антитело и его фрагмент" в данной заявке, следовательно, означает "неконъюгированное или изолированное" антитело человека или его фрагмент, которые не присоединены к другому агенту, в частности к терапевтическому или диагностическому агенту. Эти определения не исключают модификации антитела, такие как, исключительно в качестве примера, модификации для улучшения биологического времени полужизни, аффинности, avidности или других свойств антитела или комбинации антитела с другими эффекторами.

В объем антиангиогенных способов лечения и применений согласно настоящему изобретению также входит применение как неконъюгированных или изолированных антител, так и иммуноконъюгатов. В антиангиогенных способах лечения, основанных на иммуноконъюгатах, антитело человека согласно настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент предпочтительно функционально связан со вторым антиангиогенным агентом (при этом само антитело к VEGF будет первым антиангиогенным агентом). Присоединенные антиангиогенные агенты могут представлять собой такие, которые оказывают непосредственное или опосредованное антиангиогенное действие.

Антиангиогенные способы лечения и применения включают введение животному или пациенту, страдающему от заболевания, связанного с ангиогенезом, включая все формы рака, связанного с ангиогенезом, терапевтически эффективного количества, по меньшей мере, первой фармацевтической композиции, которая включает, по меньшей мере, первое неконъюгированное или изолированное блокирующее VEGFR2 антитело человека к VEGF согласно настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент. В равной мере введенное антитело может быть функционально связано со вторым антиангиогенным агентом.

Способы и применения для лечения метастатического рака включают введение животному или пациенту, страдающему от метастатического рака, терапевтически эффективного количества, по меньшей мере, первой фармацевтической композиции, которая включает, по меньшей мере, первое неконъюгированное или изолированное блокирующее VEGFR2 антитело человека к VEGF согласно настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент. Дополнительные способы представляют собой такие, при которых введенное антитело может быть функционально связано со вторым антиангиогенным агентом.

Способы и применения для уменьшения метастазирования от первичного рака включают введение терапевтически эффективного количества, по меньшей мере, первого неконъюгированного или изолированного блокирующего VEGFR2 антитела человека к VEGF согласно настоящему изобретению или его антигенсвязывающего фрагмента животному или пациенту, которые страдают или лечились от первичного рака. Аналогично, введенное антитело может быть функционально связано со вторым антиангиогенным агентом.

Способы и применения для лечения заболевания, связанного с ангиогенезом, включая все формы рака, связанного с ангиогенезом, дополнительно включают введение животному или пациенту, страдающему от такого заболевания, например от васкуляризированной опухоли, по меньшей мере, первого неконъюгированного или изолированного блокирующего VEGFR2 антитела человека к VEGF согласно настоящему изобретению или его антигенсвязывающего фрагмента в количестве, эффективном для ингибирования ангиогенеза в месте развития заболевания или в васкуляризированной опухоли. В равной мере введенное антитело может быть функционально связано со вторым антиангиогенным агентом.

Способы и применения для лечения заболевания, связанного с ангиогенезом, включая все формы рака, связанного с ангиогенезом, дополнительно включают введение животному или пациенту, страдающему от такого заболевания или рака, по меньшей мере, первого неконъюгированного или изолированного блокирующего VEGFR2 антитела человека к VEGF согласно настоящему изобретению или его антигенсвязывающего фрагмента в количестве, эффективном для ингибирования связывания VEGF с рецептором VEGF - VEGFR2 (KDR/Flk-1), тем самым ингибируя ангиогенез в месте развития заболевания или рака. Введенное антитело в качестве альтернативы может быть функционально связано со вторым антиангиогенным агентом.

Способы и применения для лечения заболевания, связанного с ангиогенезом, включая все формы рака, связанного с ангиогенезом, также включают введение животному или пациенту, страдающему от васкуляризированной опухоли, терапевтически эффективного количества, по меньшей мере, первого неконъюгированного или изолированного блокирующего VEGFR2 антитела человека к VEGF согласно настоящему изобретению или его антигенсвязывающего фрагмента; при этом указанное антитело против VEGF, по существу, ингибирует связывание VEGF с рецептором VEGF - VEGFR2 (KDR/Flk-1), не вызывая значительного ингибирования связывания VEGF с рецептором VEGF - VEGFR1 (Flt-1). В равной мере введенное антитело может быть функционально связано со вторым антиангиогенным агентом.

Еще дополнительные способы и применения для лечения заболевания, связанного с ангиогенезом, включая все формы рака, связанного с ангиогенезом, включают введение животному или пациенту, страдающему от такого заболевания, рака или васкуляризированной опухоли, терапевтически эффективного

количества, по меньшей мере, первого неконъюгированного или изолированного блокирующего VEGFR2 антитела человека к VEGF согласно настоящему изобретению или его антигенсвязывающего фрагмента; при этом указанное антитело против VEGF, по существу, ингибирует связывание VEGF с рецептором VEGF - VEGFR2 (KDR/Flk-1), не вызывая значительного ингибирования связывания VEGF с рецептором VEGF - VEGFR1 (Flt-1), тем самым ингибируя ангиогенез в месте развития заболевания, рака или васкуляризированной опухоли, значительно не нарушая опосредованные VEGFR1 явления у животного. Введенное антитело также может быть функционально связано со вторым антиангиогенным агентом.

Дополнительные способы и применения для лечения заболевания, связанного с ангиогенезом, включая все формы рака, связанного с ангиогенезом, включают введение животному или пациенту, страдающему от такого заболевания, рака или васкуляризированной опухоли, терапевтически эффективного количества, по меньшей мере, первого неконъюгированного или изолированного блокирующего VEGFR2 антитела человека к VEGF согласно настоящему изобретению или его антигенсвязывающего фрагмента; при этом указанное антитело к VEGF, по существу, ингибирует связывание VEGF с рецептором VEGF - VEGFR2 (KDR/Flk-1), не вызывая значительного ингибирования связывания VEGF с рецептором VEGF - VEGFR1 (Flt-1), тем самым ингибируя ангиогенез в месте развития заболевания, рака или васкуляризированной опухоли, включая ингибирование экспрессирующих VEGFR2 макрофагов в месте развития заболевания, в частности экспрессирующих VEGFR2 инфильтрирующих опухоль макрофагов. Введенное антитело также может быть функционально связано со вторым антиангиогенным агентом.

Еще дополнительные способы и применения для лечения заболевания, связанного с ангиогенезом, включая все формы рака, связанного с ангиогенезом, включают введение животному или пациенту, страдающему от такого заболевания, рака или васкуляризированной опухоли, терапевтически эффективного количества, по меньшей мере, первого неконъюгированного или изолированного блокирующего VEGFR2 антитела человека к VEGF согласно настоящему изобретению, или его антигенсвязывающего фрагмента; при этом указанное антитело против VEGF, по существу, ингибирует связывание VEGF с рецептором VEGF - VEGFR2 (KDR/Flk-1), не вызывая значительного ингибирования связывания VEGF с рецептором VEGF - VEGFR1 (Flt-1), тем самым ингибируя ангиогенез в месте развития заболевания, рака или васкуляризированной опухоли, не вызывая значительного нарушения активности остеокластов и/или хондрокластов у животного. В равной мере введенное антитело может быть функционально связано со вторым антиангиогенным агентом.

Способы и применения для лечения заболевания, связанного с ангиогенезом, включая все формы рака, связанного с ангиогенезом, дополнительно включают введение животному или пациенту, страдающему от такого заболевания, например от васкуляризированной опухоли, по меньшей мере, первого неконъюгированного или изолированного блокирующего VEGFR2 антитела человека к VEGF согласно настоящему изобретению или его антигенсвязывающего фрагмента в количестве, эффективном для ингибирования ангиогенеза в месте развития заболевания или васкуляризированной опухоли, не оказывая при этом значительного нежелательного действия на метаболизм костей.

Перечисленные антиангиогенные способы лечения и применения, как правило, включают введение фармацевтически эффективной композиции животному или пациенту системно, например, путем трансдермальной, внутримышечной, внутривенной инъекции и т.п. Тем не менее, любой путь введения, который позволяет терапевтическому агенту локализоваться в ангиогенном сайте или сайтах, включая опухоль или внутриопухолевые эндотелиальные клетки сосудов, будет приемлемым. Следовательно, другие подходящие пути доставки включают пероральный, ректальный, назальный, топический и вагинальный. Патент США № 5712291 особенно включен в данную заявку посредством ссылки с целью включения дополнительного описания различных путей введения, которые могут быть включены применительно к лечению ангиогенного заболевания или расстройства.

Для применений и способов лечения артрита, например, можно применять внутрисуставное введение, которое описано для других иммунологических агентов в патенте США № 5753230, особенно включенном в данную заявку посредством ссылки. Для патологических состояний, связанных с глазами, предполагаются офтальмологические лекарственные формы и введение.

"Введение" в данной заявке означает введение или доставку лекарств, включающих блокирующее VEGFR2 антитело человека к VEGF в количестве(ах) и в течение периода(ов) времени, эффективных для оказания антиангиогенного и/или противоопухолевого действия. Как правило, предпочтительно пассивное введение белкового лекарства, отчасти, благодаря его простоте и воспроизводимости.

Тем не менее, термин "введение" в данной заявке относится к любому и всем средствам, с помощью которых блокирующие VEGFR2 антитела к VEGF согласно настоящему изобретению доставляются или другим способом обеспечиваются сосудистой сети опухоли. "Введение", следовательно, включает предоставление клеток, которые продуцируют блокирующее VEGFR2 антитело человека к VEGF согласно настоящему изобретению таким образом, чтобы привести к его эффективной доставке в опухоль. В таких вариантах реализации может быть желательным включить в состав лекарственной формы или упаковать клетки в избирательно проницаемую мембрану, структуру или имплантируемое устройство, как правило, такое, которое можно удалить для прекращения терапии. Экзогенное блокирующее VEGFR2 антитело

человека к VEGF согласно настоящему изобретению, как правило, будет все же предпочтительным, так как представляет собой неинвазивный способ, который позволяет тщательно отслеживать и контролировать дозу.

Терапевтические способы и применения согласно настоящему изобретению также распространяются на введение нуклеиновых кислот, которые кодируют блокирующее VEGFR2 антитело человека к VEGF согласно настоящему изобретению таким способом, чтобы это привело к их эффективной экспрессии вблизи от опухоли или их локализации в опухоли. Можно применять любую методику генотерапии, такую как доставка изолированной ДНК, рекомбинантных генов и векторов, доставка, основанная на клеточной системе, включая манипуляции *ex vivo* над клетками пациентов, и т.п.

В еще дополнительных вариантах реализации настоящее изобретение обеспечивает способы и применения для доставки выбранных терапевтических или диагностических агентов в ангиогенные кровеносные сосуды, связанные с заболеванием. Такие варианты реализации предпочтительно применяют для доставки выбранных терапевтических или диагностических агентов в опухоль или внутриопухолевую сосудистую сеть или основное вещество опухоли и включают введение животному или пациенту, имеющему васкуляризованную опухоль, биологически эффективного количества композиции, включающей, по меньшей мере, первый иммуноконъюгат, в котором диагностический или терапевтический агент функционально связан с блокирующим VEGFR2 антителом человека к VEGF согласно настоящему изобретению или его антигенсвязывающим фрагментом.

Хотя понимание механизма действия, лежащего в основе аспектов направленной доставки настоящего изобретения, не требуется для осуществления таких вариантов реализации, полагают, что антитела согласно настоящему изобретению доставляют присоединенные агенты в ангиогенную и сосудистую сеть опухоли посредством связывания с VEGF, связанным с VEGFR1, экспрессированном на них. Эти способы и применения согласно настоящему изобретению, таким образом, относятся к доставке выбранных терапевтических или диагностических агентов в ангиогенные кровеносные сосуды, опухоль или внутриопухолевую сосудистую сеть, и включают введение животному или пациенту, нуждающемуся в лечении, биологически эффективного количества композиции, включающей иммуноконъюгат, в котором диагностический или терапевтический агент функционально связан, по меньшей мере, с первым блокирующим VEGFR2 антителом человека к VEGF согласно настоящему изобретению или его антигенсвязывающим фрагментом, таким образом, чтобы позволить эффективное связывание антитела с VEGF, связанным с VEGFR1, экспрессированном, чрезмерно экспрессированном или избыточно экспрессированном в ангиогенных кровеносных сосудах, опухоли или внутриопухолевой сосудистой сети, таким образом доставляя диагностический или терапевтический агент к VEGF-VEGFR1 в ангиогенных кровеносных сосудах, опухоли или внутриопухолевой сосудистой сети.

Доставка выбранных терапевтических агентов в опухоль, или внутриопухолевую сосудистую сеть, или основное вещество опухоли приводит к остановке кровотока или специфично останавливает кровоток в сосудистой сети опухоли; чтобы разрушить или специфично разрушить сосудистую сеть опухоли; и чтобы индуцировать некроз, или специфичный некроз в опухоли. Эти способы и применения, таким образом, можно объединить как способы лечения животного или пациента, имеющего васкуляризованную опухоль, включающие введение животному или пациенту терапевтически эффективного количества, по меньшей мере, первой фармацевтической композиции, включающей, по меньшей мере, первый иммуноконъюгат, который включает блокирующее VEGFR2 антитело человека к VEGF согласно настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент, функционально связанное с терапевтическим агентом.

"Терапевтически эффективные количества" для применения в настоящем изобретении представляют собой количества блокирующего VEGFR2 антитела человека к VEGF согласно настоящему изобретению или его иммуноконъюгатов, эффективных для специфичного уничтожения по меньшей мере части опухоли или внутриопухолевых эндотелиальных клеток сосудов; для специфичной индукции апоптоза по меньшей мере в части опухоли или внутриопухолевых эндотелиальных клеток сосудов; для специфичной индукции коагуляции по меньшей мере в части опухоли или внутриопухолевых кровеносных сосудов; для специфичного закупоривания или разрушения по меньшей мере части переносящих кровь сосудов опухоли; для специфичного индуцирования некроза по меньшей мере в части опухоли и/или для специфичного ослабления симптомов опухоли или ремиссии при введении выбранным животным или пациентам. Такие эффекты достигаются при небольшом связывании или отсутствии связывания или при небольшом уничтожении или отсутствии уничтожения эндотелиальных клеток сосудов в нормальных, здоровых тканях; при небольшой коагуляции, закупорке или разрушении или отсутствии коагуляции, закупорки или разрушения кровеносных сосудов в здоровых, нормальных тканях; и при возникновении незначительного или контролируемого неблагоприятного побочного действия на нормальные, здоровые ткани животного или пациента.

Термины "предпочтительно" и "специфично" в данной заявке, с точки зрения активирования коагуляции, или разрушения сосудистой сети опухоли, и/или с точки зрения связывания с основным веществом опухоли и/или вызывания некроза опухоли, таким образом, означает, что блокирующее VEGFR2 антитело человека к VEGF согласно настоящему изобретению или его иммуноконъюгаты действуют,

чтобы достигнуть связывания с основным веществом опухоли, коагуляции, разрушения и/или некроза опухоли, которые, по существу, ограничиваются основным веществом опухоли, сосудистой сетью и местом локализации опухоли, и, по существу, это вызывание коагуляции, разрушения и/или некроза ткани не распространяется на нормальные, здоровые ткани животного или человека. Структура и функция здоровых клеток и тканей, следовательно, сохраняется, по существу, неповрежденной при осуществлении настоящего изобретения.

Хотя антитела согласно настоящему изобретению эффективно доставляют агенты в ангиогенную и сосудистую сеть опухоли путем связывания с VEGF, связанного с VEGFR1, другие способы и применения действуют на основе доставки терапевтического агента в основное вещество опухоли, в котором оно оказывает терапевтический эффект на близлежащие сосуды. Эти способы и применения включают введение животному или пациенту, страдающему от васкуляризированной опухоли, иммуноконъюгата, который включает терапевтический агент, функционально связанный, по меньшей мере, с первым блокирующим VEGFR2 антителом человека к VEGF согласно настоящему изобретению или его антигенсвязывающим фрагментом, в количестве, эффективном для связывания иммуноконъюгата с VEGF, не связанным с рецептором, внутри стромы опухоли.

Эти способы и применения включают введение животному или пациенту, страдающему от васкуляризированной опухоли, иммуноконъюгата, который включает терапевтический агент, функционально связанный, по меньшей мере, с первым блокирующим VEGFR2 антителом человека к VEGF согласно настоящему изобретению или его антигенсвязывающим фрагментом, в количестве, эффективном для локализации иммуноконъюгата в строме опухоли таким образом, чтобы присоединенный терапевтический агент оказывал противоопухолевый эффект на окружающую сосудистую сеть опухоли и/или опухолевые клетки.

Антитела и композиции, а также способы и применения согласно настоящему изобретению, таким образом, распространяются на композиции, включающие блокирующие VEGFR2 антитела к VEGF, включающие, по меньшей мере, первое блокирующее VEGFR2 антитело человека к VEGF согласно настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент, функционально связанный, по меньшей мере, с первым терапевтическим или диагностическим агентом, в частности первым "отличным или экзогенным" терапевтическим агентом. В этом отношении "блокирующее VEGFR2 антитело человека к VEGF" само по себе может быть названо "первым терапевтическим агентом". Соответственно, любой присоединенный терапевтический агент может быть назван первым "отличным или экзогенным терапевтическим агентом", подразумевая, что он также является терапевтическим агентом, но отличается от блокирующего VEGFR2 антитела человека к VEGF и присоединен к нему. Эквивалентная терминология для таких конъюгатов существует, чтобы описать, что, по меньшей мере, первое блокирующее VEGFR2 антитело человека к VEGF согласно настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент функционально связан, по меньшей мере, со "вторым, отличным" терапевтическим или диагностическим агентом.

Блокирующие VEGFR2 антитела человека к VEGF согласно настоящему изобретению или терапевтические конъюгаты предпочтительно связаны с одним или более радиотерапевтическими агентами, антиангиогенными агентами, индуцирующими апоптоз агентами, антигипертензивными лекарственными препаратами, противоклеточными или цитотоксическими агентами или коагулянтами (факторами свертывания крови).

Настоящее изобретение, таким образом, обеспечивает диапазон конъюгированных антител и их фрагментов, в которых антитело человека функционально связано, по меньшей мере, с первым терапевтическим или диагностическим агентом. Термин "иммуноконъюгат" широко употребляется для описания функциональной ассоциации антитела с другим эффективным агентом и не предполагается относящимся исключительно к какому-либо типу функциональной ассоциации, и, в частности, не ограничен химическим термином "конъюгация". В частности, предполагаются рекомбинантные слитые белки. При условии, что доставляющий или нацеливающий агент способен связываться с мишенью и терапевтический или диагностический агент достаточно функционален после доставки, способ присоединения будет считаться подходящим.

Также предполагается присоединение агентов с помощью молекул углеводов на антитела. Гликозилирование, как O-связанное, так и N-связанное, естественным образом происходит на антителах. Рекомбинантные антитела можно модифицировать, чтобы восстановить или создать дополнительные сайты гликозилирования, если это желательно, что легко достигается вставкой подходящих последовательностей аминокислот (таких как Asn-X-Ser, Asn-X-Thr, Ser, или Thr) в первичную последовательность антитела.

Предпочтительными в настоящее время агентами для применения в блокирующем VEGFR2 антителе человека к VEGF или терапевтических конъюгатах согласно настоящему изобретению и связанными с ними способами и применениями являются такие, которые дополняют или усиливают действия антитела, и/или такие, которые выбраны для конкретного типа опухоли или пациента. "Терапевтические агенты, которые дополняют или усиливают действия антитела", включают радиотерапевтические агенты, антиангиогенные агенты, индуцирующие апоптоз агенты и антигипертензивные лекарственные препараты, лю-

бой один или более из которых являются предпочтительными для применения согласно настоящему изобретению.

Присоединение или объединение предпочтительных агентов с блокирующими VEGFR2 антителами человека к VEGF согласно настоящему изобретению позволяет получить "иммуноконъюгаты", при этом такие иммуноконъюгаты часто проявляют усиленные и даже синергические противоопухолевые свойства. В настоящее время предпочтительными антиангиогенными агентами для применения таким способом являются ангиостатин, эндостатин, любой из ангиопоэтинов, васкулостатин, канстатин и маспин. В настоящее время предпочтительные антитубулиновые лекарственные препараты включают колхицин, таксол, винбластин, винкристин, виндесцин (vindesine) и один или более из комбретастатинов.

Применение противоклеточных и цитотоксических агентов приводит к получению "иммунотоксинов" с блокирующим VEGFR2 антителом человека к VEGF согласно настоящему изобретению, тогда как применение факторов свертывания крови приводит к получению "коагулигандов" с блокирующим VEGFR2 антителом человека к VEGF согласно настоящему изобретению. Также предполагается применение по меньшей мере двух терапевтических агентов, как, например, комбинаций с одним или более радиотерапевтическими агентами, антиангиогенными агентами, индуцирующими апоптоз агентами, антитубулиновыми лекарственными препаратами, противоклеточными и цитотоксическими агентами и факторами свертывания крови.

В некоторых применениях лекарство с блокирующим VEGFR2 антителом человека к VEGF согласно настоящему изобретению будет функционально связано с цитотоксическими, цитостатическими или другим образом направленными против клеток агентами, которые имеют способность уничтожать или подавлять рост или деление эндотелиальных клеток. Подходящие направленные против клеток агенты включают химиотерапевтические агенты, а также цитотоксины и цитостатические агенты. Цитостатические агенты, как правило, представляют собой такие, которые нарушают естественный клеточный цикл целевой клетки, предпочтительно таким образом, что клетка выходит из клеточного цикла.

Типичные химиотерапевтические агенты включают стероиды; цитокины; антиметаболиты, такие как цитозинарабинозид, фторурацил, метотрексат или аминоптерин; антрациклины; митомицин С; алкалоиды барвинка; антибиотики; демексоллин; этопозид; митрамицин; и противоопухолевые алкилирующие агенты, такие как хлорамбуцил или мелфалан. В самом деле, можно применять любые из агентов, описанных в данной заявке в табл. С. Некоторые предпочтительные направленные против клеток агенты представляют собой ингибиторы синтеза ДНК, такие как даунорубин, доксорубин/адриамицин и т.п. В целом, таксол/паклитаксел, доцетаксел, цисплатин, гемцитабин, комбретастин и доксорубин/адриамицин в настоящее время являются предпочтительными противораковыми агентами.

Из цитокинов и хемокинов в настоящее время предпочтительными агентами являются IL-2, IL-12, TNF- $\alpha$ , интерферон- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ), IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$  и LEC (хемокин, экспрессируемый печенью). Также в настоящее время являются предпочтительными ингибиторы АТФазы типа V, такие как салицилхаламид (salicylhalamide), конканамицин или бафиломицин, а также ингибиторы синтеза белка, такие как псимберин (psymberin), педерин, ирциниастатин А (irciniastatin A).

В некоторых терапевтических применениях молекулы токсина будут предпочтительны вследствие гораздо более высокой способности большинства токсинов осуществлять уничтожающее клетки действие по сравнению с другими потенциальными агентами. Следовательно, некоторые предпочтительные направленные против клеток агенты для конструкций, включающих блокирующее VEGFR2 антитело человека к VEGF согласно настоящему изобретению, представляют собой токсины, полученные из растений, грибов или бактерий. Типичные токсины включают эпиподофиллотоксины; бактериальный эндотоксин или молекулу липида А бактериального эндотоксина; белки, инактивирующие рибосомы, такие как сапорин или гелонин;  $\alpha$ -сарцин; аспергиллин; рестриктоцин; рибонуклеазы, такие как плацентарная рибонуклеаза; дифтерийный токсин и экзотоксин pseudomonas. В настоящее время предпочтительными примерами являются ризин, гелонин, абрин, дифтерийный, pseudomonas и коклюшный токсины.

Некоторые предпочтительные токсины представляют собой А-цепочечные токсины, такие как А-цепь рицина. Наиболее предпочтительной молекулой токсина часто является А-цепь рицина, которую обработали, чтобы модифицировать или удалить углеводные остатки, так называемая "дегликозилированная А-цепь" (dgA). Дегликозилированная А-цепь рицина является предпочтительной вследствие ее чрезвычайной эффективности, более длительного времени полужизни и вследствие того, что ее экономически целесообразно производить в клиническом качестве и масштабе. Рекомбинантную и/или укороченную А-цепь рицина также можно применять.

Для нацеливания на опухоль и ее лечения с помощью иммунотоксинов следующие патенты были специально включены в данную заявку посредством ссылки с целью еще большего дополнения настоящей идеи, касающейся противоклеточных и цитотоксических агентов: патенты США №№ 6004554; 5855866; 5965132; 5776427; 5863538; 5660827 и 6051230.

Блокирующее VEGFR2 антитело человека к VEGF согласно настоящему изобретению может быть связано с антитубулиновым лекарственным препаратом. "Антитубулиновый лекарственный препарат(ы)"

в данной заявке означает любой агент, лекарственный препарат, пролекарство или их комбинацию, которые ингибируют митоз клетки, предпочтительно путем непосредственного или опосредованного ингибирования активности тубулина, необходимой для митоза клетки, предпочтительно полимеризации или деполимеризации тубулина.

В настоящее время предпочтительные антитубулиновые лекарственные препараты для применения согласно настоящему изобретению представляют собой колхицин, таксаны, такие как таксол, доцетаксел и паклитаксел; алкалоиды барвинка, такие как винбластин, винкрестин и виндесцин; и комбретастатины. Типичные комбретастатины представляют собой комбретастатин А, В и/или D, включая А-1, А-2, А-3, А-4, А-5, А-6, В-1, В-2, В-3, В-4, D-1 и D-2 и их пролекарственные формы.

Лекарство с блокирующим VEGFR2 антителом человека к VEGF согласно настоящему изобретению может включать компонент, который способен активировать коагуляцию, т.е. коагулянт. В данной заявке нацеливающее антитело может быть непосредственно или опосредованно, например, с помощью другого антитела связано с фактором, который непосредственно или опосредованно стимулирует коагуляцию.

Предпочтительные факторы свертывания крови для такого применения представляют собой тканевый фактор (TF) и производные TF, такие как укороченный TF (tTF), димерный, тримерный, полимерный/мультимерный TF, и мутантный TF, лишенный способности активировать фактор VII. Другие подходящие факторы свертывания крови включают витамин К-зависимые коагулянты, такие как фактор II/IIa, фактор VII/VIIa, фактор IX/IXa и фактор X/Xa; витамин К-зависимые факторы свертывания крови, у которых отсутствует модификация Gla; активатор фактора X из яда гадюки Рассела; активирующие тромбоциты соединения, такие как тромбосан А<sub>2</sub> и тромбосан-А<sub>2</sub>-синтаза; и ингибиторы фибринолиза, такие как α<sub>2</sub>-антиплазмин. В основном укороченный тканевый фактор (tTF) в настоящее время является предпочтительным.

Нацеливание на опухоль и ее лечение с помощью коагулигандов описано в следующих патентах США, каждый из которых специально включен в данную заявку посредством ссылки с целью еще большего дополнения настоящей идеи, касающейся коагулигандов и факторов свертывания крови: 5855866; 5965132; 6093399; 6004555; 5877289 и 6036955.

Получение иммуноконъюгатов и иммунотоксинов, как правило, хорошо известно в данной области техники (см., например, патент США № 4340535). Каждый из следующих патентов США дополнительно включен в данную заявку посредством ссылки с целью еще большего дополнения настоящей идеи, касающейся получения, очистки и применения иммунотоксинов: 6004554; 5855866; 5965132; 5776427; 5863538; 5660827 и 6051230.

При получении иммуноконъюгатов и иммунотоксинов, можно достигнуть преимуществ посредством применения некоторых линкеров. Например, линкеры, которые включают дисульфидную связь, которая стерически "защищена", часто являются предпочтительными вследствие их большей стабильности *in vivo*, таким образом предотвращая высвобождение молекулы токсина раньше связывания в месте действия. Как правило, желательно иметь конъюгат, который остается неизменным при условиях, характерных любой области организма, за исключением предполагаемого места действия, и желательно, чтобы в этом месте конъюгат имел хорошие свойства "высвобождения".

В зависимости от конкретного используемого соединения токсина может оказаться необходимым обеспечение пептидного спейсера, функционально связывающего блокирующее VEGFR2 антитело человека к VEGF согласно настоящему изобретению и соединение токсина, при этом пептидный спейсер способен складываться в связанную дисульфидными связями структуру петли. Протеолитическое расщепление петли позволит затем получить гетеродимерный полипептид, в котором антитело и соединение токсина связаны только одной дисульфидной связью.

Если используются некоторые другие соединения токсинов, может быть предусмотрен нерасщепляемый пептидный спейсер, чтобы функционально соединить блокирующее VEGFR2 антитело человека к VEGF согласно настоящему изобретению и соединение токсина. Токсины, которые можно применять совместно с нерасщепляемыми пептидными спейсерами, представляют собой такие, которые сами по себе могут превратиться после протеолитического расщепления в цитотоксическую форму, связанную дисульфидными связями. Примером такого соединения токсина является соединение экзотоксина Pseudomonas.

Целый ряд химиотерапевтических и других фармакологических агентов также можно успешно конъюгировать с лекарством, включающим блокирующее VEGFR2 антитело человека к VEGF согласно настоящему изобретению. Типичные противоопухолевые агенты, которые были конъюгированы с антителами, включают доксорубицин, дауномицин, метотрексат и винбластин. Более того, было описано присоединение других агентов, таких как неокарциностатин, макромицин, тренимон и α-аманитин (см. патенты США №№ 5660827; 5855866 и 5965132; каждый из которых включен в данную заявку).

Получение коагулигандов также легко осуществить. Функциональное связывание одного или более факторов свертывания крови с блокирующим VEGFR2 антителом человека к VEGF согласно настоящему изобретению может представлять собой непосредственное соединение, такое как описанное выше для

иммунотоксинов. В качестве альтернативы функциональное связывание может представлять собой опосредованное присоединение, такое как функциональное связывание антитела со вторым участком связывания, предпочтительно антитела или антигенсвязывающего участка антитела, которые связываются с фактором свертывания крови. Фактор свертывания крови должен быть присоединен к блокирующему VEGFR2 антителу человека к VEGF согласно настоящему изобретению на сайте, отличном от функционального коагулирующего сайта, особенно если применяется ковалентное соединение для объединения молекул.

Опосредованно связанные коагулиганды часто основаны на биспецифичных антителах. Получение биспецифичных антител также хорошо известно в данной области техники. Один способ получения включает отдельное получение антител, специфичных к целевым компонентам опухоли, с одной стороны, и коагулирующего агента, с другой. Затем получают пепсиновые фрагменты  $F(ab')_2$  из двух выбранных антител, а затем восстанавливают каждый из них, чтобы получить отдельные фрагменты  $Fab'\gamma_{SH}$ . SH-группы на одном из двух соединяемых партнеров затем алкилируют с помощью перекрестно-связывающего реагента (сшивающего агента), такого как о-фенилендималеимид, чтобы получить свободные малеимидные группы на одном партнере. Партнера можно затем конъюгировать с другим партнером посредством тиоэфирного связывания с получением желательного гетероконъюгата  $F(ab'\gamma)_2$  (Glenie и др., 1987). Другие подходы, такие как перекрестное связывание с помощью SPDP или белка A, также можно осуществлять.

При получении иммуноконъюгатов, иммунотоксинов и коагулигандов можно использовать рекомбинантную экспрессию. Последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие выбранное блокирующее VEGFR2 антитело человека к VEGF согласно настоящему изобретению, и терапевтический агент, токсин или коагулянт, соединены в пределах одной рамки считывания в векторе экспрессии. Рекомбинантная экспрессия, таким образом, приводит к трансляции нуклеиновой кислоты с получением желательного иммуноконъюгата. Химические перекрестно-связывающие агенты и мостики авидин:биотин также могут соединять терапевтические агенты с блокирующим VEGFR2 антителом человека к VEGF согласно настоящему изобретению.

Каждый из следующих патентов США включен в данную заявку посредством ссылки с целью еще большего дополнения настоящей идеи, касающейся получения, очистки и применения коагулигандов, включая биспецифичные коагулиганды антитела: 5855866; 5965132; 6093399; 6004555; 5877289 и 6036955.

Иммуноконъюгаты с радиотерапевтическими агентами, антиангиогенными агентами, индуцирующими апоптоз агентами, антигиперлипидными лекарственными препаратами, токсинами и коагулянтами, полученные либо путем химической конъюгации, либо рекомбинантной экспрессии, могут включать биологически расщепляемую связь и/или избирательно расщепляемый спейсер или линкер. Такие композиции предпочтительно являются умеренно стабильными при нахождении в кровотоке и предпочтительно или специфично высвобождаются после доставки в место развития заболевания или опухоли.

Некоторые предпочтительные примеры представляют собой спейсеры, чувствительные к кислоте, при этом особенно предполагаются связанные с колхицином или доксорубицином блокирующие VEGFR2 антитела человека к VEGF согласно настоящему изобретению. Другие предпочтительные примеры включают пептидные линкеры, которые включают сайт расщепления пептидазами и/или протеиназами, которые специфично или предпочтительно присутствуют или активны в месте развития заболевания, таком как опухолевое окружение. Доставка иммуноконъюгатов в место развития заболевания или опухоли приводит к расщеплению и относительно специфичному высвобождению фактора свертывания крови.

Пептидные линкеры, которые включают сайт расщепления урокиназой, проурокиназой, плазмином, плазминогеном, TGF $\beta$ , стафилокиназой, тромбином, фактором IXa, фактором Xa или металлопротеиназой (MMP), такой как интерстициальная коллагеназа, желатиназой или стромелизином, являются особенно предпочтительными, как описано и использовано в патентах США №№ 5877289 и 6342221, каждый из которых включен в данную заявку посредством ссылки для этих целей.

Блокирующее VEGFR2 антитело человека к VEGF согласно настоящему изобретению также можно изменить, чтобы ввести функциональные группы, позволяющие присоединение терапевтического агента(ов) посредством биологически расщепляемой связи. Нацеливающее антитело, таким образом, можно изменить, чтобы ввести боковые цепи, оканчивающиеся гидразидной, гидразиновой, первичной аминокислоты или вторичной аминокислотными группами. Терапевтические агенты можно конъюгировать с помощью основания Шиффа, гидразиновой или ацилгидразиновой связи или гидразидного линкера (патенты США №№ 5474765 и 5762918).

Либо первично антиангиогенные, либо основанные на нацеливании на сосуды композиции и способы согласно настоящему изобретению можно применять в комбинации с другими лекарственными и диагностическими агентами. В аспекте биологических агентов, предпочтительно диагностических или терапевтических агентов, для применения "в комбинации" с блокирующим VEGFR2 антителом человека к VEGF в соответствии с настоящим изобретением термин "в комбинации" емко используется для описа-



ния целого ряда вариантов реализации. Терминология "в комбинации", если конкретно не указано иное или как очевидно из научной терминологии, таким образом, распространяется на различные форматы объединенных композиций, фармацевтических препаратов, коктейлей, наборов, способов и первого и второго медицинских применений.

"Комбинированные" варианты реализации настоящего изобретения, таким образом, включают, например, случаи, когда блокирующее VEGFR2 антитело человека к VEGF согласно настоящему изобретению представляет собой изолированное антитело и применяется в комбинации с агентом или терапевтическим агентом, который не присоединен к нему функционально. В этих случаях указанный агент или терапевтический агент можно применять в ненацеливающей или нацеливающей форме. В "ненацеливающей форме" указанный агент, особенно терапевтические агенты, как правило, применяют согласно их стандартному применению в данной области техники. В "нацеливающей форме" указанный агент, как правило, функционально связан с отличным антителом или нацеливающим участком, который доставляет указанный агент или терапевтический агент в место развития ангиогенного заболевания или опухоли. Применение таких нацеливающих форм биологических агентов как диагностических, так и лекарственных, также вполне общепринято в данной области техники.

В других "комбинированных" вариантах реализации настоящего изобретения блокирующее VEGFR2 антитело человека к VEGF согласно настоящему изобретению представляет собой иммуноконъюгат, в котором указанное антитело само функционально связано или объединено с агентом или терапевтическим агентом. Функциональное присоединение включает все формы непосредственного и опосредованного присоединения, описанные в данной заявке и известные в данной области техники.

"Комбинированные" применения, особенно в аспекте блокирующего VEGFR2 антитела человека к VEGF согласно настоящему изобретению в комбинации с терапевтическими агентами, также включают объединенные композиции, фармацевтические препараты, коктейли, наборы, способы и первое и второе медицинские применения, в которых терапевтический агент находится в форме пролекарства. В таких вариантах реализации активирующий компонент, способный превратить пролекарство в функциональную форму лекарственного препарата, опять же, может быть функционально связан с блокирующими VEGFR2 антителами человека к VEGF согласно настоящему изобретению.

В некоторых предпочтительных вариантах реализации терапевтические композиции, комбинации, фармацевтические препараты, коктейли, наборы, способы и первое и второе медицинские применения будут представлять собой "комбинированные пролекарства". Для специалистов в данной области техники очевидно, что термин "комбинированное пролекарство", если не указано иначе, означает, что антитело согласно настоящему изобретению функционально связано с компонентом, способным превратить указанное пролекарство в активный лекарственный препарат, но антитело само не присоединено к пролекарству. Тем не менее, не требуется, чтобы варианты реализации настоящего изобретения, включающие пролекарство, включали комбинированные пролекарства.

Соответственно, пролекарства можно применять любым способом, используемым в данной области техники, включая вхождение в ADEPT и другие формы.

Таким образом, если описаны объединенные композиции, фармацевтические препараты, коктейли, наборы, способы и первое и второе медицинские применения, предпочтительно в аспекте диагностических агентов, и более предпочтительно терапевтических агентов, указанные комбинации включают блокирующие VEGFR2 антитела человека к VEGF, которые представляют собой изолированные антитела и иммуноконъюгаты, при этом осуществление *in vivo* вариантов реализации настоящего изобретения включает предварительное, одновременное или последовательное введение изолированных антител или иммуноконъюгата и биологического, диагностического или терапевтического агента; при условии, что в некоторой конъюгированной или неконъюгированной форме достигается общее введение некоторой формы антитела и некоторой формы биологического, диагностического или терапевтического агента.

Особенно предпочтительные объединенные композиции, способы и применения согласно настоящему изобретению представляют собой такие, которые включают блокирующие VEGFR2 антитела человека к VEGF согласно настоящему изобретению и эндостатин (патент США № 5854205). Они включают случаи, когда блокирующее VEGFR2 антитело человека к VEGF согласно настоящему изобретению представляет собой изолированное антитело или иммуноконъюгат; и когда представляет собой иммуноконъюгат, в котором блокирующее VEGFR2 антитело человека к VEGF согласно настоящему изобретению связано с эндостатином, возможно с ангиостатином; при этом комбинированный терапевтический способ или применение включает предварительное, одновременное или последовательное введение эндостатина, возможно с ангиостатином; при условии, что в некоторой конъюгированной или неконъюгированной форме достигается общее введение антитела, эндостатина и возможно ангиостатина. Блокирующие VEGFR2 антитела человека к VEGF согласно настоящему изобретению, функционально связанные с коллагеназой, также предусмотрены, так как коллагеназа, специфично доставленная в опухоль, будет образовывать эндостатин *in situ*, позволяя достигнуть аналогичной пользы.

Предшествующие и другие объяснения эффектов согласно настоящему изобретению на опухоли приведены для упрощения, чтобы объяснить комбинированный характер функционирования, тип присоединенного агента(ов) и т.п. Этот описательный подход не должен интерпретироваться как занижение

или чрезмерное упрощение полезных свойств блокирующих VEGFR2 антител человека к VEGF согласно настоящему изобретению. Следовательно, должно быть очевидно, что такие антитела сами по себе проявляют антиангиогенные свойства и свойства нейтрализации VEGF (такие как нейтрализующие функцию выживаемости VEGF), что иммуноконъюгаты, включающие такие антитела, будут сохранять эти свойства и объединять их со свойствами присоединенного агента; и дополнительно, что объединенный эффект антитела и любого присоединенного агента, как правило, будет усиленным и/или увеличенным.

Настоящее изобретение, следовательно, обеспечивает композиции, фармацевтические композиции, терапевтические наборы и лечебные коктейли, включающие, возможно, по меньшей мере, в первой композиции или контейнере биологически эффективное количество, по меньшей мере, первого блокирующего VEGFR2 антитела человека к VEGF согласно настоящему изобретению, или антигенсвязывающий фрагмент, или иммуноконъюгат такого антитела к VEGF; и биологически эффективное количество, по меньшей мере, второго биологического агента, компонента или системы.

Указанный "по меньшей мере, второй биологический агент, компонент или система" обычно представляет собой терапевтический или диагностический агент, компонент или систему, но он таковым не является. Например, указанный, по меньшей мере, второй биологический агент, компонент или система могут включать компоненты для модификации антитела и/или для присоединения других агентов к антителу. Некоторые предпочтительные вторые биологические агенты, компоненты или системы представляют собой пролекарства или компоненты для получения и применения пролекарств, включая компоненты для получения самого пролекарства и компоненты для приспособления антител согласно настоящему изобретению к функционированию в таком пролекарстве или вариантах реализации с ADEPT.

Если терапевтические или диагностические агенты включены в качестве, по меньшей мере, второго биологического агента, компонента или системы, такое лекарство и/или диагностический агент, как правило, будет применяться для лечения ангиогенных заболеваний. Эти агенты представляют собой такие, которые подходят для применения при лечении или диагностировании заболевания или расстройства, как описано в любом из патентов США №№ 5712291, 5753230, 5972922, 5639757, WO 98/45331 и WO 98/16551, каждый из которых специально включен в данную заявку посредством ссылки.

Если заболевание, от которого нужно лечить, представляет собой рак, "по меньшей мере, второй противораковый агент" будет включен в терапевтический набор или коктейль. Термин "по меньшей мере, второй противораковый агент" выбран, потому что в отношении блокирующего VEGFR2 антитела человека к VEGF согласно настоящему изобретению будет применяться термин "первый противораковый агент". Антитела согласно настоящему изобретению, таким образом, можно объединить с химиотерапевтическими агентами, радиотерапевтическими агентами, цитокинами, антиангиогенными агентами, индуцирующими апоптоз агентами или противораковыми иммунотоксинами или коагулигандами.

"Химиотерапевтические агенты" в данной заявке относятся к классическим химиотерапевтическим агентам или лекарственным препаратам, используемым при лечении злокачественных новообразований. Этот термин применяется для упрощения, несмотря на тот факт, что другие соединения могут быть формально описаны как химиотерапевтические агенты, так как они проявляют противораковое действие. Тем не менее, "химиотерапевтический" появился в данной области техники с особым значением и используется в соответствии с этим стандартным значением. Целый ряд типичных химиотерапевтических агентов описан в данной заявке. Для рядовых специалистов в данной области техники очевидны применения и подходящие дозы химиотерапевтических агентов, хотя указанные дозы можно снизить при использовании в соответствии с настоящим изобретением.

Новый класс лекарственных препаратов, которые также можно назвать "химиотерапевтическими агентами", представляет собой агенты, которые индуцируют апоптоз. Любой один или более из таких лекарственных препаратов, включая гены, векторы, бессмысловые конструкции и рибозимы, в случае необходимости, также можно применять в соответствии с настоящим изобретением. В настоящее время предпочтительные вторые агенты представляют собой антиангиогенные агенты, такие как ангиостатин, эндостатин, васкулостатин, канстатин и маспин.

Другие типичные противораковые агенты включают, например, неомицин, подофиллотоксин(ы), TNF- $\alpha$ , антагонисты  $\alpha_v\beta_3$ , кальциевые ионофоры, агенты, индуцирующие выброс кальция, и любые производные или пролекарства с ними. В настоящее время предпочтительные антигубулиновые лекарственные препараты включают колхицин, таксол, винбластин, винкристин, виндесцин, комбретастанин или их производные или пролекарства.

Противораковые иммунотоксины или коагулиганды являются дополнительными подходящими противораковыми агентами. "Противораковые иммунотоксины или коагулиганды" или конструкции с нацеливающим агентом/терапевтическим агентом основаны на нацеливающих агентах, включая антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с целевым или доступным компонентом опухолевой клетки, сосудистой сети опухоли или стромой опухоли, и которые функционально связаны с терапевтическим агентом, включая цитотоксические агенты (иммунотоксины) и факторы свертывания крови (коагулиганды). "Целевой или доступный компонент" опухолевой клетки, сосудистой сети опухоли или стромы опухоли предпочтительно представляет собой экспрессированный на поверхности, доступный на поверхности или локализованный на поверхности компонент, хотя компоненты, высвобо-

жденные из некротических или другим образом поврежденных опухолевых клеток или эндотелиальных клеток сосудов, также могут представлять собой целевые компоненты, включая цитозольные и/или ядерные антигены опухолевой клетки.

Можно применять нацеливающие агенты как включающие антитело, так и не включающие антитело, и включающие факторы роста, такие как VEGF и FGF; пептиды, включающие трипептид R-G-D, который специфично связывается с сосудистой сетью опухоли; и другие нацеливающие компоненты, такие как аннексины и сродные лиганды.

Направленные против опухолевой клетки иммунотоксины или коагулиганды могут включать антитела, примером которых является группа, состоящая из антител, названных B3 (ATCC HB 10573), 260F9 (ATCC HB 8488), D612 (ATCC HB 9796) и KS1/4, указанного KS1/4 антитела, полученного из клетки, включающей вектор pGKC2310 (NRRL B-18356) или вектор pG2A52 (NRRL B-18357).

Также предполагаются направленные против опухолевой клетки нацеливающие агенты, которые включают антитело или его антигенсвязывающую область, которая связывается с внутриклеточным компонентом, который высвобождается из некротической опухолевой клетки. Предпочтительно такие антитела представляют собой моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с нерастворимым внутриклеточным антигеном(ами), присутствующим в клетках, которых можно сделать проницаемыми, или в "тени", по существу, всех неопластических и нормальных клеток, но не присутствующими или не доступными на поверхности нормальных живых клеток млекопитающего.

Патенты США №№ 5019368, 4861581 и 5882626, каждый из которых опубликовали Alan Epstein и его коллеги, каждый специально включен в данную заявку посредством ссылки с целью дополнительного описания и обучения способам получения и применения антител, специфичных к внутриклеточным антигенам, которые становятся доступными из злокачественных клеток *in vivo*. Описанные антитела достаточно специфичны к внутренним компонентам злокачественных клеток млекопитающего, но не к внешним клеточным компонентам. Типичные мишени включают гистоны, но также включены все внутриклеточные компоненты, специфично высвобожденные из некротических опухолевых клеток.

После введения животному или пациенту, страдающему от васкуляризированной опухоли, такие антитела локализуются около злокачественных клеток в силу того, что васкуляризированные опухоли обычно включают некротические опухолевые клетки, вследствие процесса(ов) ремоделирования опухоли, которые происходят *in vivo* и приводят к тому, что по меньшей мере часть злокачественных клеток становятся некротическими. Вдобавок, применение таких антител в комбинации с другими методами лечения, которые усиливают некроз опухоли, способствует повышению эффективности нацеливания и последующей терапии.

Эти типы антител, таким образом, можно применять для непосредственного или опосредованного ассоциирования с ангиопоэтином и введения ангиопоэтина в некротические злокачественные клетки внутри васкуляризированных опухолей, что в общих чертах описано в данной заявке.

В патентах США №№ 5019368, 4861581 и 5882626, каждый из которых включен в данную заявку посредством ссылки, также описано, что эти антитела можно применять в комбинированных диагностических способах (см. ниже) и в способах измерения эффективности противоопухолевых методов лечения. Такие способы, как правило, включают получение и введение меченых вариантов антител и измерения связывания меченого антитела с внутренним целевым клеточным компонентом, предпочтительно связанным с некротической тканью. Способы, тем самым, позволяют визуализировать некротическую ткань, при этом локализованная концентрация антитела свидетельствует о присутствии опухоли и указывает на "тени" клеток, которые были уничтожены в результате противоопухолевой терапии.

Направленные против стромы опухоли иммунотоксины или коагулиганды, как правило, включают антитела, которые связываются с компонентом соединительной ткани, компонентом базальной мембраны или компонентом активированных тромбоцитов; примером чего является связывание с фибрином, RIBS или LIBS.

Направленные против сосудистой сети опухоли иммунотоксины или коагулиганды могут включать лиганды, антитела или их фрагменты, которые связываются с экспрессированным на поверхности, доступным на поверхности или локализованным на поверхности компонентом переносящих кровь сосудов, предпочтительно внутриопухолевых кровеносных сосудов, васкуляризированной опухоли. Такие антитела включают антитела, которые связываются с экспрессированными на поверхности компонентами внутриопухолевых кровеносных сосудов васкуляризированной опухоли, включая рецепторы клеточной поверхности внутриопухолевой сосудистой сети, такие как эндоглин (антитела TEC-4 и TEC-11), рецептор TGF $\beta$ , E-селектин, P-селектин, VCAM-1, ICAM-1, PSMA, рецептор VEGF/VPF, рецептор FGF, TIE,  $\alpha_v\beta_3$  интегрин, плейотропин, эндосиалин и белки главного комплекса гистосовместимости (МНС) II класса. Указанные антитела также могут связываться с индуцируемыми цитокинами или индуцируемыми коагулянтами компонентами внутриопухолевых кровеносных сосудов. Некоторые предпочтительные агенты связываются с аминокислотными липидами, такими как фосфатидилсерин или фосфатидилэтаноламин.

Другие направленные против сосудистой сети опухоли иммунотоксины или коагулиганды могут

включать антитела или их фрагменты, которые связываются с лигандом или фактором роста, который связывается с рецептором клеточной поверхности внутриопухолевой сосудистой сети. Такие антитела включают антитела, которые связываются с VEGF/VPF (антитела GV39 и GV97), FGF, TGF $\beta$ , лигандом, который связывается с TIE, связанной с опухолью изоформой фибронектина, рассеивающим фактором/фактором роста гепатоцитов (HGF), тромбоцитарным фактором 4 (PF4), PDGF и TIMP. Указанные антитела или их фрагменты также могут связываться с комплексом лиганд:рецептор или комплексом фактор роста:рецептор, но не с лигандом или фактором роста или рецептором, если указанный лиганд, или фактор роста или рецептор не находятся в комплексе лиганд:рецептор или фактор роста:рецептор.

Направленные против опухолевой клетки, направленные против стромы опухоли или направленные против сосудистой сети опухоли конструкции антитело-терапевтический агент могут включать антиангиогенные агенты, агенты, индуцирующие апоптоз, антибубулиновые лекарственные препараты, цитотоксические агенты, такие как токсины, полученные из растений, грибка или бактерий. А-цепь рицина и дегликозилированная А-цепь рицина часто будут предпочтительными. Направленные против опухолевой клетки, направленные против стромы опухоли или направленные против сосудистой сети опухоли конструкции антитело-терапевтический агент могут включать коагулянты (непосредственно и опосредованно действующие факторы свертывания крови) или участки, связывающие второе антитело, которые связываются с факторами свертывания крови. Функциональное связывание с тканевым фактором или производными тканевого фактора, такими как укороченный тканевый фактор, часто будет предпочтительным.

В аспекте композиций, наборов и/или лекарственных средств согласно настоящему изобретению объединенные эффективные количества терапевтических агентов можно включить в один контейнер или средства для хранения или включить в отдельные контейнеры или средства для хранения. Коктейли, как правило, смешивают для комбинированного использования. Агенты, входящие в состав лекарственной формы для внутривенного введения, часто будут предпочтительными. Также можно включать компоненты для визуализации. Наборы также могут включать инструкции для применения указанного, по меньшей мере, первого антитела и одного или более других включенных биологических агентов.

Вообще говоря, по меньшей мере, второй противораковый агент можно вводить животному или пациенту, по существу, одновременно с блокирующим VEGFR2 антителом человека к VEGF согласно настоящему изобретению; например, в составе одной фармацевтической композиции или в составе двух фармацевтических композиций, которые вводятся практически одновременно.

В качестве альтернативы, по меньшей мере, второй противораковый агент можно вводить животному или пациенту в момент времени, следующий за введением блокирующего VEGFR2 антитела человека к VEGF согласно настоящему изобретению. "В следующий момент времени" в данной заявке означает "смещенный", так что указанный, по меньшей мере, второй противораковый агент вводят животному или пациенту в момент времени, отличный от введения блокирующего VEGFR2 антитела человека к VEGF согласно настоящему изобретению. Как правило, два агента вводят в моменты времени, эффективно разнесенные таким образом, чтобы позволить двум указанным агентам оказать соответствующие терапевтические действия, т.е. их вводят с "биологически эффективными интервалами времени". Указанный, по меньшей мере, второй противораковый агент можно вводить животному или пациенту за биологически эффективный интервал времени перед введением блокирующего VEGFR2 антитела человека к VEGF согласно настоящему изобретению или через биологически эффективный интервал времени после этого терапевтического агента.

Соответственно, настоящее изобретение обеспечивает способы для лечения животного или пациента, страдающего от васкуляризированной опухоли, включающие:

(a) осуществление первого лечения животного или пациента, которое существенно уменьшает опухолевую массу; и

(b) последующее введение, по меньшей мере, первого антиангиогенного агента животному или пациенту в количестве, эффективном для ингибирования метастазирования любыми выжившими опухолевыми клетками; при этом первый антиангиогенный агент представляет собой, по меньшей мере, первое блокирующее VEGFR2 антитело человека к VEGF согласно настоящему изобретению, или его антигенсвязывающий фрагмент; возможно при этом антитело или фрагмент функционально связан со вторым антиангиогенным агентом.

Предпочтительное первое лечение включает хирургическое удаление и химиотерапевтическое вмешательство. Также можно применять комбинированные антиангиогенные препараты.

Другие способы лечения животных или пациентов, страдающих от васкуляризированных опухолей, включают:

(a) введение первой конструкции антитело-терапевтический агент животному или пациенту в количестве, эффективном для индуцирования существенного некроза опухоли; при этом первая конструкция антитело-терапевтический агент включает терапевтический агент, функционально связанный с первым антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, который связывается с экспрессированным на поверхности, доступным на поверхности или локализованным на поверхности компонентом опухолевой клетки, сосудистой сети опухоли или стромы опухоли; и

(b) последующее введение второго антитела животному или пациенту в количестве, эффективном для ингибирования метастазирования от любой из выживших опухолевых клеток; при этом второе антитело представляет собой, по меньшей мере, первое блокирующее VEGFR2 антитело человека к VEGF согласно настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент; и дополнительно возможно при этом указанное антитело или фрагмент функционально связан со вторым антиангиогенным агентом.

В особенно предпочтительных вариантах реализации блокирующие VEGFR2 антитела человека к VEGF согласно настоящему изобретению предусмотрены для применения в комбинации с пролекарствами и ADEPT. В таких композициях, комбинациях, фармацевтических препаратах, наборах, способах и применениях блокирующее VEGFR2 антитело человека к VEGF согласно настоящему изобретению или его фрагмент модифицированы, чтобы обеспечить превращающую или ферментативную способность, или функционально связаны, предпочтительно ковалентно связаны или конъюгированы, по меньшей мере, с первым превращающим агентом или ферментом, способным превратить по меньшей мере одно пролекарство в активную форму лекарственного препарата.

Обладающее ферментативной способностью или конъюгированное с ферментом антитело или фрагмент комбинируют с исходно отдельной лекарственной формой "пролекарства". Пролекарство будет представлять собой неактивную или слабо активную форму лекарственного препарата, которая превращается в активную форму лекарственного препарата при контакте с ферментативной составляющей, трансформирующей функцию, или ферментом, связанным с блокирующим VEGFR2 антителом человека к VEGF согласно настоящему изобретению.

Соответственно, предусмотрены наборы, которые включают, предпочтительно в составе отдельных композиций и/или контейнеров:

(a) биологически эффективное количество, по меньшей мере, первого блокирующего VEGFR2 антитела человека к VEGF согласно настоящему изобретению или его фрагмент, которые проявляют ферментативную функцию, предпочтительно когда антитело или фрагмент функционально связаны, ковалентно связаны или конъюгированы, по меньшей мере, с первым ферментом; и

(b) биологически эффективное количество, по меньшей мере, первого, по существу, неактивного пролекарства, которое превращается, по существу, в активный лекарственный препарат в результате ферментативной функции, или с помощью фермента, ассоциированного, связанного или конъюгированного с блокирующим VEGFR2 антителом человека к VEGF или его фрагментом.

Настоящее изобретение дополнительно обеспечивает полезные способы и применения, которые включают:

(a) введение животному или пациенту, страдающему от васкуляризированной опухоли, биологически эффективного количества, по меньшей мере, первой фармацевтической композиции, включающей, по меньшей мере, первое блокирующее VEGFR2 антитело человека к VEGF согласно настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом указанное антитело или фрагмент проявляет ферментативную функцию, предпочтительно при этом указанное антитело или фрагмент функционально связаны, ковалентно связаны или конъюгированы, по меньшей мере, с первым ферментом; при этом указанное антитело или фрагмент после введения локализуется в сосудистой сети, внутриопухолевой сосудистой сети или строме васкуляризированной опухоли; и

(b) последующее введение животному или пациенту после эффективного периода времени биологически эффективного количества, по меньшей мере, второй фармацевтической композиции, включающей биологически эффективное количество по меньшей мере одного, по существу, неактивного пролекарства; при этом указанное пролекарство превращается, по существу, в активный лекарственный препарат в результате ферментативной функции, или под действием фермента, ассоциированного, связанного или конъюгированного с блокирующим VEGFR2 антителом человека к VEGF или его фрагментом согласно настоящему изобретению, локализованными в сосудистой сети, внутриопухолевой сосудистой сети или строме указанной васкуляризированной опухоли.

В некоторых других вариантах реализации антитела и иммуноконъюгаты согласно настоящему изобретению можно комбинировать с одним или более диагностическими агентами, как правило, с диагностическими агентами для применения при лечении ангиогенных заболеваний. Диапазон диагностических композиций, наборов и способов, таким образом, включен в настоящее изобретение.

Дополнительные аспекты представляют собой способы диагностики или визуализации у субъекта, включающие введение подходящего количества антитела человека или другого белка согласно настоящему изобретению, определенного в данной заявке, субъекту и обнаружение присутствия и/или количества и/или местонахождения антитела или другого белка согласно настоящему изобретению у субъекта.

Подходящие заболевания для визуализации или диагностирования, в соответствии с описанными выше применениями и способами, включают любые заболевания, связанные с ангиогенезом, описанные в других местах в данной заявке.

В одном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает способ диагностирования заболевания, связанного с ангиогенезом, у млекопитающего, включающий стадию:

(a) приведения во взаимодействие пробного образца, взятого у указанного млекопитающего, с любым одним или более антителами согласно настоящему изобретению.

В дополнительном варианте реализации настоящее изобретение обеспечивает способ диагностирования заболевания, связанного с ангиогенезом, у млекопитающего, включающий следующие стадии:

(а) приведение во взаимодействие пробного образца, взятого у указанного млекопитающего с одним или более антителами согласно настоящему изобретению;

(b) измерение присутствия и/или количества и/или местонахождения комплекса антитело-антиген в пробном образце; и, возможно

(с) сравнение присутствия и/или количества комплекса антитело-антиген в пробном образце с контрольным.

В описанных выше способах указанную стадию приведения во взаимодействие осуществляют при условиях, которые обеспечивают образование комплекса антитело-антиген. Подходящие условия может легко определить специалист в данной области техники.

В описанных выше способах можно использовать любой подходящий пробный образец, например, биопсийные клетки, ткани или органы, которые считают пораженными заболеванием, или гистологические срезы.

В некоторых из описанных выше способов присутствие любого количества комплекса антитело-антиген в пробном образце будет указывать на присутствие заболевания. Предпочтительно для постановки положительного диагноза, количество комплекса антитело-антиген в пробном образце должно быть больше, предпочтительно значительно больше, чем количество, обнаруживаемое в подходящем контрольном образце. Более предпочтительно значительно большие уровни должны быть статистически значимыми, предпочтительно со значением вероятности  $<0.05$ . Подходящие способы определения статистической значимости хорошо известны и представлены в данной области техники и любой из них можно применять.

Подходящие контрольные образцы сможет легко выбрать специалист в данной области техники, например в случае диагностики конкретного заболевания, подходящим контролем будет образец из субъекта, который не страдает этим заболеванием. Подходящие контрольные "значения" также можно легко определить без прогонки контрольного "образца" в каждом тесте, например исходя из диапазона значений для нормальных субъектов, известного в данной области техники.

Для применения с целью диагностики или визуализации антитела согласно настоящему изобретению можно пометить с помощью детектируемого маркера, такого как рентгеноконтрастное вещество или радиоактивный изотоп, такой как  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ; радиоактивный излучатель (например,  $\alpha$ ,  $\beta$  или  $\gamma$  излучатели); флуоресцентное (флуорофор) или хемилюминесцентное (хромофор) соединение, такое как флуоресцеинизотиоцианат, родамин или люциферин; фермент, такой как щелочная фосфатаза, бета-галактозидаза или пероксидаза хрена; визуализирующий агент; или ион металла; или химическая молекула, такая как биотин, которую можно детектировать по связыванию со специфичной родственной детектируемой молекулой, например, авидином/стрептавидином. Способы присоединения метки к связывающему белку, такому как антитело или фрагмент антитела, известны в данной области техники. Такие детектируемые маркеры позволяют исследовать присутствие, количество или местонахождение комплексов связывающий белок-антиген в пробном образце.

Предпочтительные детектируемые маркеры для применения *in vivo* включают детектируемое в рентгеновском излучении соединение, такое как висмут(III), золото(III), лантан(III) или свинец(II); радиоактивный ион, такой как медь<sup>67</sup>, галлий<sup>67</sup>, галлий<sup>68</sup>, индий<sup>111</sup>, индий<sup>113</sup>, йод<sup>123</sup>, йод<sup>125</sup>, йод<sup>131</sup>, ртуть<sup>197</sup>, ртуть<sup>203</sup>, рений<sup>186</sup>, рений<sup>188</sup>, рубидий<sup>97</sup>, рубидий<sup>103</sup>, технеций или иттрий<sup>90</sup>; изотоп для ядерного магнитного резонанса, такой как кобальт(II), медь(II), хром(III), диспрозий(III), эрбий(III), гадолиний(III), гольмий(III), железо(II), железо(III), марганец(II), неодимий(III), никель(II), самарий(III), тербий(III), ванадий(II) или иттербий(III); или родамин или флуоресцеин.

Настоящее изобретение также включает диагностические или визуализирующие агенты, включающие антитела согласно настоящему изобретению, присоединенные к метке, которая вырабатывает детектируемый сигнал, непосредственно или опосредованно. Подходящие метки описаны в других местах в данной заявке.

Настоящее изобретение дополнительно включает наборы, включающие одно или более антител человека, или композиции согласно настоящему изобретению, или одну или более молекул нуклеиновых кислот, кодирующих антитела согласно настоящему изобретению, или один или более рекомбинантных векторов экспрессии, включающих последовательности нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению, или одну или более клеток-хозяев или вирусов, включающих рекомбинантные векторы экспрессии или последовательности нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению. Предпочтительно указанные наборы предназначены для применения в способах и применениях, описанных в данной заявке, например терапевтических, диагностических или визуализирующих способах, описанных в данной заявке, или для применения в *in vitro* тестах или способах, описанных в данной заявке. Антитело в таких наборах предпочтительно может представлять собой конъюгированное антитело, описанное в других местах в данной заявке, например оно может быть конъюгировано с детектируемой молекулой или может представлять собой иммуноконъюгат. Предпочтительно указанные наборы включают инст-

рукции для применения компонентов набора, например, для диагностики. Предпочтительно указанные наборы предназначены для диагностирования заболевания, связанного с ангиогенезом, и возможно включают инструкции по применению компонентов набора для диагностирования такого заболевания.

Антитела согласно настоящему изобретению, определенные в данной заявке, также можно применять в качестве молекулярных средств для *in vitro* или *in vivo* применений и тестов. Так как антитела включают сайт связывания антигена, они могут функционировать как партнеры в специфично связывающихся парах, и эти молекулы можно применять в любом анализе, в котором нужно обнаружить партнера конкретной связывающейся пары.

Таким образом, еще дополнительные аспекты настоящего изобретения обеспечивают реагент, который включает антитело согласно настоящему изобретению, определенное в данной заявке, и применение таких антител в качестве молекулярных средств, например, в *in vitro* или *in vivo* тестах.

В аспекте диагностики и лечения рака диагностические и визуализирующие композиции, наборы и способы согласно настоящему изобретению включают диагностику *in vivo* и *in vitro*. Например, васкуляризованную опухоль можно визуализировать, применяя диагностически эффективное количество компонента, позволяющего диагностировать опухоль, который включает, по меньшей мере, первый участок связывания, который связывается с доступным компонентом опухолевой клетки, сосудистой сети опухоли или стромы опухоли, функционально связанный с *in vivo* диагностическим визуализирующим агентом.

Визуализацию опухоли предпочтительно осуществляют, чтобы получить изображение стромы и/или сосудистой сети васкуляризированной опухоли, применяя диагностический компонент, который включает, по меньшей мере, первый участок связывания, который связывается с доступным компонентом сосудистой сети опухоли или стромы опухоли.

Можно применять любой подходящий участок связывания или антитело, такое как описанное выше в аспекте терапевтических конструкций. Некоторые преимущества можно обеспечить, применяя меченую детектируемой меткой конструкцию блокирующего VEGFR2 антитела человека к VEGF согласно настоящему изобретению, при этом сформированное изображение предскажет сайты связывания используемого терапевтического препарата.

Меченый детектируемой меткой препарат для *in vivo* диагностирования опухоли, предпочтительно блокирующее VEGFR2 антитело человека к VEGF согласно настоящему изобретению, может включать детектируемое в рентгеновском излучении соединение, такое как висмут(III), золото(III), лантан(III) или свинец(II); радиоактивный ион, такой как медь<sup>67</sup>, галлий<sup>67</sup>, галлий<sup>68</sup>, индий<sup>111</sup>, индий<sup>113</sup>, йод<sup>123</sup>, йод<sup>125</sup>, йод<sup>131</sup>, ртуть<sup>197</sup>, ртуть<sup>203</sup>, рений<sup>186</sup>, рений<sup>188</sup>, рубидий<sup>97</sup>, рубидий<sup>103</sup>, технеций<sup>99m</sup> или иттрий<sup>90</sup>; изотоп для ядерного магнитного резонанса, такой как кобальт(II), медь(II), хром(III), диспрозий(III), эрбий(III), гадолиний(III), гольмий(III), железо(II), железо(III), марганец(II), неодимий(III), никель(II), самарий(III), тербий(III), ванадий(II) или иттербий(III); или родамин или флуоресцеин.

Предварительную визуализацию перед лечением опухоли можно осуществить путем

(а) введения животному или пациенту диагностически эффективного количества фармацевтической композиции, включающей диагностический агент, функционально связанный, по меньшей мере, с первым участком связывания, который связывается с доступным компонентом опухолевой клетки, сосудистой сети опухоли (предпочтительно) или стромы опухоли (предпочтительно), включая диагностические агенты, функционально связанные с конструкцией блокирующего VEGFR2 антитела человека к VEGF согласно настоящему изобретению; и

(b) последующего обнаружения меченого детектируемой меткой первого участка связывания (или блокирующего VEGFR2 антитела человека к VEGF согласно настоящему изобретению), связанного с опухолевыми клетками, кровеносными сосудами опухоли (предпочтительно) или стромой опухоли (предпочтительно); тем самым получая изображение опухоли, сосудистой сети опухоли и/или стромы опухоли.

Лечение рака также можно осуществлять путем

(а) получения изображения васкуляризированной опухоли путем введения животному или пациенту, имеющему васкуляризованную опухоль, диагностически минимального количества, по меньшей мере, первого меченого детектируемой меткой связывающего опухоль агента, предпочтительно конструкции блокирующего VEGFR2 антитела человека к VEGF согласно настоящему изобретению, включающего диагностический агент, функционально связанный со связывающим опухоль агентом или блокирующим VEGFR2 антителом к VEGF согласно настоящему изобретению, тем самым формируя детектируемое изображение опухоли, сосудистой сети опухоли (предпочтительно) или стромы опухоли (предпочтительно); и

(b) последующего введения тому же животному или пациенту терапевтически оптимизированного количества, по меньшей мере, первого изолированного блокирующего VEGFR2 антитела человека к VEGF согласно настоящему изобретению или конструкции терапевтический агент-антитело, включающей такое антитело, тем самым вызывая противоопухолевый эффект.

Таким образом, обеспечены составы или лекарственные средства для визуализации и лечения, которые, как правило, включают:

(а) первую фармацевтическую композицию, включающую диагностически эффективное количество меченого детектируемой меткой связывающего опухоль агента, предпочтительно конструкции блокирующего VEGFR2 антитела человека к VEGF согласно настоящему изобретению, которая включает детектируемый агент, функционально связанный со связывающим опухоль агентом или блокирующим VEGFR2 антителом человека к VEGF согласно настоящему изобретению; и

(b) вторую фармацевтическую композицию, включающую терапевтически эффективное количество по меньшей мере одного изолированного блокирующего VEGFR2 антитела человека к VEGF согласно настоящему изобретению или конструкции терапевтический агент-антитело, включающей такое антитело.

Настоящее изобретение также обеспечивает *in vitro* диагностические наборы, включающие, по меньшей мере, первую композицию или фармацевтическую композицию, включающую биологически эффективное количество по меньшей мере одного диагностического агента, который функционально связан, по меньшей мере, с первым блокирующим VEGFR2 антителом человека к VEGF согласно настоящему изобретению или его антигенсвязывающим фрагментом.

Настоящее изобретение также дополнительно обеспечивает объединенные наборы, в которых диагностический агент предназначен для применения вне организма, предпочтительно для проведения теста на биологическом образце, полученном из животного или пациента. По этой причине настоящее изобретение обеспечивает наборы, включающие, как правило, по меньшей мере в двух отдельных контейнерах, по меньшей мере, первую композицию, фармацевтическую композицию или лечебный коктейль, включающие биологически эффективное количество, по меньшей мере, первого блокирующего VEGFR2 антитела человека к VEGF согласно настоящему изобретению, или антигенсвязывающий фрагмент или иммуноконъюгат такого антитела к VEGF; и биологически эффективное количество по меньшей мере одного диагностического агента, компонента или системы для применения *in vitro*.

"Диагностический агент, компонент или система для применения *in vitro*" будет представлять собой любой диагностический агент или комбинацию агентов, которые позволят диагностировать одно или более заболеваний, которые включают ангиогенный компонент. Средства для диагностики *in vitro*, таким образом, включают такие средства, которые подходят для получения диагностических или прогностических сведений относительно заболевания или расстройства, как описано в любом из патентов США №№ 5712291, 5753230, 5972922, 5639757, WO 98/45331 и WO 98/16551, каждый из которых специально включен в данную заявку посредством ссылки.

В аспекте диагностики и лечения рака *in vitro* диагностический агент предпочтительно включает диагностический компонент, который включает, по меньшей мере, первый участок связывания, который связывается с доступным компонентом опухолевой клетки, сосудистой сети опухоли (предпочтительно) или стромой опухоли (предпочтительно), функционально связанный с "детектируемым или репортерным агентом", непосредственно или опосредованно детектируемым с помощью диагностического теста *in vitro*. "Детектируемые или репортерные агенты", непосредственно детектируемые *in vitro*, включают такие агенты, как радиоактивные метки и репортерные агенты, детектируемые с помощью иммунофлуоресценции.

"Детектируемые или репортерные агенты", опосредованно детектируемые *in vitro*, включают такие, которые функционируют в сочетании с дополнительным экзогенным агентом(ами), таким как детектируемые ферменты, которые позволяют получить окрашенный продукт при контакте с хромогенным субстратом. Опосредованное детектирование *in vitro* также распространяется на детектируемые или репортерные компоненты или системы, которые включают первый участок связывания, который связывается с доступным компонентом опухолевой клетки, сосудистой сети опухоли (предпочтительно) или стромы опухоли (предпочтительно), в комбинации по меньшей мере с одним детектирующим антителом, которое проявляет иммуноспецифичность к первому участку связывания. "Детектирующее антитело" предпочтительно представляет собой "вторичное антитело", которое присоединено непосредственно или опосредованно к детектируемому агенту, такому как радиоактивная метка или фермент. В качестве альтернативы можно применять "вторичную и третичную систему детектирования антителами", включающую первое детектирующее антитело, которое проявляет иммуноспецифичность к первому участку связывания, в комбинации со вторым детектирующим антителом, которое проявляет иммуноспецифичность к первому детектирующему антителу, второе детектирующее антитело при этом присоединено непосредственно или опосредованно к детектируемому агенту.

#### **Краткое описание фигур**

Следующие фигуры составляют часть настоящего описания и включены, чтобы дополнительно продемонстрировать некоторые аспекты настоящего изобретения. Настоящее изобретение можно лучше понять благодаря одному или более из этих фигур в комбинации с подробным описанием конкретных вариантов реализации, представленных в данной заявке.

На фиг. 1 представлены последовательности нуклеотидов и аминокислот вариабельной области тяжелой (VH) и легкой (VL) цепи scFv-формы клона EJ173/112-C11 (r84/PGN311). ScFv клонировали с помощью сайта Nco/NotI в pHOG21 (3.7 т.п.н.). Сайты рестрикции, используемые для исходного клонирования (NcoI, HindIII, MluI и NotI), выделены курсивом и подчеркнуты. Последовательность линкера ме-



жду VN и VL выделена курсивом.

На фиг. 2 показано, что scFv в клоне EJ173/112-C11 (r84/PGN311) связывает VEGF. На фиг. 2 показаны результаты анализа ELISA для оценки связывания клона EJ173/112-C11 (r84), его материнского клона и положительного контрольного антитела (мышинный B9) с нанесенным на планшет VEGF-A. Клон EJ173/112-C11 (r84) проявил наиболее высокий сигнал связывания и, следовательно, наиболее высокую аффинность.

На фиг. 3 показано, что scFv в клоне EJ173/112-C11 (r84/PGN311) эффективно конкурирует с антителом 2C3 за связывание с VEGF, что представлено в результатах конкурентного анализа ELISA. Так как клон EJ173/112-C11 (r84) эффективно конкурирует с антителом 2C3 за связывание с VEGF, это показывает, что клон EJ173/112-C11 (r84) связывается, по существу, с тем же эпитопом, что и антитело мыши 2C3 к VEGF.

На фиг. 4 показано, что scFv в клоне EJ173/112-C11 (r84/PGN311) связывается как с VEGF мыши, так и с VEGF человека.

На фиг. 5 показаны результаты анализа Biacore, применяемого для оценки аффинности связывания различных scFv антител с иммобилизированным VEGF-A. Кривые связывания представлены на фиг. 5, на которых можно видеть, что scFv-форма EJ173/112-C11 (r84/PGN311) проявляет заметно более высокую аффинность связывания, чем одноцепочечная форма материнского клона (m). Другие представленные кривые представляют собой кривые для меченых v41, r68, r3 и r26.

На фиг. 6 показано, что IgG EJ173/112-C11 (r84/PGN311) ингибирует опосредованную VEGF внутриклеточную передачу сигнала через VEGFR2, что представлено в результатах анализа *in vivo* на клеточной системе, в котором показано, что IgG EJ173/112-C11 (r84) ингибирует фосфорилирование Erk1/2.

На фиг. 7 показано, что клон EJ173/112-C11 (r84/PGN311) распознает укороченную изоформу 121 VEGF (VEGF121), что представлено в результатах анализа ELISA.

На фиг. 8A и 8B показано, что r84/PGN311 существенно блокирует взаимодействие VEGF с VEGFR2, но существенно не блокирует взаимодействие VEGF с VEGFR1. VEGF-биотин в присутствии или отсутствие указанных антител инкубировали в лунках планшета ELISA, которые были покрыты растворимым VEGFR1 (фиг. 8A) или VEGFR2 (фиг. 8B). Сигнал одного VEGF (VEGF) или VEGF в присутствии указанного антитела нормировали по одному VEGF (100%). Показано среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего. N = 12 (4 идентичных планшета с каждым вариантом обработки, выполняли в трех повторностях). Сигнал, составляющий менее чем 50%, рассматривают как значимое и существенное ингибирование связывания. Синагис представляет собой антитело человека к PCB, используемое в качестве отрицательного контроля. Для сравнения также представлены результаты с антителом Авастин (бевацизумаб) (Presta и др., 1997), которые показывают, что Авастин, по существу, блокирует взаимодействие VEGF с обоими VEGFR2 и VEGFR1.

На фиг. 9A и 9B показан вектор экспрессии scFv. На фиг. 9A показан вектор экспрессии scFv - pHOG21. ApR, ген устойчивости к ампициллину; ColE1, точки начала репликации ДНК; f1IG, межгенный участок фага f1; c-тус, эпитоп, распознаваемый моноклональным антителом 9E10; His6, шесть остатков гистидина; relB, сигнальный пептид бактериальной пектацтиазы; P/O, промотор/оператор lac дикого типа. На фиг. 9B показаны последовательности нуклеотидов (SEQ ID NO: 28) и аминокислот (SEQ ID NO: 29) С-концевой кодирующей области.

На фиг. 10A, 10B и 10C показано, что связанные с опухолью макрофаги экспрессируют VEGFR2. На фиг. 10A показана колокализация окрашивания T014 (антитело к VEGFR2) и F4/80 (маркер макрофагов) на срезах опухоли из контрольных животных или животных, которым вводили 2C3. На фиг. 10A показано, что 2C3 уменьшает инфильтрацию макрофагов. Тем не менее, как контрольная, так и 2C3 группы демонстрировали колокализацию VEGFR2 и маркеров макрофагов. На фиг. 10B показано количество клеток, положительных одновременно по одному из трех различных маркеров макрофагов и VEGFR2. На фиг. 10C с применением двух различных антител к VEGFR2 показано, что перитонеальные макрофаги из животных-опухоленосителей экспрессируют VEGFR2.

На фиг. 11 показано, что r84/PGN311 ингибирует рост опухолей MDA-MB-231. На фиг. 11 показаны результаты исследования, в котором использовалась модель рака молочной железы *in vivo* (на мышах) MDA-MB-231 и исследовался эффект r84, авастина или солевого раствора (контроль) на объем опухоли. Показаны средний объем опухоли  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Мыши, которым вводили авастин и r84, имели опухоли значительно меньших объемов, чем у контрольных животных.

На фиг. 12 показаны результаты из того же исследования, что и представленное на фиг. 11, за исключением того, что на фиг. 12 показано отношение масса опухоли/масса тела для отдельных животных в каждой группе. Мыши, которым вводили авастин и r84/PGN311, имели отношения масса опухоли/масса тела значительно меньшие, чем у контрольных животных.

На фиг. 13 показано, что r84/PGN311 ингибирует рост опухоли A673. На фиг. 13 показаны результаты исследования с использованием модели опухоли A673 *in vivo* (на мышах) и показано влияние r84, 2C3 или контрольного антитела (Синагис - антитела человека против PCB) на объем опухоли. Показан средний объем опухоли  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Мыши, которым вводили 2C3 и r84, имели объ-

емы опухолей, значительно меньшие, чем у контрольных животных. 2C3 и r84, таким образом, являются эффективными для контролирования роста опухоли A673.

На фиг. 14 показано, что r84/PGN311 значительно уменьшало инфильтрацию связанных с опухолью макрофагов. Опухоли брали у мышей с опухолевыми клетками MDA-MB-231, делали срезы и окрашивали их антителами к маркеру макрофагов (Mac-3). Анализировали три опухоли из контрольных животных и по три опухоли из животных, которым вводили r84 и 2C3, и исследовали по 5 изображений для каждой опухоли. На фиг. 14 показано, что опухоли из животных, которым вводили r84 и 2C3, проявили значительно пониженную экспрессию маркера макрофагов Mac-3, и что r84 проявило более выраженный эффект, чем 2C3 ( $p < 0.01$  для r84).

На фиг. 15 показано, что r84/PGN311 значительно уменьшает плотность микрососудов в модели опухоли на животном MDA-MB-231. Опухоли брали у мышей с опухолевыми клетками MDA-MB-231, делали срезы и окрашивали антителами к эндотелиальным клеткам мыши (MECA-32). Анализировали три опухоли из контрольных животных и по три опухоли из животных, которым вводили r84 и 2C3, и исследовали по 5 изображений для каждой опухоли. На фиг. 15 показано, что опухоли из животных, которым вводили r84 и 2C3, имели значительно сниженное количество кровеносных сосудов в поле зрения при большом увеличении (MECA-32,  $p < 0.0001$ ).

На фиг. 16A и 16B показано, что r84/PGN311 избирательно блокирует путь передачи сигнала через VEGFR2. На фиг. 16A показано, что r84/PGN311 ингибирует стимулированное VEGF (+VEGF) фосфорилирование Erk1/2 (pERK1/2) и PLC- $\gamma$  (pPLC- $\gamma$ ) на экспрессирующих VEGFR2 клетках (HDMEC). Положительный контроль Авастин также ингибирует стимулированное VEGF фосфорилирование Erk1/2 и PLC- $\gamma$ . На фиг. 16B показано, что r84/PGN311 не ингибирует стимулированное VEGF фосфорилирование VEGFR1 на экспрессирующих VEGFR1 клетках (PAE Flt), тогда как положительный контроль, Авастин, ингибирует фосфорилирование VEGFR1.

На фиг. 17A, 17B, 17C и 17D показано, что r84/PGN311 приводит к значительному снижению роста опухолей, вызванных линиями клеток немелкоклеточной карциномы легкого. На фиг. 17A, 17B, 17C и 17D показаны результаты исследования с использованием *in vivo* модели на мышах и четырех различных линий клеток немелкоклеточной карциномы легкого, H460 (фиг. 17A), H1299 (фиг. 17B), H358 (фиг. 17C) и A549 (фиг. 17D). Представлено влияние r84/PGN311, Авастина или контрольного антитела (Синагис или XTL) на массу опухолей (показана средняя масса опухолей  $\pm$  стандартная ошибка среднего). Мыши, которым вводили r84/PGN311 и Авастин, имели среднюю массу опухолей значительно более низкую, чем у контрольных животных. r84/PGN311 и Авастин, таким образом, являются эффективными для контролирования роста линий клеток немелкоклеточной карциномы легкого. r84/PGN311 действует лучше, чем Авастин по меньшей мере в моделях H460 (фиг. 17A), H1299 (фиг. 17B) и A549 (фиг. 17D). r84 действует значительно лучше, чем Авастин в модели A549 (фиг. 17D).

На фиг. 18A, 18B и 18C показано, что плотность лимфатических сосудов в опухолях при лечении r84, значительно ниже, чем в контрольных опухолях. На фиг. 18A (шесть изображений) представлено иммунофлуоресцентное окрашивание замороженных срезов опухоли MDA-MB-231, демонстрирующих лимфатические маркеры подоплантин (зеленый), Prox1 (красный), и показаны совмещенные изображения, в контрольных опухолях (верхние изображения) и опухолях при лечении r84 (нижние изображения). На фиг. 18B (два изображения) показаны срезы опухоли MDA-MB-231, окрашенные LYVE-1, в контрольных опухолях (верхнее изображение) и опухолях при лечении r84 (нижние изображения). Характер окрашивания LYVE-1 (фиг. 18B) аналогичен таковому для подоплантина и Prox1 (фиг. 18A). Всю площадь каждого окрашенного LYVE-1 среза опухоли исследовали при небольшом увеличении и определяли процент положительной по LYVE-1 площади для каждого поля, применяя программное обеспечение для визуализации NIS-Elements (фиг. 18C). Десять полей с наиболее высоким процентом положительной по LYVE-1 площади усредняли с получением конечного значения для каждой опухоли, и средние значения для групп проверяли на статическую значимость с помощью непарного t-критерия Стьюдента. Процент положительной по LYVE-1 площади для контрольных опухолей ( $7.03 \pm 1.013$ ;  $n = 6$ ) был значимо большим, чем для опухолей при лечении r84 ( $2.23 \pm 0.986$ ;  $n = 5$ ), с  $P = 0.0042$ .

На фиг. 19 показано, что r84 в полностью человеческих и мышинных химерных IgG-форматах связывается как с VEGF мыши, так и с VEGF человека. VEGF человека (0.5 мг/мл, R&D) или VEGF мыши (0.5 мг/мл, Sigma) покрывали дно лунок 96-луночных планшетов. Лунки блокировали и затем инкубировали с указанной концентрацией r84 человека (голубые линии) или химерного r84 мыши (зеленые линии). Антитело, связавшееся с лунками, детектировали путем инкубирования с HRP-конъюгированным антителом к Fc человека или к антителу мыши. Показан средний коэффициент поглощения.

На фиг. 20A и 20B показано, что r84/PGN311 эффективно ингибирует индуцированную VEGF миграцию экспрессирующих VEGFR2 эндотелиальных клеток. Клетки HDMEC (фиг. 20A) и клетки PAE, экспрессирующие KDR (фиг. 20B), использовали в тестах в системе Transwell (с мембранными вставками Transwell). Клетки либо не стимулировали (NS), либо подвергали обработке VEGF при концентрации 100 нг/мл, чтобы стимулировать миграцию (VEGF), и тестировали способность 500-кратного молярного избытка r84, Авастина (Avas) или контрольного (Cntl) антител (IgG-формат) ингибировать индуцирован-

ную VEGF миграцию. VEGF индуцировал миграцию по сравнению с не стимулированными клетками ( $p < 0.01$ ). r84 и Авастин ингибировали индуцированную VEGF миграцию (\*\*\*,  $p < 0.0001$  от одного VEGF).

На фиг. 21 показано, что r84/PGN311 не ингибировало индуцированную VEGF миграцию экспрессирующих VEGFR1 эндотелиальных клеток. Экспрессирующие Flt1 клетки PAE либо не стимулировали (NS), либо подвергали обработке VEGF (VEGF), чтобы стимулировать миграцию (VEGF), и тестировали способность r84, Авастина (Avas) или контрольного (Cntl) антител ингибировать индуцированную VEGF миграцию. VEGF индуцировал миграцию по сравнению с не стимулированными клетками. Авастин значительно ингибировал индуцированную VEGF миграцию, тогда как r84 - не ингибировало. Таким образом, на фиг. 21 показано, что r84/PGN311 не ингибировало индуцированную VEGF миграцию экспрессирующих VEGFR1 эндотелиальных клеток. Экспрессирующие Flt1 клетки PAE, эндотелиальные клетки, которые экспрессируют исключительно VEGFR1, подвергали сывороточному голоданию в течение 24 часов и затем наносили на планшеты в мембранные вставки Transwell в бессывороточных средах (поры 8 мкм, 5,000 клеток/вставку). Миграцию на нижнюю сторону мембраны стимулировали путем добавления следующих компонентов в лунку ниже вставки: бессывороточные среды (NS); VEGF (100 нг/мл); VEGF + контрольное IgG (Cntl); VEGF + Авастин (Авастин); VEGF + r84 (r84). Клеткам позволяли мигрировать в течение 24 ч, а затем мембраны удаляли, клетки удаляли с верхней поверхности мембраны, фиксировали и окрашивали мембраны с помощью DAPI. Окрашенные DAPI ядра на нижней стороне мембраны затем подсчитывали с помощью флуоресцентной микроскопии и переводили в количественное выражение, применяя программное обеспечение (Elements, Nikon). \*,  $p < 0.05$  r84 от Авастина; \*\*,  $p < 0.01$  Авастин от контроля.

На фиг. 22 показано, что r84/PGN311 заметно уменьшало рост опухолевых клеток поджелудочной железы Pancel у мышей. Мышам, несущим клетки аденокарциномы поджелудочной железы Pancel, вводили либо IgG r84/PGN311, либо Синагис (отрицательный контроль). Объемы опухолей представлены на всем протяжении лечения. Таким образом, на фиг. 22 показано, что r84/PGN311 уменьшало рост подкожных ксенотрансплантатов опухоли поджелудочной железы человека. Опухолевые клетки Pancel инъецировали подкожно SCID мышам ( $2 \times 10^6$  клеток/животное) в день 0. Мышей лечили, начиная со дня 1 два раза в неделю, 500 мкг контрольного IgG (Синагис) или r84. Объем опухоли измеряли в динамике по времени, применяя штангенциркули. Показан средний (со стандартной ошибкой среднего) объем опухоли ( $n = 5$ /группу) в зависимости от дня после инъекции опухолевых клеток (TCI).

На фиг. 23 показано, что мышинный химерный вариант r84/PGN311 продлевает выживаемость мышей, несущих сингенные опухоли молочной железы 4T1. Мышиные опухоли 4T1 инъецировали ортотопически мышам Balb/C ( $n = 8$  мышей на группу). Либо мышинный химерный вариант r84/PGN311 (mcr84, красная линия), либо контрольное (Контроль, черная линия) антитело вводили путем интраперитонеальной инъекции дважды в неделю, начиная со дня 12 и продолжая в течение 3 недель. r84/PGN311 увеличивало выживаемость по сравнению с контрольным.

На фиг. 24 показан уровень VEGF мыши в сыворотках несущих опухоль мышей, которых лечили контрольным IgG, Авастином, 2C3 или r84 (как указано). Сыворотки собирали и анализировали с помощью ELISA на уровень VEGF мыши, применяя набор от R&D systems. Вдобавок, аликвоту сывороток из мышей, которым вводили r84, предварительно очищали с помощью гранул с Белком G. Супернатант из очищенных с помощью Белка G сывороток (r84 sure) также тестировали.

На фиг. 25 показано, что r84, и в меньшей степени Авастин (bev), уменьшали инфильтрацию CD11b+/Gr1+ клеток в опухоли MDA-MB-231 in vivo, тогда как 2C3 не вызывало такого эффекта. Снижение для r84 составляло 39%. Односторонний дисперсионный анализ показал, что пониженная инфильтрация, наблюдаемая у животных, которых лечили r84, но не у животных, которых лечили 2C3 или Авастином (bev), статистически отличалась от контрольных животных (обозначенный \*\*,  $p < 0.01$ )

#### Описание примерных вариантов реализации

Солидные опухоли и карциномы являются причиной более чем 90% всех типов рака у людей. Хотя применение моноклональных антител и иммунотоксичных исследовалось в терапии лимфом и лейкоз, эти агенты были досадно неэффективны в клинических испытаниях против карцином и других солидных опухолей (Abrams и Oldham, 1985). Основная причина неэффективности основанного на антителах лечения состоит в том, что макромолекулы нелегко доставить внутрь солидных опухолей. Даже если они уже находятся внутри опухолевого образования, эти молекулы не могут равномерно распределяться вследствие присутствия плотных контактов между опухолевыми клетками, фиброзного основного вещества, градиентов тканевого давления и заграждения сайтов связывания (Dvorak и др., 1991a).

При разработке новых стратегий для лечения солидных опухолей, способы, которые включают нацеливание на сосудистую сеть опухоли, вместо опухолевых клеток, дают особые преимущества. Эффективное разрушение или блокада сосудов опухоли останавливает кровоток через опухоль и приводит к лавинообразному процессу гибели опухолевых клеток. Конструкции антитело-токсин и антитело-коагулянт уже эффективно применяли для специфичного нацеливания и разрушения сосудов опухоли, что приводило к некрозу опухоли (Burgows и др., 1992; Burgows и Thorpe, 1993; WO 93/17715; WO 96/01653; патенты США №№ 5855866; 5877289; 5965132; 6051230; 6004555; 6093399).

Если антитела, факторы роста или другие связывающие лиганды применяются для специфичной доставки коагулянта в сосудистую сеть опухоли, такие агенты называют "коагулигандами". В настоящее время, предпочтительным коагулянтом для применения в коагулигандах является укороченный Тканевый фактор (tTF) (Huang и др., 1997; WO 96/01653; патент США № 5877289). TF представляет собой главный инициатор свертывания крови. В местах повреждения фактор VII/VIIa в крови приходит во взаимодействие и связывается с TF на клетках в периваскулярных тканях. Комплекс TF:VIIa в присутствии фосфолипидной поверхности активирует факторы IX и X. Это, в свою очередь, приводит к образованию тромбина и фибрина и, в конечном счете, сгустка крови.

Был описан диапазон подходящих целевых молекул, которые доступны на эндотелии опухоли, но, в основном, отсутствуют в нормальном эндотелии. Например, можно применять экспрессируемые мишени, такие как эндоглин, Е-селектин, Р-селектин, VCAM-1, ICAM-1, PSMA, TIE, лиганд, реагирующий с LAM-1, рецептор VEGF/VPF, рецептор FGF, интегрин  $\alpha_v\beta_3$ , плейотропин или эндосиалин (патенты США №№ 5855866; 5877289 и 6004555; Burrows и др., 1992; Burrows и Thorpe, 1993; Huang и др., 1997; каждый из которых включен в данную заявку посредством ссылки).

Другие мишени, индуцируемые обычным опухолевым окружением или после вмешательства человека, также представляют собой целевые молекулы, как описано в патентах США №№ 5776427 и 6036955; каждый из которых включен в данную заявку посредством ссылки). При применении в сочетании с предварительной супрессией в нормальных тканях и индукцией сосудов в опухоли, антигены МНС класса II также можно использовать в качестве мишеней (патенты США №№ 5776427; 6004554 и 6036955; каждый из которых включен в данную заявку посредством ссылки).

Поглощаемые мишени представляют собой другую подходящую группу, включающую VEGF, FGF, TGF $\beta$ , HGF, PF4, PDGF, TIMP, лиганд, который связывается с TIE, или связанная с опухолью изоформа фибронектина (патенты США №№ 5877289 и 5965132; каждый из которых включен в данную заявку посредством ссылки). Изоформы фибронектина представляют собой лиганды, которые связываются с рецепторами семейства интегринов. Связанные с опухолью изоформы фибронектина представляют собой целевые компоненты как сосудистой сети опухоли, так и основного вещества опухоли.

Одним на сегодняшний день предпочтительным маркером для такого клинического нацеливания является VEGF, связанный с рецептором. Фактически, сборка комплексов VEGF:рецептор является одним из наиболее специфичных маркеров сосудистой сети опухоли, наблюдаемым на сегодняшний день (патенты США № 5877289; 5965132 и 6051230; Lin-Ke и др., 1996; Dvorak и др., 1991b).

Комплекс VEGF:рецептор представляет собой привлекательную мишень для специфичной доставки лекарственных препаратов или других эффекторов в эндотелий опухоли, так как опухоли богаты цитокинами и факторами роста и так как рецепторы VEGF чрезмерно экспрессируются в гипоксических условиях, которые обнаруживают в большинстве солидных опухолей (Mazure и др., 1996; Forsythe и др., 1996; Waltenberger и др., 1996; Gerber и др., 1997; Kremer и др., 1997). Повышенная регуляция как лиганда, так и его рецептора специфично приводит в микроокружении опухоли к высокой концентрации занятого рецептора на сосудистом эндотелии опухоли по сравнению с эндотелием нормальной ткани (патенты США №№ 5877289 и 5965132). Dvorak и коллеги также показали, что поликлональные антитела кролика в направлении против N-конца VEGF избирательно окрашивают кровеносные сосуды опухоли после инъекции мышам, несущим сингенные опухоли (Lin-Ke и др., 1996).

Роль VEGF в качестве мишени для клинического вмешательства не ограничена лечением иммунотоксинами или коагулигандами. Действительно, VEGF представляет собой один из ключевых факторов, участвующих в ангиогенезе солидных опухолей (Ferrara, 1995; Potgens и др., 1995), который представляет собой как эффективный агент проницаемости (Senger и др., 1983; Senger и др., 1990; Senger и др., 1986), так и митоген эндотелиальных клеток (Keck и др., 1989; Connolly и др., 1989; Thomas, 1996). Связь между VEGF и ангиогенезом позволила предложить различные терапевтические стратегии, нацеленные на воздействие на VEGF (Siemeister и др., 1998).

#### A. VEGF и рецепторы VEGF.

Изоформа А фактора роста эндотелия сосудов (VEGF-A, кратко названный "VEGF" в настоящей заявке) представляет собой многофункциональный цитокин, который индуцируется гипоксией и онкогенными мутациями. VEGF представляет собой первичный стимулирующий фактор развития и поддержания сосудистой сети в эмбриогенезе. Он функционирует как эффективный индуцирующий проницаемость агент, хемотаксический агент эндотелиальных клеток, эндотелиальный фактор выживаемости и фактор пролиферации эндотелиальных клеток (Thomas, 1996; Neufeld и др., 1999). Его активность требуется для нормального эмбрионального развития (Fong и др., 1995; Shalaby и др., 1995), так как направленное нарушение одной или обеих аллелей VEGF приводит к эмбриональной смертности (Carmeliet и др., 1996; Ferrara и др., 1996).

VEGF представляет собой важный фактор, запускающий ангиогенез или васкулогенез, во многих физиологических и патологических процессах, включая заживление ран (Frank и др., 1995; Burke и др., 1995), диабетическую ретинопатию (Alon и др., 1995; Malecaze и др., 1994), псориаз (Detmar и др., 1994), атеросклероз (Inoue и др., 1998), ревматоидный артрит (Harada и др., 1998; Nagashima и др., 1999), рост

солидной опухоли (Plate и др., 1994; Claffey и др., 1996).

Большое разнообразие клеток и тканей продуцируют VEGF, который существует по меньшей мере в пяти изоформах (121, 145, 165, 189 и 206 аминокислот), которые представляют собой варианты сплайсинга, кодируемые одним и тем же геном (Houck и др., 1991; Ferrara и др., 1991; Tischer и др., 1991). Две более маленькие изоформы, 121 и 165, секретируются из клеток (Houck и др., 1991; Anthony и др., 1994). Секретируемый VEGF представляет собой облигатный димер размером между 38–46 кДа, в котором мономеры связаны двумя дисульфидными связями.

Димеры VEGF связываются с высокой аффинностью с двумя хорошо описанными рецепторами, VEGFR1 (Flt-1) и VEGFR2 (KDR/Flk-1), которые избирательно экспрессируются на эндотелиальных клетках (Flt-1 и Flk-1 представляют собой мышинные гомологи).  $K_d$  связывания VEGF с VEGFR1 и VEGFR2 составляет 15–100 пМ и 400–800 пМ соответственно (Terman и др., 1994). Недавно идентифицированный третий белок клеточной поверхности, нейропилин-1, также связывается с VEGF с высокой аффинностью (Olander и др., 1991; De Vries и др., 1992; Terman и др., 1992; Soker и др., 1998).

VEGFR1 и VEGFR2 представляют собой члены семейства рецепторов с тирозинкиназной активностью III типа (RTK III), которые описываются семью внеклеточными IgG-подобными повторами, одним закрепленным трансмембранным доменом и внутриклеточным составным тирозинкиназным доменом (Mustonen и Alitalo, 1995). До недавнего момента VEGFR1 и VEGFR2 считали почти исключительно экспрессирующимися на эндотелиальных клетках (Mustonen и Alitalo, 1995). Хотя сообщали, что VEGFR1 и VEGFR2 имеют различные функции относительно стимулирования пролиферации, миграции и дифференцировки эндотелиальных клеток (Waltenberger и др., 1994; Guo и др., 1995), точная роль, которую каждый рецептор играет в биологии VEGF и гомеостазе эндотелиальных клеток, не была четко определена до появления настоящего изобретения.

Недавние исследования с применением нокаутных мышей показали, что каждый из VEGF, VEGFR1 и VEGFR2 жизненно важен для васкулогенеза, ангиогенеза и развития зародыша (Fong и др., 1995; Shalaby и др., 1995; Hradsuka и др., 1998). В исследованиях летальных нокаутных фенотипы, связанные с отсутствием каждого рецептора, были различными. Направленное нарушение VEGFR2 приводило к появлению зародыша, у которого отсутствовала дифференцировка эндотелиальных клеток и не образовывались кровяные островки желточного мешка или не происходил васкулогенез (Shalaby и др., 1995). Мутанты с отсутствием VEGFR1 имели нарушенный васкулогенез, дезорганизованные сосредоточения эндотелиальных клеток и расширенные кровеносные сосуды (Fong и др., 1995; Hradsuka и др., 1998). VEGFR1, очевидно, играет жизненно важную биологическую роль.

VEGFR1 имеет более высокую аффинность к VEGF, чем VEGFR2, хотя он имеет более низкую тирозинкиназную активность. Это позволяет предположить, что внеклеточный домен VEGFR1 особенно важен. Эта гипотеза была убедительно подкреплена результатами исследований на нокаутных мышах, в которых удаляли тирозинкиназный домен VEGFR1, оставляя VEGF-связывающий домен нетронутым (Hradsuka и др., 1998). У лишенных VEGFR1-тирозинкиназы зародышей развивались нормальные кровеносные сосуды, и они выживали (Hradsuka и др., 1998).

Вдобавок к более ранним нокаутам (Fong и др., 1995; Shalaby и др., 1995), исследования Hiratsuka и др. (1998) указывают, что VEGFR1 играет жизненно важную биологическую роль. Тем не менее, тирозинкиназная передача сигналов, похоже, не является критическим фактором. Интересно отметить, что макрофаги из нокаутных по VEGFR1 мышей не проявляют индуцированный VEGF хемотаксис (Hradsuka и др., 1998; включен в данную заявку посредством ссылки), тем самым означая, что VEGFR1 является рецептором, ответственным за опосредование этого важного биологического ответа на VEGF.

Некоторые группы сообщали, что VEGFR2 является доминантным рецептором передачи сигналов индуцированного VEGF митогенеза и проницаемости (Waltenberger и др., 1994; Zachary, 1998; Korpelainen и Alitalo, 1998). Роль VEGFR1 в функционировании эндотелиальных клеток гораздо меньше ясна, хотя его функции для миграции макрофагов и хемотаксиса хорошо задокументированы у Hradsuka и в др. (1998) исследованиях, обсуждаемых выше.

Clauss и др. (1996; включен в данную заявку посредством ссылки) также сообщил, что VEGFR1 играет важные роли в активации и хемотаксисе моноцитов. Фактически, клетки линии макрофагов/моноцитов экспрессируют только VEGFR1, который представляет собой рецептор, ответственный за опосредование привлечения моноцитов и прокоагулянтную активность (Clauss и др., 1996). Связывание VEGF с VEGFR1 на моноцитах и макрофагах также приводит к повышению внутриклеточного кальция и индуцирует фосфорилирование тирозина (Clauss и др., 1996).

Полагают, что связывание димера VEGF с рецептором VEGF индуцирует димеризацию рецептора. Димеризация рецептора затем вызывает аутофосфорилирование определенных остатков тирозина, Y801 и Y1175, и Y1213 и Y1333 на внутриклеточной стороне VEGFR2 и VEGFR1 соответственно. Это приводит к запуску каскада сигнальной трансдукции, который включает активацию фосфолипазы  $C\gamma$  (PLC $\gamma$ ) и фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K), и к повышению внутриклеточной концентрации ионов кальция (Hood и Meininger, 1998; Hood и др., 1998; Kroll и Waltenberger, 1998).

Внутриклеточные явления далее в индуцированной VEGF передаче сигнала менее ясны, хотя мно-

жество групп исследователей показали, что после активации VEGFR2 посредством VEGF продуцируется оксид азота (NO) (Hood и Meininger, 1998; Hood и др., 1998; Kroll и Waltenberger, 1998). Также было показано, что активация VEGFR2, но не VEGFR1, посредством VEGF активирует Src и Ras-MAP киназный каскад, включая MAP-киназы, ERK1 и ERK2 (Waltenberger и др., 1994, 1996; Kroll и Waltenberger, 1997).

Роль VEGFR1 в функционировании эндотелиальных клеток гораздо менее ясна, в частности, потому что лишенные тирозинкиназы Flt-1 мыши жизнеспособны и имеют нормальные сосуды (Hiratsuka и др., 1998). Было выдвинуто предположение, что основная биологическая роль VEGFR1 на эндотелии состоит в том, что он выступает в качестве несигнальной лиганд-связывающей молекулы, или рецептора-"приманки", который может быть необходим для представления VEGF VEGFR2.

Связь между VEGF и патологическими ангиогенными состояниями побуждала различные попытки блокировать активность VEGF. Такие попытки включают разработку некоторых нейтрализующих антител к VEGF (Kim и др., 1992; Presta и др., 1997; Sioussat и др., 1993; Kondo и др., 1993; Asano и др., 1995). Антитела к рецепторам VEGF также были описаны, такие как описанные в патентах США №№ 5840301 и 5874542 и после настоящего изобретения в WO 99/40118. Патенты США №№ 5840301 и 5874542 действительно позволили предположить, что блокирование рецепторов VEGF вместо самого VEGF полезно по ряду причин.

Конструкции с растворимым рецептором (Kendall и Thomas, 1993; Aiello и др., 1995; Lin и др., 1998; Millauer и др., 1996), ингибиторы тирозинкиназы (Siemeister и др., 1998), антисмысловые стратегии, аптамеры РНК и рибозимы против VEGF или рецепторов VEGF также были описаны (Saleh и др., 1996; Cheng и др., 1996; каждый из которых включен в данную заявку посредством ссылки).

В. Антитела к VEGF.

В1. Свойства антител.

Было показано, что применение различных ингибиторных способов, по меньшей мере, до некоторой степени эффективно в блокировании ангиогенеза и/или в подавлении опухолевого роста посредством препятствования передаче сигналов VEGF. Фактически было показано, что моноклональные антитела к VEGF ингибируют рост ксенотрансплантата опухоли человека и образование асцитов у мышей (Kim и др., 1993; Asano и др., 1995; 1998; Mesiano и др., 1998; Luo и др., 1998a; 1998b; Borgstrom и др., 1996; 1998).

Антитело А4.6.1 представляет собой высокоаффинное антитело к VEGF, способное блокировать связывание VEGF как с VEGFR1, так и с VEGFR2 (Kim и др., 1992; Wiesmann и др., 1997; Muller и др., 1998). Аланин-сканирующий мутагенез и рентгеноструктурный анализ VEGF, связанного Fab-фрагментом А4.6.1, показал, что эпитоп на VEGF, который связывает А4.6.1, сосредоточен в аминокислотах 89-94. Эти структурные данные демонстрируют, что А4.6.1 конкурентно ингибирует связывание VEGF с VEGFR2, но ингибирует связывание VEGF с VEGFR1 наиболее вероятно вследствие стерического препятствия (Muller и др., 1998; Keyt и др., 1996; каждый из которых включен в данную заявку посредством ссылки).

А4.6.1 представляет собой наиболее широко используемое в литературе на сегодняшний день нейтрализующее антитело к VEGF. Было показано, что оно ингибирует рост и индуцированную VEGF сосудистую проницаемость целого ряда опухолей человека у мышей (Brem, 1998; Vasa и др., 1997; Presta и др., 1997; Mordenti и др., 1999; Borgstrom и др., 1999; Ryan и др., 1999; Lin и др., 1999; каждый из которых особенно включен в данную заявку посредством ссылки). А4.6.1 также ингибирует образование асцитов в хорошо охарактеризованной модели на мышах карциномы яичника человек и распространение опухоли в модели метастазирования на мышах. А4.6.1 было гуманизировано с помощью методик моновалентного фагового дисплея (Brem, 1998; Vasa и др., 1997; Presta и др., 1997; каждый из которых включен в данную заявку посредством ссылки). Полученное гуманизированное антитело, названное Авастин (бевацизумаб), было одобрено для клинического применения (Hurwitz и др., 2004).

Несмотря на успех в данной области с нейтрализующими антителами к VEGF, авторы настоящего изобретения понимают, что новые антитела, особенно антитела человека с более точно определенным характером взаимодействия с VEGFR1 (Flt-1) и/или VEGFR2 (KDR/Flk-1), будут полезны по целому ряду причин. Например, разработка антител к VEGF, которые избирательно блокируют взаимодействие VEGF лишь с одним из двух рецепторов VEGF, обеспечит более точное разделение сигнальных путей, активируемых посредством VEGF в клетках, которые экспрессируют как VEGFR1, так и VEGFR2.

Авторы настоящего изобретения полагают, что антитела человека с определенной эпитоп-специфичностью, которые блокируют связывание VEGF лишь с одним рецептором (VEGFR2), будут иметь клиническую пользу. Исследования Hiratsuka и др. (1998) на нокаутных мышах показали, что как VEGFR1, так и VEGFR2 играют важные биологические роли. До настоящего изобретения реалистичные возможности для терапевтического вмешательства, нацеленные на ингибирование опосредованных VEGF эффектов посредством лишь одного из двух рецепторов, были затруднены отсутствием эффективных, специальных ингибиторных агентов, оптимизированных для введения человеку.

Учитывая необходимость терапевтических специфичных антител человека, которые блокируют ангиогенез, были идентифицированы антитела человека, которые действуют против эпитопа на VEGF, которые специфично и существенно блокируют его взаимодействие с рецептором VEGF 2 (VEGFR2,

KDR/Flk-1), но, по существу, не блокируют его взаимодействие с рецептором VEGF 1 (VEGFR1, Flt-1).

Авторы настоящего изобретения первыми разработали множество полностью человеческих антител к VEGF, которые конкурируют с антителом мыши 2C3 за связывание с VEGF. Целый ряд клонов антител, проявляющих высокую аффинность к VEGF и демонстрирующих избирательное нарушение взаимодействия между VEGF и VEGFR2, но не между VEGF и VEGFR1, были выбраны для дополнительного анализа. В результате один из этих клонов, названный "материнский клон", подвергли созреванию, после которого был выбран новый клон, который продемонстрировал дополнительные важные и значительные усовершенствования, например лучшую аффинность связывания с обоими VEGF мыши и VEGF человека, более высокую стабильность в сыворотке и пониженную склонность к образованию агрегатов в scFv-формате. Это антитело было названо r84 (и PGN311) и проявило превосходную аффинность связывания с VEGF с  $K_d$  для IgG-формата порядка 7 нМ или меньше, что хорошо укладывается в диапазон, показанный эффективным в терапии человека.

Более того, в данной заявке было показано, что антитело r84 значительно уменьшает объем опухоли/опухолевый рост в нескольких общепринятых в данной области моделях опухолей *in vivo* (а именно, модель опухоли рабдомиосаркомы A673, модель опухоли клеток рака молочной железы MDA-MB 231, различные модели немелкоклеточной карциномы легкого человека, модель опухоли раковых клеток поджелудочной железы Panc 1 и модель опухоли молочной железы 4T1). В частности, результаты для r84, по меньшей мере, также хороши, что и для гуманизированного антитела к VEGF, названного Авастин, которое было одобрено для клинического применения. Полностью человеческое антитело, такое как r84, обеспечивает преимущества над доступным гуманизированным антителом. Вдобавок, r84 имеет полезные свойства связывания с VEGF мыши и VEGF человека. Способность связывать VEGF мыши представляет собой важное преимущество над 2C3 и Авастином, которое проявляет антитело r84. Более того, результаты для модели опухоли MDA-MB 231 также показали, что r84 значительно уменьшает инфильтрацию связанных с опухолью макрофагов, которая, как сейчас известно, играет положительную роль в развитии и метастазировании рака и, таким образом, является неблагоприятной для пациентов. В этом отношении было показано, что r84 значительно уменьшает экспрессию маркера макрофагов Mac-3 ( $p < 0.01$ ). Вдобавок, результаты для модели опухоли MDA-MB 231 показали, что r84 значительно ( $p < 0.0001$ ) уменьшает количество кровеносных сосудов в опухоли и, следовательно, значительно уменьшает плотность микрососудов (MVD) в опухоли.

Также было показано, что r84 значительно ингибирует индуцированную VEGF миграцию экспрессирующих VEGFR2 клеток и значительно уменьшает плотность лимфатических сосудов в опухолях MDAMB231. Влияние на плотность лимфатических сосудов оправдывает применение антител человека согласно настоящему изобретению для ингибирования лимфангиогенеза.

Дополнительное полезное свойство, проявляемое r84, представляет собой способность значительно уменьшать инфильтрацию супрессорных клеток миелоидного происхождения, а именно CD11b+/Gr1+ клеток, в опухоли. Более того, это свойство не проявляется антителом 2C3 и проявляется лишь на пониженном уровне Авастином. Таким образом, дополнительные исследования на мышках-опухоленосителях MDA-MB-231 показали, что значительно меньше клеток, положительных по обоим маркерам CD11b/Gr1, инфильтрируют опухоли у животных, которых лечили r84, в противоположность контрольным животным. В сравнительных исследованиях, ни антитело 2C3, ни Авастин не проявили статистически значимого снижения инфильтрации CD11b+/Gr1+ клеток, хотя некоторое снижение можно было измерить у животных, которых лечили Авастином. Снижение количества положительных по двум указанным маркерам клеток, которое наблюдается у животных, которых лечили r84/PGN311, составляет 39% (фиг. 25).

Пониженная инфильтрация CD11b+/Gr1+ супрессорных клеток миелоидного происхождения представляет особый интерес, так клетки, экспрессирующие оба маркера, недавно были связаны с опосредованием рефрактерности опухоли к терапии против VEGF (Shojaei и др., 2007). Супрессорные клетки миелоидного происхождения (CD11b+Gr1+) также представляют собой важных участников прогрессирования опухоли. В микроокружении опухоли эти клетки секретируют иммуносупрессорные медиаторы и индуцируют дисфункцию Т-лимфоцитов (Gabrilovich и др., 2001; Serafini и др., 2004).

Так как CD11b+/Gr1+ клетки связаны с рефрактерностью опухоли к терапии, направленной против VEGF, и участвуют в прогрессировании опухоли, влияние r84/PGN311 на снижение инфильтрации или привлечения этих клеток к опухолям явно имеет потенциальную важность для терапевтического применения r84, а именно для терапевтических применений, связанных с лечением ангиогенных заболеваний, включая рак.

Действительно, так как результаты в данной заявке показали, что инфильтрация опухоли CD11b+/Gr1+ клетками менее выражено/значительно ниже у животных, которых лечили r84/PGN311, это позволяет предположить, что лечение r84 вероятно менее подвержено развитию резистентности к лекарственным препаратам или рефрактерности к терапии, направленной против VEGF, чем лечение другими лекарственными препаратами, нацеленными на VEGF, например другими антителами к VEGF. Вдобавок, учитывая предложенную роль CD11b+/Gr1+ клеток в прогрессировании опухоли, способность r84/PGN311 снижать инфильтрацию или привлечение таких клеток в опухоли вполне может составлять часть механизма, вовлеченного в противоопухолевую активность, например в ингибирование опухолево-

го роста, которое проявляет r84/PGN311.

Также было показано, что длительное применение (введение) r84/PGN311 не вызывает токсичности у мышей.

Далее представлены дополнительные положительные показания терапевтического потенциала антитела r84.

## B2. Блокирующие VEGFR2 антитела человека к VEGF.

Важным разделом настоящего изобретения, подтвержденным с помощью ELISA, тестов на связывание рецептора и тестов на активацию рецептора, является то, что антитела согласно настоящему изобретению избирательно блокируют взаимодействие VEGF с VEGFR2 (KDR/Flk-1), но не с VEGFR1 (Flt-1). Указанные антитела ингибируют индуцированное VEGF фосфорилирование VEGFR2 и ингибируют передачу сигналов через VEGFR2. Антитела также имеют эффективную противоопухолевую активность, останавливая рост широко известных солидных опухолей человека в общепринятых в данной области моделях рака человека на животных. Вдобавок, антитела человека согласно настоящему изобретению имеют антиангиогенные свойства и уменьшают плотность микрососудов в опухолях.

Эти свойства демонстрируют пользу указанных антител в разделении сигнальных путей, которые активируются VEGF в клетках, которые экспрессируют как VEGFR1, так и VEGFR2, а также подчеркивают важность активности VEGFR2 в процессе опухолевого роста и выживаемости. Еще более важным является тот факт, что они обеспечивают уникальный способ терапевтического вмешательства с применением антител человека, обеспечивая специфичное ингибирование индуцированного VEGFR2 ангиогенеза, без сопутствующего ингибирования опосредованных VEGFR1 явлений, таких как функции остеокластов и хондрокластов.

Антитела согласно настоящему изобретению, кратко называемые "блокирующими VEGFR2 антителами человека к VEGF", представляют собой прогресс в данной области и обеспечивают многочисленные преимущества в аспекте применений как в неконъюгированной или изолированной форме, так и конъюгированными или связанными с другими терапевтическими агентами.

Исследования связывания *in vitro* согласно настоящему изобретению демонстрируют, что антитела человека блокируют связывание VEGF с VEGFR2, но не ингибируют связывание VEGF с VEGFR1.

Антитела человека согласно настоящему изобретению, таким образом, значительно более совершенны по сравнению с другими блокирующими антителами к VEGF, включая антитело мыши A4.6.1 и его гуманизированный аналог, Авастин (бевацизумаб). Антитела против VEGF A4.6.1 и Авастин блокируют связывание VEGF с обоими рецепторами VEGF. Кристаллографические и мутагенные исследования показали, что эпитопы связывания для VEGFR2 и VEGFR1 сконцентрированы в двух симметричных полюсах димера VEGF (Wiesmann и др., 1997; Muller и др., 1997). Детерминанты связывания на VEGF, которые взаимодействуют с двумя указанными рецепторами, частично перекрываются и распределены между четырьмя различными фрагментами, которые простираются по всей поверхности димера (Muller и др., 1998). Антитело 4.6.1 связывается с участком VEGF внутри участка связывания рецептора для обоих рецепторов (Muller и др., 1998).

Исследования влияния антител человека согласно настоящему изобретению на индуцированное VEGF фосфорилирование рецепторов показало, что антитела действительно блокируют индуцированное VEGF фосфорилирование VEGFR2. Исследования также показали, что антитела человека согласно настоящему изобретению ингибируют передачу сигналов через VEGFR2, например, было показано, что антитела ингибируют фосфорилирование Erk 1/2 и PLC- $\gamma$  в тестах *in vitro*.

Антитела человека согласно настоящему изобретению ингибируют рост различных типов опухолей человека *in vivo*. Величина супрессии опухолевого роста антителами человека согласно настоящему изобретению аналогична таковой при применении различных нейтрализующих антител к VEGF, включая Авастин. Эффективность этих антител человека была аналогичной обнаруживаемой другими исследователями с применением различных антител к VEGF, что дополнительно демонстрирует роль VEGF в ангиогенезе опухоли и опухолевом росте. Тем не менее, антитела человека согласно настоящему изобретению должны обеспечивать более безопасное терапевтическое средство, основанное на специфичных ингибиторных свойствах, обсуждаемых в данной заявке, и в свете того, что оно представляет собой полностью человеческие антитела.

Тот факт, что можно достигнуть ремиссии скорее, чем остановки роста опухоли, позволяет предположить, что VEGF обеспечивает более чем только ангиогенный сигнал эндотелию опухоли. Benjamin и др. (1999) недавно сообщили, что опухоли включают большую фракцию незрелых кровеносных сосудов, которые еще только должны установить контакт с периваскулярными клетками, и что выживаемость этих кровеносных сосудов зависит от VEGF. Возможно, что нейтрализация VEGF вызывает апоптоз этих незрелых кровеносных сосудов, тем самым уменьшая существующую сосудистую сеть в опухоли. Также возможно, что в опухолях происходит динамический процесс ремоделирования сосудов, включающий как образование сосудов, так и регрессию сосудов, и что нейтрализация VEGF предотвращает образование сосудов, что приводит к суммарному сдвигу в направлении регрессии сосудов.

Обнаружение того, что антитела человека согласно настоящему изобретению подавляют опухолевый рост так же абсолютно, как и Авастин (если не еще больше), указывает на доминантную роль



VEGFR2 в ангиогенезе опухолей. Для многоступенчатого процесса ангиогенеза требуется хемотаксис, продукция металлопротеиназ, инвазия, пролиферация и дифференцировка эндотелиальных клеток. VEGFR1 может играть роль в этих процессах, или может принимать участие в указанных процессах путем связывания VEGF и представления его сигнальному рецептору, VEGFR2.

Сравнимые картины для антител человека согласно настоящему изобретению и Авастина при лечении опухолей очень важны: антитела человека согласно настоящему изобретению, по меньшей мере, так же эффективны, как и Авастин, хотя они лишь ингибируют связывание VEGF с VEGFR2, но не с VEGFR1. Настоящие исследования, следовательно, указывают на то, что VEGFR1 не играет значительной роли в опосредованном VEGF ангиогенезе опухоли и дополнительно позволяет предположить, что специфичные к VEGFR1 ингибиторы могут не влиять на ангиогенез опухоли. Эти результаты также означают, что антитела человека согласно настоящему изобретению могут быть в равной мере или более эффективными, чем Авастин, и в то же время вызывать меньшие побочные эффекты.

Способность специфично блокировать связывание VEGF и активацию VEGFR2, но не VEGFR1 (Flt-1), имеет клиническую важность. Антитела человека согласно настоящему изобретению, таким образом, блокируют ангиогенную активность VEGF, но не ингибируют другое полезное действие VEGF, опосредованное через VEGFR1, такое как влияние на некоторые иммунные клетки и клетки костей. Одна область клинической важности, таким образом, относится к способности антител человека согласно настоящему изобретению функционировать *in vivo*, не вызывая ингибирования благоприятного действия остеокластов и хондрокластов. Это означает, что применение настоящего лекарства, включающего блокирующее VEGFR2 антитело человека к VEGF, не будет связано с побочными эффектами на кость и/или хрящ.

Исследования *in vivo* показали, что VEGF связывает гипертрофическое ремоделирование хряща, окостенение и ангиогенез в процессе образования хрящевой кости и что VEGF жизненно важен для ремоделирования хряща (Gerber и др., 1999; особенно включенный в данную заявку посредством ссылки). Было показано, что инактивация передачи сигналов VEGF через VEGFR1 путем введения растворимого VEGFR1-рецепторного химерного белка (Flt-(1-3)-IgG), нарушает образование трабекулярной (губчатой) кости и распространение зоны гипертрофических хондроцитов путем уменьшения привлечения и/или дифференцировки хондрокластов (Gerber и др., 1999).

Дополнительно было показано, что VEGF может заменять колониестимулирующий фактор макрофагов (M-CSF) в поддержании функции остеокластов *in vivo* (Niida и др., 1999; специально включенный в данную заявку посредством ссылки). В исследованиях с применением склонных к остеопорозу (ор/ор) мышей с дефицитом остеокластов, возникшим в результате мутации гена M-CSF, инъекция рекомбинантного M-CSF человека (rhM-CSF) делает возможным привлечение и выживаемость остеокластов. В недавних исследованиях было показано, что одна инъекция рекомбинантного VEGF человека может аналогично индуцировать привлечение остеокластов у ор/ор мышей (Niida и др., 1999).

Niida и др. (1999) сообщали, что так как остеокласты преимущественно экспрессируют VEGFR1 и действие рекомбинантного фактора роста 1 плаценты человека на привлечение остеокластов было сравнимо с таковым для rhVEGF, благоприятное действие передачи сигналов VEGF у склонных к остеопорозу (ор/ор) мышей опосредовано через рецептор VEGF1 (VEGFR-1). Эти авторы дополнительно показали, что индуцированные rhM-CSF остеокласты погибали после того, как ингибировали VEGF (применяя химерный белок рецептора VEGFR1, VEGFR1/Fc), но что такие эффекты исчезали при сопутствующих инъекциях rhM-CSF. Остеокласты, поддерживаемые rhM-CSF или эндогенным VEGF, не проявили значительной разницы в активности *in vivo* (Niida и др., 1999).

Мутантные мыши ор/ор подвержены возрастному остеопорозу, сопровождаемому увеличением количества остеокластов. В исследованиях Niida и др. (1999) большинство остеокластов исчезало после инъекций антитела к VEGF, демонстрируя, что эндогенно продуцируемый VEGF ответственен за появление остеокластов у мутантных мышей. Вдобавок, rhVEGF заменял rhM-CSF в поддержании дифференцировки остеокластов *in vitro*. Эти результаты демонстрируют, что M-CSF и VEGF имеют перекрывающиеся функции в поддержании функции остеокластов и что VEGF действует через рецептор VEGFR-1 (Niida и др., 1999).

Таким образом, можно заключить, что блокирующие VEGFR2 антитела человека к VEGF согласно настоящему изобретению не блокируют связывание и активацию VEGFR1 посредством VEGF, но блокируют VEGF связывание и активацию VEGFR2 посредством VEGF. Противоопухолевые эффекты такого ингибирования VEGFR2 явно продемонстрированы. Эти результаты показывают, что VEGFR2 является рецептором VEGF, который опосредует проницаемость, и подчеркивают его роль в ангиогенезе опухоли.

Настоящее изобретение, следовательно, дополнительно подтверждает применение ингибирования VEGF в качестве терапии для лечения солидных опухолей. Важно отметить, что настоящее изобретение обеспечивает диапазон новых блокирующих VEGFR2 антител человека к VEGF для терапевтического вмешательства и, в частности, для применения в качестве безопасных и эффективных лекарственных препаратов для ингибирования ангиогенеза в опухолях и при других заболеваниях.

Польза настоящего изобретения не ограничена отсутствием побочных эффектов. Хотя это является

важным свойством, которое будет приносить значительную пользу, особенно при лечении детей и пациентов с поражениями костей, антитела согласно настоящему изобретению имеют многие другие преимущества.

Например, блокирующие VEGFR2 антитела человека к VEGF согласно настоящему изобретению имеют важные преимущества, состоящие в ингибировании неблагоприятного действия связанных с опухолью макрофагов. Теперь известно, что связанные с опухолью макрофаги играют важные роли при раке как на начальных стадиях развития, так и при прогрессировании и метастазировании опухоли. Ниже подробно описано, что антитела человека согласно настоящему изобретению идеально подходят для противодействия нежелательным действиям этих макрофагов.

Образование сосудистой сети опухоли и/или доступ к сосудистой сети хозяина представляет собой решающий этап в развитии злокачественных опухолей. Действительно, образование высокоплотной сосудистой сети, названной "ангиогенный переключатель", тесно связано с перерождением в злокачественное новообразование (Hanahan и Folkman, 1996). Теперь известно, что макрофаги, связанные с первичной опухолью, играют ключевую роль как в ангиогенном переключателе, так и в прогрессировании к злокачественному новообразованию (Lin и др., 2006). Более того, было показано, что ингибирование инфильтрации макрофагов в опухоли задерживает ангиогенный переключатель и злокачественное перерождение (Lin и др., 2006).

У многих пациентов, страдающих от рака, метастазирование представляет собой основную причину смерти. Инвазия опухолевых клеток из первичной опухоли в окружающую соединительную ткань и кровеносные сосуды представляет собой ключевой этап в метастатическом процессе. Ранее сообщали, что макрофаги связаны с прогрессированием и метастазированием опухоли (Lin и др., 2001). Последующие исследования показали, что взаимодействие между опухолевыми клетками и макрофагами облегчает миграцию клеток карциномы в первичную опухоль, и что этот процесс включает паракринную петлю (Wyskoff и др., 2004; Goswami и др., 2005).

Более того, теперь известно, что инфильтрирующие опухоль или связанные с опухолью макрофаги выступают в различном микроокружении опухоли, включая области инвазии, области стромы и периваскулярные области и аваскулярный и перинекротические области. Действие макрофагов в каждом из этих микроокружений опухоли стимулирует прогрессирование и метастазирование опухоли путем активации подвижности раковых клеток, метастазирования и ангиогенеза соответственно (Lewis и Pollard, 2006). Следовательно, макрофаги недавно стали важной мишенью в борьбе против рака (Condeelis и Pollard, 2006).

В этом отношении антитела человека согласно настоящему изобретению имеют важные преимущества, так как они блокируют активацию VEGFR2 и, таким образом, уменьшают инфильтрацию макрофагов в опухоли, и могут, следовательно, уменьшать перерождение в злокачественное новообразование, прогрессирование и/или метастазирование опухоли. Это подтверждается результатами исследований на животных, представленных в данной заявке, демонстрирующих, что связанные с опухолью макрофаги экспрессируют VEGFR2, и что VEGFR2 опосредует индуцированный VEGF хемотаксис этих клеток. В данной заявке также было показано, что избирательная блокада VEGFR2, вызванная антителами человека согласно настоящему изобретению, оказывает эффективное противораковое действие. Это противораковое действие сопровождается снижением инфильтрации макрофагов в опухоль, указывая на то, что избирательное блокирование взаимодействия VEGF-VEGFR2 в макрофагах хозяина вносит вклад в наблюдаемые терапевтические эффекты.

Блокирующие VEGFR2 антитела человека к VEGF согласно настоящему изобретению также имеют преимущества, связанные со снижением плотности лимфатических сосудов в опухолях. Вдобавок к выходу опухолевых клеток в кровеносные сосуды опухоли метастазированию способствует лимфоангиогенез, т.е. рост новых внутриопухолевых или околоопухолевых лимфатических сосудов из существовавших ранее сосудов. Действительно, в нескольких типах рака, включая рак молочной железы, полагают, что уход опухолевых клеток через лимфатическую систему является доминирующим средством, с помощью которого злокачественные клетки из первичной опухоли дают рост в удаленных областях.

В течение нескольких лет считалось, что лимфоангиогенез, главным образом, индуцируется VEGF-C и/или VEGF-D. Тем не менее, теперь накопилась совокупность доказательств участия VEGF-A в лимфоангиогенезе. Более того, недавние исследования показали, что антитела мыши к VEGF-A являются эффективными для ингибирования лимфоангиогенеза и метастазирования опухоли *in vivo* (Whitehurst и др., 2007).

В данной заявке представлены результаты, показывающие, что блокирующие VEGFR2 антитела человека к VEGF согласно настоящему изобретению действительно уменьшают плотность лимфатических сосудов опухоли (фиг. 18A, 18B и 18C). Антитела человека согласно настоящему изобретению, следовательно, ингибируют лимфоангиогенез опухоли и обеспечивают дополнительную пользу, состоящую в снижении метастазирования через лимфатический путь, а также в ингибировании ангиогенеза и метастатического ухода через кровеносные сосуды опухоли. Следовательно, можно видеть, что антитела человека согласно настоящему изобретению имеют способность уменьшать метастазирование или метастатические явления посредством нескольких аспектов вмешательства.

Более того, результаты, представленные на фиг. 18А, показывают, что антитела согласно настоящему изобретению уменьшают плотность лимфатических сосудов опухоли, что измеряли по снижению количества подоплатина и PROX1. Так как подоплатин является маркером рака мягких тканей, таких как хондросаркома, и лимфатических опухолей, таких как саркома фолликулярных дендритных клеток (Xie и др., 2008), и так как PROX1 участвовал в прогнозировании инвазивности рака толстой кишки (Petrova и др., 2008), это придает особое значение применению блокирующих VEGFR2 антител человека к VEGF согласно настоящему изобретению для лечения этих конкретных заболеваний.

Дополнительным полезным свойством, проявляемым блокирующими VEGFR2 антителами человека к VEGF согласно настоящему изобретению, является способность значительно уменьшать инфильтрацию или привлечение супрессорных клеток миелоидного происхождения, а именно CD11b+/Gr1+ клеток, в опухоли. Более того, это свойство не проявляется антителом 2C3 и проявляется лишь на гораздо сниженном уровне Авастином. Предпочтительные антитела согласно настоящему изобретению могут уменьшать инфильтрацию или привлечение CD11b+/Gr1+ клеток в опухоли (например, уменьшать количество клеток, положительных по обоим маркерам, присутствующих в опухоли) на 30% или более, предпочтительно на 32, 34, 36, 38% или более по сравнению с контрольным уровнем (например, в опухоли, которую лечили, или опухоли, которую лечили контрольным антителом).

Таким образом, дополнительные исследования на мышах-опухоленосителях MDA-MB-231 показали, что значительно меньшее количество положительных по двум маркерам CD11b/Gr1 клеток инфильтрируют опухоли у животных, которых лечили r84, в противоположность контрольным животным. В сравнительных исследованиях ни антитело 2C3, ни Авастин не проявили статистически значимого уменьшения инфильтрации CD11b+/Gr1+, хотя некоторое снижение можно было измерить у животных, которых лечили Авастином. Снижение количества положительных по двум маркерам клеток, которое наблюдалось, составляло 39% (фиг. 25).

Пониженная инфильтрация супрессорных клеток миелоидного происхождения CD11b+/Gr1+ представляет особый интерес, так как клетки, экспрессирующие оба маркера, недавно связывали с опосредованием рефрактерности опухоли к терапии, направленной против VEGF (Shojaei и др., 2007). Супрессорные клетки миелоидного происхождения (CD11b+/Gr1+) также являются важными участниками прогрессирования опухоли. В микроокружении опухоли эти клетки секретируют иммуносупрессорные медиаторы и индуцируют дисфункцию Т-лимфоцитов (Gabrilovich и др., 2001; Serafini и др., 2004).

Так как CD11b+/Gr1+ клетки связаны с рефрактерностью опухоли к терапии, направленной против VEGF, и участвуют в прогрессировании опухоли, действие антител согласно настоящему изобретению, приводящее к уменьшению инфильтрации этих клеток в опухоли, явно имеет потенциальную важность для терапевтических применений антител согласно настоящему изобретению, а именно терапевтических применений, связанных с лечением ангиогенных заболеваний, включая рак.

Действительно, так как результаты в данной заявке показали, что инфильтрация опухоли CD11b+/Gr1+ клетками маловыражена/значительно ниже у животных, которых лечили антителами согласно настоящему изобретению, это позволяет предположить, что лечение антителами согласно настоящему изобретению, вероятно, в меньшей степени способствует развитию резистентности к лекарственным препаратам или рефрактерности к терапии, направленной против VEGF, чем лечение другими лекарственными препаратами, нацеленными на VEGF, например другими антителами к VEGF. Вдобавок, учитывая предложенную роль CD11b+/Gr1+ клеток в прогрессировании опухоли, способность антител согласно настоящему изобретению уменьшать инфильтрацию или привлечение таких клеток в опухоли вполне может являться частью механизма, вовлеченного в противоопухолевую активность, например в ингибирование опухолевого роста, проявленного антителами согласно настоящему изобретению.

Также было показано, что блокирующие VEGFR2 антитела человека к VEGF согласно настоящему изобретению не вызывают токсичность при длительном введении в модели на мышах *in vivo*.

Блокирующие VEGFR2 антитела человека к VEGF согласно настоящему изобретению предпочтительно имеют полезное свойство связывания с VEGF мыши и VEGF человека. Способность связывать VEGF мыши представляет собой важное преимущество перед антителами 2C3 и Авастином.

Вдобавок, конъюгаты антител, основанные на блокирующих VEGFR2 антителах человека к VEGF согласно настоящему изобретению, можно применять для доставки терапевтических агентов в опухолевое окружение, тогда как многие другие антитела к VEGF - нельзя. Антитела человека согласно настоящему изобретению связываются как с сосудистой сетью опухоли, так и со стромой опухоли при введении *in vivo*, но не связываются с сосудистой сетью или соединительной тканью в нормальных органах или тканях. Терапевтические конструкции, основанные на антителах человека согласно настоящему изобретению, следовательно, имеют преимущество, состоящее в том, что они объединяют две функции в одной молекуле: антиангиогенные свойства антитела или его фрагмента и свойства терапевтического агента, выбранного для присоединения. Таким образом, антитело человека согласно настоящему изобретению можно применять как в качестве антиангиогенного агента, так и в качестве нацеленного на сосуды агента, тогда как многие антитела к VEGF из известного уровня техники нельзя применять для нацеливания на сосуды.

Так как VEGFR2 является ключевым рецептором на эндотелии, блокирование связывания VEGF с

VEGFR2 важно для антиангиогенного эффекта. Хотя VEGFR1 экспрессируется на эндотелии, он не участвует в передаче сигнала, или является пассивным в данном контексте. Следовательно, неспособность антител человека согласно настоящему изобретению блокировать связывание VEGF с VEGFR1 не оказывает влияния на их эффективность как антиангиогенных и противоопухолевых агентов. Фактически вместо ингибирования связывания VEGF с VEGFR1, которое осуществляют блокирующие антитела из известного уровня техники, способность настоящих антител человека связываться с VEGF и при этом, по существу, не нарушать взаимодействия VEGF-VEGFR1 улучшает свойства этих новых антител в отношении доставки лекарственных препаратов.

Авторы настоящего изобретения понимают, что следует ожидать, что блокирующие антитела будут доставлять терапевтические агенты в опухолевое окружение путем связывания с локализованным в опухоли VEGF, который не связан с рецептором. В частности, они понимают, что такие антитела человека будут связываться с VEGF в строме опухоли и доставлять туда терапевтические агенты. Это обеспечивает скопление лекарственного препарата вокруг эндотелия, оказывая цитотоксические или другие разрушающие эффекты на эндотелиальные клетки сосудов и оказывая противоопухолевый эффект.

VEGF, связанный со стромой или соединительной тканью, не является связанным с рецептором VEGF в классическом смысле, т.е. с рецептором клеточной поверхности. Скорее, VEGF связан с одним или более компонентами соединительной ткани, включая протеоглики, такие как гепарансульфатпротеогликан, через основной участок VEGF. Эти последовательности (и экзоны, кодирующие их) отсутствуют в белке VEGF121 (и в кодирующей его ДНК), так что эта изоформа не должна присутствовать в строме в значительных количествах. VEGF в строме опухоли часто называют "свободным", хотя он локализован внутри опухоли, так что "свободный", по существу, означает не связанный с рецептором.

Авторы настоящего изобретения дополнительно установили, что антитело человека, которое блокирует связывание VEGF с одним, но не с обоими рецепторами, сможет доставлять терапевтические агенты в опухолевое окружение посредством связывания со связанным с рецептором VEGF на сосудистой сети. Это является одним из полезных свойств настоящего изобретения. А именно, введение антител человека, которые блокируют связывание VEGF с VEGFR2, и, следовательно, ингибируют ангиогенный сигнал от VEGF, но которые не блокируют связывание VEGF с VEGFR1. Вдобавок к снижению системных побочных эффектов, посредством сохранения передачи сигналов VEGF через VEGFR1 в других типах клеток и тканях, эти антитела человека способны локализоваться в комплексе VEGF-VEGFR1 на сосудистой сети опухоли и для доставки терапевтических агентов непосредственно к ним.

Как VEGFR1, так и VEGFR2 чрезмерно экспрессируются на эндотелиальных клетках опухоли в противоположность эндотелиальным клеткам в нормальных тканях. VEGFR1 сильно экспрессируется на сосудистом эндотелии опухоли, что делает аспекты нацеливания согласно настоящему изобретению особенно эффективными. Фактически VEGFR1, хотя он "не участвует в передаче сигналов" в эндотелии, он экспрессируется, по меньшей мере, на тех же уровнях, что и VEGFR2, если не на более высоких уровнях. Фактор, вызывающий этот феномен, состоит в том, что VEGFR1 чрезмерно экспрессируется в ответ как на гипоксию, так и на VEGF, тогда как VEGFR2 чрезмерно экспрессируется лишь в ответ на VEGF и на него не влияет гипоксия.

Хотя роль VEGFR1 на эндотелии остается до конца не известной, VEGFR1 может действовать как рецептор-приманка, чтобы "захватить" VEGF и передать лиганд на сигнальный рецептор, VEGFR2. Чтобы это оказалось правдой, следует ожидать, что рецептор-приманка имеет более высокую аффинность к VEGF, чем сигнальный рецептор, что действительно имеет место. В свете этого и, возможно, также вследствие повышенных уровней экспрессии блокирующие VEGFR2, не блокирующие VEGFR1 антитела человека согласно настоящему изобретению представляют собой идеальные доставляющие агенты для лечения опухоли. Терапевтические конъюгаты этих антител способны одновременно ингибировать ангиогенез посредством VEGFR2 и разрушить существующую сосудистую сеть благодаря доставке терапевтического агента в комплекс VEGF-рецептор VEGFR1.

Авторы настоящего изобретения ни в коей мере не ограничиваются предшествующим научным рассуждением как объяснением пользы антиангиогенных и ограничивающих распространение опухоли свойств настоящих антител человека. Хотя польза настоящего изобретения сама собой очевидна и не требует лежащей в ее основе теории для применения на практике, авторы настоящего изобретения рассмотрели альтернативные механизмы, с помощью которых блокирующие VEGFR2, не блокирующие VEGFR1 антитела человека могут эффективно и специфично локализоваться в сосудистой сети опухоли.

Такие антитела человека могут связываться с VEGF, который связан с другим известным или до сих пор неохарактеризованным белком, связывающим VEGF, на поверхности клеток или могут связываться с VEGF, который связан с гепарансульфатпротеогликанами на поверхности эндотелиальных клеток. Локализацию антитела также можно повысить с помощью связывания с другими членами семейства белков VEGF, т.е. VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, которые связаны с кровеносными сосудами, хотя это менее вероятно.

Другое полезное свойство блокирующих VEGFR2 антител человека к VEGF согласно настоящему изобретению состоит в том, что эти антитела нейтрализуют сигнал выживания или "протективный эффект" VEGF, который опосредован через VEGFR2. Вдобавок к тому, что это делает антитела человека

более эффективными сами по себе, это свойство делает их особенно полезными в комбинации с другими агентами, действие которых затруднено функцией выживаемости, опосредованной VEGF.

Например, VEGF защищает эндотелий от лучевой терапии. Следовательно, как изолированные антитела, так и иммуноконъюгаты согласно настоящему изобретению идеальны для применения в комбинации с лучевой терапией. Еще большая польза обеспечивается применением такого антитела человека, присоединенного к радиотерапевтическому агенту. Этот тип конструкции будет иметь тройное преимущество, так как он (1) оказывает антиангиогенный эффект через молекулу антитела; (2) оказывает разрушающий эффект на сосудистую сеть опухоли посредством доставки радиотерапевтического агента и (3) предотвращает противодействие типичного сигнала выживания VEGF действию радиотерапевтического агента.

Другие конструкции с аналогичными синергическими эффектами представляют собой блокирующие VEGFR2 антитела человека к VEGF, связанные с антитубулиновыми лекарственными препаратами или пролекарствами, антиапоптотическими агентами и другими антиангиогенными агентами. Действия агентов или лекарственных препаратов, которые вызывают апоптоз, антагонизируются VEGF. Настоящее изобретение, следовательно, улучшает эффективность таких агентов путем нейтрализации VEGF. Сигналы выживания VEGF также противодействуют эндостатину, ограничивая подобную терапию. Следовательно, в комбинированном применении с эндостатином блокирующие VEGFR2 антитела человека к VEGF согласно настоящему изобретению будут нейтрализовать VEGF и усиливать противоопухолевые эффекты эндостатина. Блокирующие VEGFR2 антитела человека к VEGF также можно применять для специфичной доставки коллагеназы в опухоль, в которой коллагеназа будет продуцировать эндостатин *in situ*, достигая аналогичной пользы.

Во всех таких усиленных или синергических комбинациях антитела человека и другие агенты можно вводить отдельно, или второй агент может быть связан с антителами человека для специфичной доставки (т.е. направленной доставки к VEGFR1). В комбинациях с эндостатином, химические конъюгаты или рекомбинантные слитые белки будут предпочтительны, так как они будут противодействовать короткому времени полужизни эндостатина, которое в настоящее время является ограничением потенциальной терапии эндостатином. Также можно применять комбинации или нацеленные формы с тканевым активатором плазминогена (tPA).

Дополнительные преимущества человеческих лекарственных средств согласно настоящему изобретению включают их способность понижать тканевое давление. Так как опосредованная VEGF повышенная проницаемость вносит вклад в тканевое давление, пониженная передача сигналов через VEGFR2 будет уменьшать как проницаемость, так и тканевое давление. Это, в свою очередь, уменьшит барьер для перемещения лекарственных препаратов по всему объему опухолевой ткани, таким образом, что опухолевые клетки, отдаленные от сосудистой сети, могут быть уничтожены. Длительной терапии также можно достигнуть, так как настоящие композиции не будут проявлять или будут проявлять незначительную или низкую иммуногенность.

**В3. Последовательности гипервариабельных участков антитела.**

Термин "вариабельный" в данной заявке в отношении антител означает, что некоторые части вариабельных доменов сильно отличаются по последовательности среди антител, и используются для связывания и специфичности каждого конкретного антитела к конкретному антигену. Тем не менее, вариабельность не равномерно распределена по всем вариабельным доменам антител. Она сконцентрирована в трех фрагментах, названных "гипервариабельными участками", в вариабельных доменах как легкой цепи, так и тяжелой цепи.

Наиболее высококонсервативные части вариабельных доменов названы каркасной областью (FR). Каждый из вариабельных доменов нативных тяжелых и легких цепей включает четыре FR (FR1, FR2, FR3 и FR4 соответственно), в основном принимающих  $\beta$ -складчатую конфигурацию, соединенные тремя гипервариабельными участками, которые образуют петли, соединяющие и в некоторых случаях формирующие часть  $\beta$ -складчатой структуры.

Гипервариабельные участки в каждой цепи удерживаются вместе в непосредственной близости с помощью FR и вместе с гипервариабельными участками другой цепи участвуют в образовании сайта связывания антигена в молекуле антитела (Kabat и др., 1991, специально включенный в данную заявку посредством ссылки). Константные области не участвуют непосредственно в связывании антитела с антигеном, но проявляют различные эффекторные функции, такие как участие антитела в антитело-зависимой клеточной токсичности.

Термин "гипервариабельный участок" в данной заявке относится к аминокислотным остаткам антитела, которые ответственны за связывание антигена. Гипервариабельный участок включает аминокислотные остатки из "области, определяющей комплементарность" или "CDR" (т.е. остатки 24-34 (L1), 50-56 (L2) и 89-97 (L3) в вариабельном домене легкой цепи и 31-35 (H1), 50-56 (H2) и 95-102 (H3) в вариабельном домене тяжелой цепи; Kabat и др., 1991, специально включенный в данную заявку посредством ссылки) и/или остатки из "гипервариабельной петли" (т.е. остатки 26-32 (L1), 50-52 (L2) и 91-96 (L3) в вариабельном домене легкой цепи и 26-32 (H1), 53-55 (H2) и 96-101 (H3) в вариабельном домене тяжелой

цепи). "Каркасные" или "FR" остатки представляют собой такие остатки вариабельного домена, которые отличны от остатков гипервариабельного участка, определенного в данной заявке.

ДНК и установленные последовательности аминокислот VH и VL цепей фрагмента ScFv r84 предусмотрены в данной заявке в последовательностях SEQ ID NO: 1 (VH, нуклеиновые кислоты), SEQ ID NO: 2 (VL, нуклеиновые кислоты) SEQ ID NO: 3 (VH, аминокислоты) и SEQ ID NO: 4 (VL, аминокислоты). Последовательности ДНК VH и VL цепей полноразмерного IgG r84 предусмотрены в данной заявке в последовательностях SEQ ID NO: 26 (VH, нуклеиновые кислоты) и SEQ ID NO: 27 (VL, нуклеиновые кислоты). Эти последовательности включают гипервариабельный участок CDR1-3 вариабельных областей тяжелых и легких цепей антитела.

В данной заявке (раздел С7) описано вместе с предоставлением структурных и функциональных сведений о биологической молекуле, что можно получить диапазон эквивалентных или еще более улучшенных молекул. Это распространяется на блокирующие VEGFR2 антитела человека к VEGF согласно настоящему изобретению, примером которых является антитело r84. Хотя антигенсвязывающие и другие функциональные свойства антитела должны быть консервативны, чрезвычайно высоким мастерством в данной области является получение эквивалентных и еще более улучшенных антител, как только было получено эталонное антитело. Такой технический навык в свете последовательностей и сведений, приведенных в данной заявке, можно применять для получения дополнительных антител, которые имеют подобные, улучшенные или иные желательные свойства.

Для эквивалентных антител, некоторые аминокислоты могут быть замещены на другие аминокислоты в каркасных областях константного или вариабельного домена антитела без заметной потери связывающей способности. Предпочтительно, чтобы такие изменения были сделаны в последовательностях ДНК, кодирующих участки антител, и чтобы эти изменения были консервативными по природе (см. раздел С7, сведения о кодонах в табл. А и вспомогательные технические подробности относительно сайт-специфичного мутагенеза). Естественно, существует предел количества изменений, которые следует внести, но это должно быть очевидно для рядовых специалистов в данной области техники.

Другие типы вариантов представляют собой антитела с улучшенными биологическими свойствами относительно родительского антитела, из которого их получили. Такие варианты или соединения второго поколения обычно представляют собой содержащие заместители варианты, включающие один или более замещенных остатков в гипервариабельном участке родительского антитела. Удобным способом для получения таких содержащих заместители вариантов является аффинное созревание с применением фагового дисплея.

При аффинном созревании с применением фагового дисплея, несколько сайтов гипервариабельного участка (например, 6-7 сайтов) мутируют, чтобы получить все возможные аминокислотные замены в каждом сайте. Варианты антитела, полученные таким образом, воспроизводят в моновалентном виде из частиц нитевидного фага в виде слитого с геном III продукта M13 виде, упакованном в каждую частицу. Затем проводят скрининг воспроизведенных в фаге вариантов на их биологическую активность (например, аффинность связывания), как описано в данной заявке. Чтобы идентифицировать кандидатные сайты в гипервариабельном участке для модификации, можно осуществить аланин-сканирующий мутагенез, чтобы идентифицировать остатки в гипервариабельном участке, вносящие значительный вклад в связывание антигена.

В качестве альтернативы или дополнения предполагается, что кристаллическая структура комплекса антиген-антитело была установлена и проанализирована, чтобы идентифицировать точки контактов между антителом и VEGF. Такие контактирующие остатки и близлежащие остатки являются кандидатами на замену. Как только были получены такие варианты, набор вариантов подвергали скринингу, описанному в данной заявке, и антитела с аналогичными, но отличными или еще лучшими свойствами в одном или более подходящих тестах выбирали для дополнительного улучшения.

Дополнительные аспекты настоящего изобретения, следовательно, относятся к выделенным или очищенным фрагментам ДНК и рекомбинантным векторам, кодирующим гипервариабельные участки тяжелых и легких цепей блокирующего VEGFR2 антитела человека к VEGF согласно настоящему изобретению, такие как тяжелые и легкие цепи r84, и созданию и применению рекомбинантных клеток-хозяев посредством применения технологии ДНК, которые экспрессируют такие гипервариабельные участки.

Настоящее изобретение, таким образом, относится к человеческим или синтетическим фрагментам ДНК, которые свободны от суммарной геномной ДНК и способны экспрессировать гипервариабельные участки тяжелых и/или легких цепей блокирующего VEGFR2 антитела человека к VEGF согласно настоящему изобретению, таких как тяжелые и/или легкие цепи r84. В данной заявке термин "фрагмент ДНК" относится к молекуле ДНК, которую выделили или очистили, чтобы она была свободна от суммарной геномной ДНК конкретных видов. В термин "фрагмент ДНК" включены фрагменты ДНК и меньшие фрагменты таких фрагментов, а также рекомбинантные векторы, включая, например, плазмиды, космиды, фаг, вирусы, и т.п.

Аналогично, фрагмент ДНК, включающий кодирующий фрагмент или выделенную или очищенную часть гена, кодирующего очищенные гипервариабельные участки тяжелых и/или легких цепей блоки-

рующего VEGFR2 антитела человека к VEGF согласно настоящему изобретению, такие как тяжелые и/или легкие цепи г84, относится к фрагменту ДНК, включающему такие кодирующие последовательности, и в некоторых аспектах регуляторные последовательности, которые были, по существу, выделены или очищены от других встречающихся в природе генов или кодирующих белки последовательностей. В этом отношении термин "ген" применяется для упрощения для обозначения соединения, кодирующего функциональный белок, полипептид или пептид. Для специалиста в данной области техники очевидно, что этот функциональный термин включает нативные кодирующие антитело последовательности и меньшие сконструированные фрагменты, которые экспрессируют или могут быть приспособлены для экспрессии подходящих антигенсвязывающих белков, полипептидов или пептидов.

"По существу, выделенные или очищенные от других кодирующих последовательностей" означает, что кодирующий фрагмент или интересующая выделенная часть гена образует значительную часть кодирующего участка фрагмента ДНК, и что указанный фрагмент ДНК не включает большие участки встречающихся в природе кодирующих ДНК, таких как большие фрагменты хромосом или другие функциональные гены или кодирующие кДНК участки. Конечно, это относится к фрагменту ДНК в исходно выделенном виде, и не исключает гены или кодирующие участки, добавленные позже к указанному фрагменту рукой человека.

В отдельных вариантах реализации, настоящее изобретение относится к выделенным или очищенным кодирующим фрагментам или выделенным или очищенным частям гена и рекомбинантным векторам, включающим последовательности ДНК, которые кодируют гипервариабельные участки тяжелых и/или легких цепей блокирующего VEGFR2 антитела человека к VEGF согласно настоящему изобретению, такие как тяжелые и/или легкие цепи г84, которые включают, по меньшей мере, первый участок последовательности, который включает участок последовательности аминокислот, имеющий по меньшей мере приблизительно 75%, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 80%, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 85%, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 90% и наиболее предпочтительно по меньшей мере приблизительно 95% или подобную идентичность последовательности аминокислот с последовательностью аминокислот, указанной в SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4; при этом указанные гипервариабельные участки, по меньшей мере, по существу, сохраняют биологические свойства гипервариабельных участков последовательностей аминокислот SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4.

В данной заявке описано, что последовательности могут включать некоторые биологически функциональные эквивалентные аминокислоты или "консервативные замены". Другие последовательности могут включать функционально неэквивалентные аминокислоты или "неконсервативные замены", преднамеренно сконструированные для улучшения свойств гипервариабельного участка или антитела, включающего гипервариабельный участок, что известно рядовым специалистам в данной области техники и дополнительно описано в данной заявке.

Также очевидно, что последовательности аминокислот и нуклеиновых кислот могут включать дополнительные остатки, такие как дополнительные N- или C-концевые аминокислоты или 5'- или 3'-последовательности и все еще соответствовать последовательности согласно настоящему изобретению, при условии, что указанная последовательность удовлетворяет критериям, описанным выше, предпочтительно включая сохранение или улучшение биологической активности белка, если затронута экспрессия белка. Добавление концевых последовательностей включает различные не кодирующие последовательности, фланкирующие любую из 5'- или 3'-частей кодирующего участка, а также контролирующие участки.

Фрагменты нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению, следовательно, можно комбинировать с другими последовательностями ДНК, такими как промоторы, сигналы полиаденилирования, дополнительные сайты для рестрикционных ферментов (рестриктаз), сайты множественного клонирования, другие кодирующие фрагменты и т.п., таким образом, что их общая длина может значительно варьироваться. Следовательно, предполагается, что можно использовать фрагмент нуклеиновой кислоты почти любой длины, при этом общая длина предпочтительно ограничена легкостью получения и применения в предполагаемом протоколе технологии рекомбинантной ДНК.

Рекомбинантные векторы, следовательно, образуют дополнительные аспекты настоящего изобретения. Предполагается, что особенно полезными векторами являются такие векторы, в которых кодирующая часть фрагмента ДНК находится под контролем промотора. Как правило, хотя не исключительно, будет применяться рекомбинантный или гетерологичный промотор, т.е. промотор, обычно не связанный с кодирующими последовательностями в их природном окружении. Такие промоторы могут включать бактериальный, вирусный, эукариотический промоторы и промоторы млекопитающего, при условии, что указанный промотор эффективно направляет экспрессию фрагмента ДНК в типе клеток, организме или даже животном, выбранном для экспрессии.

Применение комбинаций промотора и типа клеток для белковой экспрессии известно специалистам в области молекулярной биологии. Используемые промоторы могут быть конститутивными или индуцибельными и их можно применять при подходящих условиях, чтобы направлять высокий уровень экспрессии введенного фрагмента ДНК, который предпочтителен для крупномасштабного получения ре-

комбинантных белков или пептидов.

Экспрессии последовательностей нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению можно удобно достигнуть с помощью любой одной или более стандартных методик, известных рядовым специалистам в данной области техники и дополнительно описанных в данной заявке. Например, дальнейшее описание рекомбинантной экспрессии слитых белков относится в равной мере к антителам и фрагментам антител, которые не связаны функционально с другими кодирующими последовательностями на уровне нуклеиновых кислот.

#### В4. Антитела из фагмидных библиотек.

Рекомбинантная технология теперь позволяет получение антител, имеющих желательную специфичность, из рекомбинантных генов, кодирующих диапазон антител (Van Dijk и др., 1989; включен в данную заявку посредством ссылки). Некоторые рекомбинантные методики включают выделение генов антитела с помощью иммунологического скрининга комбинаторных библиотек экспрессии иммуноглобулина в фаге, полученных из РНК, выделенных из селезенки иммунизированного животного (Mortison и др., 1986; Winter и Milstein, 1991; каждый из которых включен в данную заявку посредством ссылки).

Для таких способов, комбинаторные фагмидные библиотеки иммуноглобулинов получают из РНК, выделенной из селезенки иммунизированного животного, и фагмиды, экспрессирующие подходящие антитела, отбирают путем пеннинга, используя клетки, экспрессирующие антиген, и контрольные клетки. Преимущества этого подхода над обычными гибридомными методиками состоят в том, что можно получить приблизительно в  $10^4$  раз больше антител и осуществить скрининг одним раундом, и что получают новые специфичности с помощью комбинаций H и L цепей, что дополнительно увеличивает процент полученных подходящих антител.

Одним способом получения большого репертуара разнообразных молекул антител в бактериях является использование бактериофага лямбда в качестве вектора (Huse и др., 1989; включен в данную заявку посредством ссылки). Получение антител с применением  $\lambda$ -вектора включает клонирование последовательностей ДНК популяций тяжелых и легких цепей в отдельные исходные векторы. Указанные векторы затем произвольно комбинируют с получением одного вектора, который направляет совместную экспрессию тяжелых и легких цепей с получением фрагментов антител. Последовательности ДНК тяжелых и легких цепей получают путем амплификации, предпочтительно с помощью ПЦР™ или аналогичных методик амплификации, мРНК, выделенной из клеток селезенки (или их гибридом) из животного, которое было иммунизировано выбранным антигеном. Последовательности тяжелых и легких цепей обычно амплифицируют, применяя праймеры, которые вводят сайты рестрикции в концы амплифицируемых фрагментов ДНК, чтобы облегчить клонирование фрагментов тяжелых и легких цепей в исходные векторы.

Другой способ получения и скрининга больших библиотек полностью или частично синтетических антигенсвязывающих активных центров антитела, или паратопов, включает использование векторов для дисплея, полученных из нитевидного фага, такого как M13, f1 или fd. Эти векторы для дисплея в нитевидном фаге, называемые "фагмидами", позволяют получить большие библиотеки моноклональных антител, имеющих разнообразные и новые иммуносpezifичности. В указанной технологии применяется мембранный якорный домен белка оболочки нитевидного фага как средство связывания продукта гена и гена во время стадии сборки в процессе репликации нитевидного фага, и ее применяли для клонирования и экспрессии антител из комбинаторных библиотек (Kang и др., 1991; Barbas и др., 1991; каждый из которых включен в данную заявку посредством ссылки).

Эта основная методика дисплея в нитевидном фаге описана в патенте США № 5658727, включенном в данную заявку посредством ссылки. В наиболее общем смысле указанный способ обеспечивает систему для одновременного клонирования и скрининга заранее выбранных специфичностей связывания лиганда из репертуаров генов антител с применением одной векторной системы. Скрининг выделенных элементов библиотеки на заранее выбранную способность связывания лиганда обеспечивает корреляцию способности связывания экспрессированной молекулы антитела с удобными средствами для выделения гена, который кодирует указанный элемент библиотеки.

Сочетание экспрессии и скрининга осуществляют с помощью комбинирования нацеливания слитого полипептида в периплазму бактериальной клетки, чтобы произвести сборку функционального антитела, и нацеливания слитого полипептида на оболочку частицы нитевидного фага во время сборки фага, чтобы обеспечить удобный скрининг интересующего элемента библиотеки. Периплазматическое нацеливание обеспечивается присутствием домена сигнала секреции в слитом полипептиде. Нацеливание на фаговую частицу обеспечивается присутствием мембранного якорного домена белка оболочки нитевидного фага (т.е. полученного из  $\text{cpIII}$ - или  $\text{cpVIII}$ -мембранного якорного домена) в слитом полипептиде.

Многообразие основанной на нитевидном фаге комбинаторной библиотеки антител можно повысить с помощью перетасовки генов тяжелых и легких цепей, путем изменения одной или более областей, определяющих комплементарность, клонированных генов тяжелых цепей из библиотеки, или путем введения неспецифических мутаций в библиотеку с помощью полимеразных цепных реакций пониженной точности. Дополнительные способы скрининга фагмидных библиотек описаны в патентах США №№



5580717; 5427908; 5403484 и 5223409, каждый из которых включен в данную заявку посредством ссылки.

Был разработан другой способ скрининга больших комбинаторных библиотек антител, в котором использовалась экспрессия популяций разнообразных последовательностей тяжелых и легких цепей на поверхности нитевидного бактериофага, такого как M13, f1 или fd (патент США № 5698426; включен в данную заявку посредством ссылки). Две популяции разнообразных последовательностей тяжелых (Hc) и легких (Lc) цепей синтезировали с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР<sup>TM</sup>). Эти популяции клонировали в отдельный основанный на M13 вектор, включающий необходимые для экспрессии элементы. Вектор с тяжелой цепью включает ген VIII (gVIII) белковой последовательности оболочки, так что трансляция последовательностей тяжелых цепей позволит получить слитые белки gVIII-Hc. Популяции двух векторов произвольно комбинируют таким образом, что лишь части векторов, включающие последовательности Hc и Lc, соединятся в один кольцевой вектор.

Объединенный вектор направляет совместную экспрессию обеих последовательностей Hc и Lc для сборки двух полипептидов и поверхностной экспрессии на M13 (патент США № 5698426; включен в данную заявку посредством ссылки). На этапе объединения произвольно соединяются различные последовательности, кодирующие Hc и Lc в двух разнообразных популяциях, в один вектор. Последовательности вектора, заимствованные из каждого независимого вектора, необходимы для получения жизнеспособного фага. Вдобавок, так как ложные последовательности gVIII включены лишь в один из двух исходных векторов, совместная экспрессия функциональных фрагментов антител в виде Lc-связанных gVIII-Hc слитых белков не может осуществиться на поверхности фага до тех пор, пока последовательности вектора не связаны в одном векторе.

Поверхностную экспрессию библиотеки антител осуществляют в амбер-супрессорном штамме. Амбер-терминирующий кодон между последовательностью Hc и последовательностью gVIII разъединяет два указанных компонента в несупрессорном штамме. Выделение фага, полученного из несупрессорного штамма, и инфицирование супрессорного штамма позволит соединить последовательности Hc с последовательностью gVIII в процессе экспрессии. Культивирование супрессорного штамма после инфекции обеспечивает совместную экспрессию на поверхности M13 всех видов антител в библиотеке в виде gVIII-слитых белков (gVIII-Fab слитых белков). В качестве альтернативы ДНК может быть выделена из несупрессорного штамма и затем введена в супрессорный штамм, чтобы достигнуть такого же эффекта.

Проводят скрининг библиотеки с поверхностной экспрессией на специфичные Fab-фрагменты, которые связываются с заранее выбранными молекулами, с помощью стандартных процедур аффинного выделения. Такие способы включают, например, процедуры пеннинга (Parmley и Smith, 1988; включен в данную заявку посредством ссылки), аффинной хроматографии и твердофазного блоттинга. Пеннинг является предпочтительным, так как он позволяет осуществить скрининг высоких титров фага легко, быстро и в небольших объемах. Более того, эта процедура позволяет отобрать малые виды Fab-фрагментов из популяции, которые иначе могут быть недетектируемы, и позволяет амплифицировать их, по существу, в гомогенные популяции. Отобранные Fab-фрагменты можно описать путем секвенирования нуклеиновых кислот, кодирующих полипептиды, после амплификации популяции фагов.

Другой способ получения разнообразных библиотек антител и скрининга желательных специфичностей связывания описан в патентах США №№ 5667988 и 5759817, каждый из которых включен в данную заявку посредством ссылки. Указанный способ включает получение библиотек гетеродимерных молекул иммуноглобулинов в виде фагмидных библиотек, с применением вырожденных олигонуклеотидов и реакций удлинения праймеров, чтобы ввести вырождения в гипервариабельные участки вариабельных доменов тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов и воспроизвести мутированные полипептиды на поверхности фагмиды. Впоследствии проводят скрининг воспроизведенного белка на способность связываться с заранее выбранным антигеном.

Способ получения гетеродимерной молекулы иммуноглобулина, как правило, включает (1) введение гена, кодирующего интересующий V-участок тяжелой или легкой цепи, в фагмидный вектор для дисплея; (2) введение рандомизированного сайта связывания в воспроизведенный в фагмиде белковый вектор путем удлинения праймеров с помощью олигонуклеотида, включающего участки гомологии с геном гипервариабельного участка, V-участка антитела, и включающего участки вырожденности для получения рандомизированных кодирующих последовательностей, с получением большой популяции векторов для дисплея, каждый из которых способен экспрессировать различные предполагаемые сайты связывания, воспроизведенные на белке поверхностного дисплея фагмиды; (3) экспрессирование белка дисплея и сайта связывания на поверхности частицы нитевидного фага и (4) выделение (скрининг) фаговой частицы с экспрессированным на поверхности белком, применяя аффинные методики, такие как пеннинг фаговых частиц против заранее выбранного антигена, тем самым позволяя выделить один или более видов фагмид, включающих белок дисплея, включающий сайт связывания, который связывает заранее выбранный антиген.

Дополнительный вариант этого способа для получения разнообразной библиотеки антител и скрининга желательных специфичностей связывания описан в патенте США № 5702892, который включен в

данную заявку посредством ссылки. В этом способе используются только последовательности тяжелых цепей, указанные последовательности тяжелых цепей рандомизируют по всем положениям нуклеотидов, которые кодируют либо гипервариабельный участок CDRI, либо гипервариабельный участок CDRIII и получают генетическую вариабельность гипервариабельных участков вне зависимости от любого биологического процесса.

В этом способе две библиотеки сконструированы таким образом, чтобы генетически перетасовать олигонуклеотидные мотивы внутри гена каркасной структуры тяжелой цепи. Вследствие неспецифической мутации либо гипервариабельного участка CDRI, либо гипервариабельного участка CDRIII гены указанных гипервариабельных участков тяжелой цепи перестраивали, чтобы получить коллекцию высококоразнообразных последовательностей. Белки тяжелых цепей, кодируемые коллекцией мутированных последовательностей генов, обладали потенциалом обладать всеми связывающими свойствами иммуноглобулина, требуя при этом наличия лишь одной из двух цепей иммуноглобулина.

В частности, указанный способ осуществляли при отсутствии белка легкой цепи иммуноглобулина. Библиотеку воспроизведенных в фаге модифицированных белков тяжелых цепей инкубировали с иммобилизованным лигандом, чтобы отобрать клоны, кодирующие рекомбинантные белки, которые специфично связываются с иммобилизованным лигандом. Связанный фаг затем отделяли от иммобилизованного лиганда и амплифицировали посредством выращивания в бактериальных клетках-хозяевах. Отдельные вирусные бляшки (стерильные пятна), в каждой из которых экспрессировался отличный рекомбинантный белок, размножали, и отдельных клонов затем можно было проанализировать на активность связывания.

В5. Трансгенные мыши, включающие библиотеки антител человека.

Для получения антител теперь доступна рекомбинантная технология. Вдобавок к комбинаторным библиотекам экспрессии иммуноглобулинов в фаге, описанным выше, другим подходом молекулярного клонирования является получение антител из трансгенных мышей, включающих библиотеки антител человека. Такие методики описаны в патенте США № 5545807, включенном в данную заявку посредством ссылки.

В наиболее общем смысле эти способы включают получение трансгенных животных, которым в зародышевую линию клеток был встроен генетический материал, который кодирует по меньшей мере часть иммуноглобулина, полученного из человека, или в которых возможна реаранжировка, чтобы кодировать репертуар иммуноглобулинов. Встроенный генетический материал можно получить от человека или можно получить синтетически. Этот материал может кодировать по меньшей мере часть известного иммуноглобулина или может быть модифицирован, чтобы кодировать по меньшей мере часть измененного иммуноглобулина.

Вставленный генетический материал экспрессируется в трансгенном животном, что приводит к производству иммуноглобулина, происходящего, по меньшей мере, отчасти из встроенного генетического материала иммуноглобулина человека. Было обнаружено, что генетический материал реаранжируется в трансгенном животном таким образом, что можно получить репертуар иммуноглобулинов с частью или частями, полученными из встроенного генетического материала, даже если встроенный генетический материал включен в зародышевую линию клеток в неправильное положение или с неправильной геометрией.

Встроенный генетический материал может быть в виде ДНК, клонированной в прокариотические векторы, такие как плазмиды и/или космиды. Более крупные фрагменты ДНК встраивают, применяя векторы бактериальной искусственной хромосомы (Burke и др., 1987; включен в данную заявку посредством ссылки) или путем введения фрагментов хромосом (Richer и Lo, 1989; включен в данную заявку посредством ссылки). Встроенный генетический материал можно ввести в хозяина обычным способом, например, с помощью инъекции или других процедур, в оплодотворенные зародыши или эмбриональные стволовые клетки.

В предпочтительных аспектах используют животное-хозяин, который изначально не несет генетический материал, кодирующий константные области иммуноглобулина так, что полученное трансгенное животное будет использовать только встроенный генетический материал человека при продукции иммуноглобулинов. Этого можно достигнуть, либо применяя встречающегося в природе мутантного хозяина, лишённого соответствующего генетического материала, либо путем искусственного создания мутантов, например, в линиях клеток, чтобы, в конечном счете, создать хозяина, из которого удален соответствующий генетический материал.

Если животное-хозяин несет генетический материал, кодирующий константные области иммуноглобулина, трансгенное животное будет нести встречающийся в природе генетический материал и встроенный генетический материал и будет продуцировать иммуноглобулины, полученные из встречающегося в природе генетического материала, встроенного генетического материала и смеси обоих типов генетического материала. В этом случае желательный иммуноглобулин можно получить путем скрининга гибридом, полученных из трансгенного животного, например, используя феномен аллельного исключения экспрессии гена антитела или дифференциальную потерю хромосом.

Как только было получено подходящее трансгенное животное, указанное животное просто иммуни-

зировали желательным иммуногеном. В зависимости от природы встроенного материала животное может продуцировать химерный иммуноглобулин, например, смешанного происхождения от мыши/человека, если генетический материал чужеродного происхождения кодирует лишь часть иммуноглобулина; или животное может продуцировать полностью чужеродный иммуноглобулин, например, полностью человеческого происхождения, если генетический материал чужеродного происхождения кодирует целый иммуноглобулин.

Поликлональные антисыворотки можно получить из трансгенного животного после иммунизации. Иммуноглобулинпродуцирующие клетки можно удалить из животного для получения интересующего иммуноглобулина. Предпочтительно моноклональные антитела получают из трансгенного животного, например, путем слияния клеток селезенки из указанного животного с клетками миеломы и скрининга полученных гибридов, чтобы отобрать такие, которые продуцируют желательное антитело. Подходящие методики для таких процессов описаны в данной заявке.

В альтернативном подходе генетический материал можно включить в животное таким способом, что желательное антитело продуцируется в жидкостях организма, таких как сыворотка или внешний секрет животного, такой как молоко, молозиво или слюна. Например, путем вставки *in vitro* генетического материала, кодирующего по меньшей мере часть иммуноглобулина человека, в ген млекопитающего, кодирующий белок молока, а затем введения гена в оплодотворенный зародыш млекопитающего, например, путем инъекции можно получить зародыш, который может развиваться во взрослое млекопитающее женского рода, продуцирующее молоко, включающее иммуноглобулин, полученный, по меньшей мере, отчасти из вставленного генетического материала иммуноглобулина человека. Желательное антитело затем можно получить из молока. Подходящие методики для осуществления таких процессов известны специалистам в данной области техники.

Вышеуказанных трансгенных животных, как правило, используют для получения антител человека одного изотипа, а именно изотипа, который жизненно важен для созревания В-клеток, такого как IgM и, возможно, IgD. Другой предпочтительный способ для получения антител человека к VEGF состоит в применении технологии, описанной в патентах США №№ 5545806; 5569825; 5625126; 5633425; 5661016 и 5770429; каждый из которых включен посредством ссылки, в которых описаны трансгенные животные, которые способны переключаться от изотипа, необходимого для развития В-клеток, к другим изотипам.

При развитии В-лимфоцита указанная клетка исходно продуцирует IgM со специфичностью связывания, определяемой эффективно реаранжированными VH и VL областями. Впоследствии каждая В-клетка и происходящие из нее клетки синтезируют антитела с теми же V участками L- и H-цепей, но они могут переключать изотип H-цепи. Применение  $\mu$  или  $\delta$  константных областей в основном определяется альтернативным сплайсингом, позволяющим IgM и IgD совместно экспрессироваться в одной клетке. Другие изотипы тяжелой цепи ( $\gamma$ ,  $\alpha$  и  $\epsilon$ ) экспрессируются в природе только после того, как в результате перестройки генов удаляются экзоны C  $\mu$  и C  $\delta$ . Этот процесс перестройки генов, названный переключением изотипа, обычно происходит путем рекомбинации между так называемыми фрагментами переключателя, расположенными непосредственно против хода транскрипции (*upstream*) от каждого гена тяжелой цепи (за исключением дельта). Отдельные фрагменты переключателя имеют длину между 2 и 10 т.п.н. и состоят, главным образом, из коротких повторяющихся последовательностей.

Вследствие этого предпочтительно, чтобы трансгены вводили транскрипционные регуляторные последовательности в район приблизительно 1-2 т.п.н. против хода транскрипции (*upstream*) от каждого участка переключателя, которые используются для переключения изотипа. Эти транскрипционные регуляторные последовательности предпочтительно включают промоторный и энхансерный элемент и более предпочтительно включают 5'-фланкирующий (т.е. против хода транскрипции, *upstream*) участок, который естественным образом связан (т.е. встречается в зародышевой конфигурации) с участком переключателя. Хотя 5'-фланкирующая последовательность из одного участка переключателя может быть функционально связана с другим участком переключателя для конструирования трансгена, в некоторых вариантах реализации предпочтительно, чтобы каждый участок переключателя, включенный в трансгенную конструкцию, включал 5'-фланкирующий участок, который встречается непосредственно против хода транскрипции (*upstream*) во встречающейся в природе зародышевой конфигурации. Известны сведения о последовательностях, касающиеся последовательностей участков переключателей иммуноглобулинов (Mills и др., 1990; Sideras и др., 1989; каждый из которых включен в данную заявку посредством ссылки).

В способе, описанном в патентах США №№ 5545806; 5569825; 5625126; 5633425; 5661016 и 5770429, трансгены иммуноглобулинов человека, включенные в трансгенное животное, функционируют правильно на всем пути развития В-клеток, приводя к переключению изотипа. Соответственно, в этом способе эти трансгены сконструированы, чтобы получить переключение изотипа и одно или более из следующих свойств: (1) высокий уровень экспрессии и специфичную для типа клетки экспрессию, (2) функциональную перестройку генов, (3) активацию и ответ на аллельное исключение, (4) экспрессию достаточного первичного репертуара, (5) передачу сигнала, (6) соматические гипермутации и (7) преобладание указанного локуса трансгенного антитела в процессе иммунного ответа.

Важным условием для функционирования трансгена является получение репертуара первичных ан-

тител, которые достаточно разнообразны, чтобы запустить вторичный иммунный ответ на широкий диапазон антигенов. Рearанжированный ген тяжелой цепи состоит из экзона сигнального пептида, экзона вариабельной области и tandemного множества мультидоменных константных участков, каждый из которых кодируется несколькими экзонами. Каждый из генов константной области кодирует константную часть различных классов иммуноглобулинов. В процессе развития В-клетки расположенные рядом с V-участком константные области удаляются, приводя к экспрессии новых классов тяжелой цепи. Для каждого класса тяжелой цепи, альтернативные паттерны сплайсинга РНК позволяют получить как транс-мембранные, так и секретируемые иммуноглобулины.

Локус тяжелой цепи человека состоит из приблизительно 200 фрагментов V-генов покрывающих 2 Мб, приблизительно 30 фрагментов D генов, покрывающих приблизительно 40 т.п.н., шести J-фрагментов, расположенных группами внутри участка 3 т.п.н., и девяти фрагментов генов константных областей, распределенных по участку приблизительно 300 т.п.н. Весь этот локус покрывает приблизительно 2,5 Мб дистальной части длинного плеча хромосомы 14. Известны фрагменты трансгенов тяжелой цепи, включающие членов всех шести известных семейств VH, фрагменты генов D и J, а также константные области  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\gamma 3$ ,  $\gamma 1$  и  $\alpha 1$  (Berman и др., 1988; включен в данную заявку посредством ссылки). Геномные фрагменты, включающие все необходимые фрагменты генов и регуляторные последовательности из локуса легкой цепи человека, конструируют аналогичным образом.

Экспрессия успешно rearанжированных трансгенов тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина, как правило, имеет доминантный эффект благодаря подавлению перестройки эндогенных генов иммуноглобулинов у трансгенного не относящегося к человеку животного. Тем не менее, в некоторых вариантах реализации желательно добиться полной инактивации эндогенных локусов Ig так, чтобы не могли образоваться гибридные цепи иммуноглобулинов, включающие вариабельную область человека и не принадлежащую человеку (например, мышиную) константную область, например, с помощью транс-переключения между трансгенными и эндогенными последовательностями Ig. Применяя технологию эмбриональных стволовых клеток и гомологичную рекомбинацию, можно легко ликвидировать эндогенный репертуар иммуноглобулинов. Вдобавок, супрессию эндогенных генов Ig можно осуществить, применяя целый ряд методик, таких как антисмысловая технология.

В других аспектах настоящего изобретения может оказаться желательным получение транс-переключенного иммуноглобулина. Антитела, включающие такие химерные транс-переключенные иммуноглобулины, можно применять для целого ряда применений, в которых желательно получить не принадлежащую человеку (например, мышиную) константную область, например, для сохранения эффекторных функций у хозяина.

Присутствие константной области мыши может давать преимущества над константной областью человека, например, чтобы получить эффекторные функции мыши (например, ADCC, связывание комплемента мыши) таким образом, что такое химерное антитело можно тестировать в модели заболевания на мышах. После тестирования на животном можно выделить последовательность, кодирующую вариабельную область человека, например, с помощью амплификации ПЦР™ или клонирования кДНК из источника (клона гибридомы), и соединить с последовательностью, кодирующей желательную константную область человека, чтобы кодировать антитело с последовательностью человека, более подходящее для терапевтического применения человеком.

В6. Мутагенез с помощью ПЦР™.

Сайт-специфичный мутагенез представляет собой методику, полезную при получении отдельных антител посредством специфичного мутагенеза лежащей в их основе ДНК. Данная методика дополнительно обеспечивает возможность быстрого получения и тестирования вариантов последовательности, включающих одно или более из предшествующих соображений, либо гуманизированных, либо нет, путем введения одного или более изменений последовательности нуклеотидов в ДНК.

Хотя многие способы подходят для применения в мутагенезе, применение полимеразной цепной реакции (ПЦР™), как правило, в настоящее время является предпочтительным. Эта технология обеспечивает быстрый и эффективный способ введения желательных мутаций в данную последовательность ДНК. Далее подробно описано применение ПЦР™ для введения точечных мутаций в последовательность, что можно применять для изменения аминокислот, кодируемых данной последовательностью. Модификации этого способа также подходят для введения сайтов для рестрикционных ферментов в молекулу ДНК.

В этом способе синтетические олигонуклеотиды разработаны для введения точечной мутации в один конец амплифицируемого фрагмента. После проведения ПЦР™, амплифицированные фрагменты обрабатывают фрагментами Кленова с получением "тупых" концов, и фрагменты с "тупыми" концами затем лигируют и субклонируют в вектор, чтобы облегчить анализ последовательности.

Для получения матричной ДНК, которую желательно подвергнуть мутации, ДНК субклонируют в многокопийный вектор, такой как pUC19, используя сайты рестрикции, фланкирующие мутируемую область. Матричную ДНК затем получают, применяя набор для получения малого количества плазмиды. Подходящие олигонуклеотидные праймеры, которые основаны на родительской последовательности, но

которые включают желательную точечную мутацию и которые фланкированы на 5'-конце сайтом для рестрикционного фермента, синтезировали, применяя автоматизированный синтезатор. Как правило, требуется, чтобы праймер был гомологичным матричной ДНК на протяжении приблизительно 15 оснований или около того. Праймеры можно очистить с помощью денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле, хотя это не является абсолютно необходимым для применения в ПЦР™. 5'-Конец олигонуклеотидов затем следует фосфорилировать.

Матричную ДНК следует амплифицировать с помощью ПЦР™, применяя олигонуклеотидные праймеры, которые включают желательные точечные мутации. Концентрация  $MgCl_2$  в буфере для амплификации, как правило, будет равна приблизительно 15 мМ. Как правило, следует проводить приблизительно 20-25 циклов ПЦР™, как описано далее: денатурация 35 с при 95°C; гибридизация 2 мин при 50°C и удлинение 2 мин при 72°C. ПЦР™, как правило, будет включать последний цикл удлинения приблизительно в течение 10 мин при 72°C. После окончательного этапа удлинения следует добавить приблизительно 5 единиц фрагментов Кленова в реакционную смесь и инкубировать в течение дополнительных 15 мин при приблизительно 30°C. Экзонуклеазная активность фрагментов Кленова требуется для получения ровных концов, подходящих для клонирования по "тупым" концам.

Полученную реакционную смесь, как правило, следует проанализировать с помощью неденатурирующего электрофореза в агарозном или акриламидном геле, чтобы удостовериться в том, что амплификация позволила получить ожидаемый продукт. Затем из реакционной смеси удаляют большую часть минерального масла, экстрагируют хлороформом, чтобы удалить оставшееся масло, экстрагируют забуференным фенолом и затем концентрируют путем преципитации 100% этанолом. Далее следует расщепить приблизительно половину амплифицированных фрагментов рестрикционным ферментом, который режет по фланкирующим последовательностям, используемым в указанных олигонуклеотидах. Расщепленные фрагменты очищают на геле из легкоплавкой агарозы.

Чтобы субклонировать фрагменты и проверить на наличие точечных мутаций, можно субклонировать указанные два амплифицированных фрагмента в соответствующим образом расщепленный вектор путем лигирования по "тупым" концам. Его затем используют, чтобы трансформировать *E. coli*, из которой затем можно получить плазмидную ДНК, применяя набор для получения малого количества плазмидной ДНК. Амплифицированную часть плазмидной ДНК затем анализируют путем секвенирования ДНК для подтверждения того, что была получена правильная точечная мутация. Это важно, так как Taq ДНК-полимераза может ввести дополнительные мутации в фрагменты ДНК.

Введение точечной мутации также можно осуществить, применяя последовательные этапы ПНР™. В этой процедуре два фрагмента, включающие мутацию, отжигают друг с другом и удлиняют с помощью взаимозатравочного синтеза. Этот фрагмент затем амплифицируют с помощью второго этапа ПНР™, тем самым избегая лигирования по "тупым" концам, требуемое для описанного выше протокола. В этом способе получение матричной ДНК, получение олигонуклеотидных праймеров и первую амплификацию ПНР™ осуществляют, как описано выше. В этом процессе, тем не менее, выбранные олигонуклеотиды должны быть гомологичны матричной ДНК на участке, состоящем из от приблизительно 15 до приблизительно 20 оснований, и должны также перекрываться друг с другом на приблизительно 10 оснований или более.

При второй амплификации ПЦР™ применяют каждый амплифицированный фрагмент и каждый праймер для фланкирующей последовательности и ведут от приблизительно 20 до приблизительно 25 циклов ПЦР™, используя условия, описанные выше. Затем снова субклонируют фрагменты и проверяют, что точечная мутация введена правильно при применении этапов, приведенных выше.

При применении любого из предшествующих способов, как правило, предпочтительно ввести мутацию путем амплифицирования настолько малого фрагмента, насколько это возможно. Разумеется, следует также внимательно учитывать параметры, такие как температура плавления олигонуклеотида, на которые, как правило, будет влиять содержание GC и длина олигонуклеотида. Осуществление этих способов и их оптимизация, если это необходимо, должны быть очевидны для специалистов в данной области техники, и они дополнительно описаны в различных публикациях, таких как *Current Protocols in Molecular Biology*, 1995, включенная в данную заявку посредством ссылки.

При осуществлении сайт-специфичного мутагенеза можно использовать табл. А в качестве ссылочного материала.

Таблица А

| Аминокислоты          |     |   | Кодоны |     |     |     |     |     |
|-----------------------|-----|---|--------|-----|-----|-----|-----|-----|
| Аланин                | Ala | A | GCA    | GCC | GCG | GCU |     |     |
| Цистеин               | Cys | C | UGC    | UGU |     |     |     |     |
| Аспарагиновая кислота | Asp | D | GAC    | GAU |     |     |     |     |
| Глутаминовая кислота  | Glu | E | GAA    | GAG |     |     |     |     |
| Фенилаланин           | Phe | F | UUC    | UUU |     |     |     |     |
| Глицин                | Gly | G | GGA    | GGC | GGG | GGU |     |     |
| Гистидин              | His | H | CAC    | CAU |     |     |     |     |
| Изолейцин             | Ile | I | AUA    | AUC | AUU |     |     |     |
| Лизин                 | Lys | K | AAA    | AAG |     |     |     |     |
| Лейцин                | Leu | L | UUA    | UUG | CUA | CUC | CUG | CUU |
| Метионин              | Met | M | AUG    |     |     |     |     |     |
| Аспарагин             | Asn | N | AAC    | AAU |     |     |     |     |
| Пролин                | Pro | P | CCA    | CCC | CCG | CCU |     |     |
| Глутамин              | Gln | Q | CAA    | CAG |     |     |     |     |
| Аргинин               | Arg | R | AGA    | AGG | CGA | CGC | CGG | CGU |
| Серин                 | Ser | S | AGC    | AGU | UCA | UCC | UCG | UCU |
| Треонин               | Thr | T | ACA    | ACC | ACG | ACU |     |     |
| Валин                 | Val | V | GUA    | GUC | GUG | GUU |     |     |
| Триптофан             | Trp | W | UGG    |     |     |     |     |     |
| Тирозин               | Tyr | Y | UAC    | UAU |     |     |     |     |

#### В7. Фрагменты и производные антител.

Вне зависимости от источника исходного блокирующего VEGFR2 антитела человека к VEGF согласно настоящему изобретению в настоящем изобретении можно применять либо нетронутое антитело, либо мультимеры антитела, либо любой из множества функциональных, антигенсвязывающих участков антитела. Типичные функциональные участки включают фрагменты антител, которые включают антигенсвязывающий домен, такой как Fab', Fab, F(ab')<sub>2</sub>, антитела с одним доменом (DAB), димер TandAbs, Fv, scFv (одноцепочечный Fv), dsFv, ds-scFv, Fd, линейные антитела, миниантитела, диабоды, биспецифичные фрагменты антител и т.п. Методики получения таких конструкций хорошо известны специалистам в данной области техники и дополнительно описаны в данной заявке.

На выбор конструкции антитела могут влиять различные факторы. Например, пролонгированное время полужизни может быть результатом активной реадсорбции нетронутых антител в почке, свойство Fc-фрагмента иммуноглобулина. Ожидают, что основанные на IgG антитела, следовательно, проявляют более медленный клиренс из крови, чем соответствующие Fab'. Тем не менее, основанные на Fab'-фрагменте композиции, как правило, проявляют лучшую способность проникать внутрь ткани.

При желании, можно выбрать определенные Fc-области, чтобы продлить время полужизни. Например, см. WO 99/43713, в которой описывают константные области с увеличенным временем полужизни в кровотоке, что было достигнуто с помощью существенно сниженного связывания с Fcγ-рецепторами, FcγRI, FcγRII и FcγRIII (Fridman, 1991). Дополнительно в патенте США № 7083784 описаны модифицированные константные области с повышенным временем полужизни *in vivo*, полученные в результате модификаций, которые повышали их аффинность к FcRn (неонатальному Fc-рецептору). Методики из патента США № 7083784 можно применять для создания антител с продленным временем полужизни, либо имеющих, либо не имеющих существенных эффекторных функций.

Фрагменты антител можно получить путем протеолиза целых иммуноглобулинов человека с помощью неспецифичной тиолпротеиназы, папаина. Расщепление папаином позволяет получить два идентичных антигенсвязывающих фрагмента, названных как "Fab-фрагменты", каждый из которых включает один сайт связывания антигена, и остаточный "Fc-фрагмент".

Папаин сначала нужно активировать путем восстановления сульфгидрильной группы в активном сайте с помощью цистеина, 2-меркаптоэтанола или дитиотреитола. Тяжелые металлы из исходного фермента следует удалить путем хелатирования с помощью EDTA (2 mM), чтобы обеспечить максимальную

активность фермента. Фермент и субстрат обычно смешивают в отношении 1:100 по массе. После инкубирования реакцию можно остановить с помощью необратимого алкилирования тиольной группы йод-ацетамидом или просто с помощью диализа. Завершенность расщепления следует отслеживать с помощью ПААГ/ДСН и различные фракции разделить с помощью хроматографии на белке А-сефарозе или ионообменной хроматографии.

Обычная процедура получения  $F(ab')_2$ -фрагментов из IgG человеческого происхождения ограничена протеолизом ферментом пепсином. Условия: 100× избыток антитела в массовом отношении в ацетатном буфере при pH 4.5, 37°C, позволяет предположить, что антитело расщепляется в С-концевой стороне дисульфидной связи внутри тяжелой цепи. Скорости расщепления IgG мыши могут изменяться в зависимости от подкласса и следует подбирать условия таким образом, чтобы избежать значительных количеств полностью расщепленного IgG. В частности, IgG<sub>2b</sub> подвержен полной деградации. Другие подклассы требуют различных условий инкубирования для получения оптимальных результатов, все из которых известны в данной области техники.

Обработка пепсином нетронутых антител приводит к получению  $F(ab')_2$ -фрагмента, который имеет два антиген-антигенсвязывающих активных центра и все еще способен к перекрестному связыванию антигена. Типичные условия для расщепления IgG с помощью пепсина требуют условия, включающие диализ против 0,1M ацетатного буфера, pH 4.5 и затем инкубирование в течение 4 ч с 1% пепсином в массовом отношении; расщепление IgG<sub>1</sub> и IgG<sub>2a</sub> улучшается, если сначала диализировать против 0,1M форматного буфера, pH 2.8 при 4°C в течение 16 ч, а затем против ацетатного буфера. IgG<sub>2b</sub> позволяют получить более стабильные результаты при инкубировании в стафилококковой протеиназе V8 (3% в массовом отношении) в 0,1M натрийфосфатном буфере, pH 7.8, в течение 4 ч при 37°C.

Fab-фрагмент также включает константную область легкой цепи и первую константную область (CH1) тяжелой цепи. Fab'-фрагменты отличаются от Fab-фрагментов несколькими добавленными остатками в карбоксильном конце CH1 домена тяжелой цепи, включая один или более цистеинов из шарнирной области антитела.  $F(ab')_2$ -фрагменты антител изначально были получены в виде пар Fab'-фрагментов, которые включали шарнирные цистеины между ними. Другие способы химического соединения фрагментов антител также известны.

Фрагмент "Fv" представляет собой минимальный фрагмент антитела, который включает полный сайт распознавания и связывания антигена. Этот участок состоит из димера одного переменного домена тяжелой цепи и одного переменного домена легкой цепи в плотном, нековалентном взаимодействии. Именно в этой конфигурации три гиперпеременных участка (CDR) каждого из переменных доменов взаимодействуют с получением сайта связывания антигена на поверхности димера VH-VL. В совокупности шесть гиперпеременных участков (CDR) придают специфичность связывания антигена с антителом. Тем не менее, даже один переменный домен (или половина Fv, включающая только три гиперпеременных участка (CDR), специфичных к антигену) имеют способность распознавать и связывать антиген.

"Одноцепочечный Fv", или "sFv", или "scFv" фрагменты антител включают домены VH и VL антитела, при этом эти домены присутствуют в одной полипептидной цепи. Как правило, Fv-полипептид дополнительно включает полипептидный линкер между доменами VH и VL, который позволяет sFv образовывать желательную структуру для связывания антигена.

Следующие патенты особенно включены в данную заявку посредством ссылки с целью еще большего дополнения настоящей идеи, касающейся получения и применения функциональных, антигенсвязывающих участков антител, включая scFv, Fv, Fab', Fab и  $F(ab')_2$  фрагменты антител к VEGF: патенты США №№ 5855866; 5965132; 6051230; 6004555; 5877289 и 6093399. WO 98/45331 также включены в данную заявку посредством ссылки с целью включения дополнительного описания и обучения получению переменных, гиперпеременных и определяющих комплементарность (CDR) участков антитела.

"Диабоды" представляют собой малые фрагменты антител с двумя сайтами связывания антигенов, при этом фрагменты включают переменный домен тяжелой цепи (VH), соединенный с переменным доменом легкой цепи (VL) в одной полипептидной цепи (VH-VL). Применяя линкер, который слишком короткий, чтобы позволить спаривание между двумя указанными доменами на одной цепи, домены принудительно спариваются с комплементарными доменами другой цепи и создают два сайта связывания антигена. Диабоды описаны в EP 404097 и WO 93/11161. "Линейные антитела", которые могут быть биспецифичными или моноспецифичными, включают пару тандемных Fd-фрагментов (VH-CH1-VH-CH1), которые образуют пару антигенсвязывающих участков, как описано у Zapatanflp. (1995).

При применении Fab' или антигенсвязывающего фрагмента антитела с сопутствующей эффективностью проникновения в ткань можно получить дополнительные преимущества от модифицирования указанного фрагмента, чтобы увеличить его время полужизни. Можно применять целый ряд методик, таких как манипуляции или модификация самой молекулы антитела, а также конъюгация с инертными носителями. Любую конъюгацию с единственной целью, повысить время полужизни скорее, чем доставить агент к мишени, следует осуществлять осторожно, так как Fab' и другие фрагменты выбраны, чтобы проходить в ткани. Тем не менее, предполагается конъюгация с небелковыми полимерами, такими как

PEG и т.п.

Модификации, отличные от конъюгации, следовательно, основаны на модифицировании структуры фрагмента антитела, чтобы сделать ее более стабильной и/или чтобы уменьшить скорость катаболизма в организме. Одним механизмом для такой модификации является применение D-аминокислот вместо L-аминокислот. Для рядовых специалистов в данной области техники должно быть очевидно, что после введения таких модификаций следует проводить тщательное тестирование полученной молекулы, чтобы убедиться, что все еще сохранились желательные биологические свойства. Дополнительно стабилизирующие модификации включают добавление стабилизирующих молекул либо к N-концу, либо к C-концу, либо к обоим, что, как правило, используется для продления времени полужизни биологических молекул. Исключительно в качестве примера можно модифицировать концы путем ацилирования или аминирования.

Умеренные модификации конъюгированного типа для применения в настоящем изобретении включают включение эпитопа, связывающего рецептор "спасения" (salvage), в фрагмент антитела. Методики для достижения этого включают мутирование подходящего участка фрагмента антитела или включение указанного эпитопа в качестве пептидной метки, которая присоединяется к фрагменту антитела. WO 96/32478 специально включена в данную заявку посредством ссылки с целью дополнительного иллюстрирования такой технологии. Эпитопы, связывающие рецептор "спасения", обычно представляют собой участки из трех или более аминокислот из одной или двух петель Fc-домена, которые переносят в аналогичное положение на фрагменте антитела. Эпитопы, связывающие рецептор "спасения" из WO 98/45331, включены в данную заявку посредством ссылки для применения в настоящем изобретении.

#### B8. Тесты на связывание и функциональные тесты.

Хотя настоящее изобретение обеспечивает значительную пользу при лечении животного и человека, оно также имеет множество других практических применений, включая множество применений *in vitro*. Некоторые из этих применений связаны со специфичными связывающими свойствами указанных антител человека или иммуноконъюгатов. Так как все соединения согласно настоящему изобретению включают по меньшей мере один связывающий VEGF компонент, их можно применять практически во всех вариантах реализации со связыванием, в которых можно применять любое антитело к VEGF.

Присутствие присоединенного агента, где это уместно, несмотря на то, что он обеспечивает полезные свойства, не снижает пользу участков антитела человека в любом тесте на связывание. Подходящим образом полезные тесты на связывание, таким образом, включают широкоиспользуемые в данной области техники, такие как иммуноблоты, вестерн-блоттинг, дот-блоттинг, радиоиммуноанализ (RIA), твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), иммуногистохимия, сортировка клеток с возбуждением флуоресценции (FACS), иммунопреципитация, аффинная хроматография и т.п., дополнительно описанные в данной заявке.

Некоторые стандартные тесты на связывание представляют собой такие, в которых антиген иммобилизован на матрице с твердой подложкой, например нитроцеллюлозе, нейлоне или их комбинации, такие как в иммуноблотах, вестерн-блоттинге и родственных тестах. Другие важные тесты представляют собой ELISA. Все такие тесты можно легко приспособить для применения для детектирования VEGF, что можно применять в диагностике ангиогенного заболевания. Агенты согласно настоящему изобретению также можно применять в сочетании как со свежемороженными, так и с фиксированными в формалине заключенными в парафин кусочками ткани при иммуногистохимии; сортировке клеток с возбуждением флуоресценции, проточной цитометрии или проточной микрофлуориметрии; иммунопреципитации; в вариантах реализации с очисткой антигена, таких как аффинная хроматография, даже включая, в случае биспецифичных антител, одностадийную быструю очистку одного или более антигенов в одно и то же время; и во многих других тестах на связывание, которые должны быть очевидны для специалистов в данной области техники, учитывая сведения, представленные в данной заявке.

Дополнительными практическими применениями настоящих антител человека являются применения в качестве контролей в функциональных тестах. Они включают множество тестов и систем *in vitro* и *ex vivo*, а также исследования на модельных животных. Так как связывающие и функциональные свойства антител человека согласно настоящему изобретению очень специфичны, т.е. они ингибируют связывание VEGF и передачу сигналов через VEGFR2, но не VEGFR1, такие "контрольные" применения фактически представляют чрезвычайную ценность. Тесты, для которых полезны такие практические применения настоящего изобретения, включают, например, тесты, касающиеся опосредованного VEGF роста эндотелиальных клеток, индуцированного VEGF фосфорилирования и индуцированной VEGF сосудистой проницаемости, а также анализ неоваскуляризации методом микрокармана в роговице и анализ хориоаллантоиновой мембраны куриного яйца (CAM). С помощью этих тест-систем также можно разработать скрининговые тесты *in vitro* или *ex vivo* для лекарственных препаратов, при этом особенно важно обеспечение биологических материалов с хорошо известными свойствами.

#### C. Иммуноконъюгаты.

Хотя настоящее изобретение обеспечивает неожиданно эффективные изолированные или неконъюгированные антитела человека для применения в антиангиогенных способах, иммуноконъюгаты, иммунотоксины и коагулиганды с блокирующим VEGFR2 антителом человека к VEGF также предусмотрены.



В настоящее время предпочтительными агентами для применения в терапевтических конъюгатах с блокирующим VEGFR2 антителом человека к VEGF являются радиотерапевтические агенты (примером является рентгенодиагностика, описанная в данной заявке), химиотерапевтические агенты, антиангиогенные агенты, индуцирующие апоптоз агенты, антитубулиновые лекарственные препараты, противоклеточные или цитотоксические агенты, цитокины, хемокин, ингибиторы АТФазы типа V и коагулянты (факторы свертывания крови).

Чтобы получить иммуноконъюгаты, иммунотоксины и коагулиганды, можно применять рекомбинантную экспрессию для создания слитого белка, что известно специалистам в данной области техники и дополнительно описано в данной заявке. В равной мере иммуноконъюгаты, иммунотоксины и коагулиганды можно получить, применяя мостики авидин:биотин или любые разработанные технологии химической конъюгации и перекрестно-связывающих агентов в отношении конъюгатов антител.

C1. Токсичные и направленные против клеток (антиклеточные) агенты.

Для некоторых применений терапевтические агенты будут представлять собой цитотоксические или фармакологические агенты, особенно цитотоксические, цитостатические или другим образом направленные против клеток агенты, имеющие способность убивать или подавлять рост или деление эндотелиальных клеток. Обычно эти аспекты настоящего изобретения предполагают применение любого фармакологического агента, который может быть конъюгирован с блокирующим VEGFR2 антителом человека к VEGF согласно настоящему изобретению и доставлен в активной форме в целевой эндотелий.

Типичные направленные против клеток агенты включают химиотерапевтические агенты, а также цитотоксины. Химиотерапевтические агенты, которые можно применять, включают гормоны, такие как стероиды; антиметаболиты, такие как цитозинарабинозид, фторурацил, метотрексат или аминоптерин; антрациклины; митомицин C; алкалоиды барвинка; демеколцин; этопозид; митрамицин; противоопухолевые алкилирующие агенты, такие как хлорамбуцил или мелфалан. Другие варианты реализации могут включать агенты, такие как цитокины. Как правило, можно применять любой направленный против клеток агент при условии, что его можно успешно конъюгировать или связать с антителом таким способом, который позволит его нацеливание, интернализацию, высвобождение и/или представление компонентам крови в месте нахождения целевых эндотелиальных клеток.

Могут быть ситуации, как, например, когда целевой антиген не следует по пути, соответствующему эффективной интоксикации токсичным соединением, когда желательно нацеливание химиотерапевтических агентов, таких как противоопухолевые лекарственные препараты, цитокины, антиметаболиты, алкилирующие агенты, гормоны и т.п. Целый ряд химиотерапевтических и других фармакологических агентов были успешно конъюгированы с антителами и было показано, что они функционируют как фармакологические препараты, включая доксорубин, дауномицин, метотрексат, винбластин, неокарцино-статин, макромицин, тренимон и  $\alpha$ -аманитин.

В других ситуациях, любые потенциальные побочные действия от основанной на цитотоксинах терапии можно ликвидировать путем применения ингибиторов синтеза ДНК, таких как даунорубин, доксорубин, адриамицин и т.п. Эти агенты, следовательно, являются предпочтительными примерами направленных против клеток агентов для применения в настоящем изобретении. В аспекте цитостатических агентов такие соединения, как правило, нарушают естественный клеточный цикл целевой клетки, предпочтительно таким образом, что клетка выводится из клеточного цикла.

Известно большое разнообразие цитотоксических агентов, которые можно конъюгировать с блокирующими VEGFR2 антителами человека к VEGF. Примеры включают многочисленные полезные токсины, полученные из растений, грибка или бактерий, которые в качестве примера включают различные А-цепочечные токсины, особенно А-цепь рицина; белки, инактивирующие рибосомы, такие как сапорин или гелонин;  $\alpha$ -сарцин; аспергиллин; рестриктоцин; рибонуклеазы, такие как плацентарная рибонуклеаза; дифтерийный токсин; и экзотоксин *pseudomonas*, если назвать некоторые из них.

Хорошо известная книга о токсинах 1992 г. "Genetically Engineered Toxins", под редакцией Arthur E. Frankel, включая приложение, которая включает первичные последовательности аминокислот большого количества токсинов, специально включена в данную заявку посредством ссылки с целью дополнительного описания и облегчения применения токсинов в целевых конструкциях.

Из всех токсинов гелонин и А-цепи рицина являются предпочтительными. Наиболее предпочтительной молекулой токсина для применения в настоящем изобретении является А-цепь токсина, которую обрабатывают, чтобы модифицировать или удалить остатки углевода, так называемая дегликозилированная А-цепь (dgA). Дегликозилированная А-цепь рицина является предпочтительной вследствие ее чрезвычайной эффективности, более длительного времени полужизни и вследствие экономической целесообразности ее производства в клиническом качестве и масштабе.

С фармакологической точки зрения может потребоваться использование по возможности как можно более маленькой молекулы, которая, тем не менее, обеспечивает подходящий биологический ответ. Таким образом, может потребоваться использование меньших пептидов А-цепи, которые будут обеспечивать достаточный противоклеточный ответ. Для этого было обнаружено, что А-цепь рицина можно "укоротить" путем удаления 30 N-концевых аминокислот с помощью фермента Nagarase (Sigma), и при

этом сохранить достаточную активность токсина. Предполагают, что, при необходимости, эту укороченную А-цепь можно использовать в конъюгатах в соответствии с настоящим изобретением.

В качестве альтернативы можно обнаружить, что применение технологии рекомбинантной ДНК к А-цепи молекулы токсина обеспечит дополнительную пользу в соответствии с настоящим изобретением. Так как клонирование и экспрессия биологически активной А-цепи рицина были достигнуты, теперь возможно идентифицировать и получить меньшие или другим способом измененные пептиды, которые, тем не менее, проявляют подходящую токсическую активность. Более того, тот факт, что А-цепь рицина теперь клонирована, позволяет применять сайт-направленный мутагенез, посредством которого можно легко получить и отобрать полученные из А-цепи пептиды и получить дополнительные полезные молекулы для применения согласно настоящему изобретению.

## C2. Факторы свертывания крови.

Блокирующее VEGFR2 антитело человека к VEGF согласно настоящему изобретению может быть связано с компонентом, который способен непосредственно или опосредованно стимулировать коагуляцию с получением коагулиганда. В данной заявке антитела могут быть непосредственно связаны с коагулянтом или фактором свертывания крови или могут быть связаны со вторым участком связывания, который связывает и затем высвобождает коагулянт или фактор свертывания крови. В данной заявке термины "коагулянт" и "фактор свертывания крови", каждый, используется по отношению к компоненту, который способен непосредственно или опосредованно стимулировать коагуляцию при подходящих условиях, предпочтительно, когда помещен в конкретное окружение *in vivo*, такое как сосудистая сеть опухоли.

Предпочтительные факторы свертывания крови представляют собой композиции с тканевым фактором, таким как укороченный TF (tTF), димерные, мультимерные и мутантные молекулы TF. "Укороченный TF" (tTF) относится к конструкциям TF, которые сделали неспособными связывать мембрану путем удаления достаточной последовательности аминокислот, чтобы повлиять на изменение этого свойства. "Достаточное количество" в данном контексте представляет собой такое количество трансмембранной последовательности аминокислот, которой достаточно для того, чтобы молекула TF вошла в мембрану, или которое другим способом опосредует функциональное связывание с мембраной белка TF. Удаление такого "достаточного количества трансмембранной последовательности", следовательно, позволяет создать укороченный белок или полипептид тканевого фактора, лишенный способности связывать фосфолипидную мембрану, таким образом, что указанный белок является, по существу, растворимым белком, который значительно не связывается с фосфолипидными мембранами. Укороченный TF, таким образом, по существу, не может превратить фактор VII в фактор VIIa в стандартном анализе TF и все еще сохраняет так называемую каталитическую активность, включая активацию фактора X в присутствии фактора VIIa.

Патент США № 5504067 специально включен в данную заявку посредством ссылки с целью дополнительного описания таких укороченных белков тканевого фактора. Предпочтительно в указанных тканевых факторах для применения в этих аспектах настоящего изобретения, как правило, отсутствуют трансмембранный и цитозольный участки (аминокислоты 220-263) белка. Тем не менее, нет необходимости ограничивать укороченные молекулы TF молекулами точной длины, составляющей 219 аминокислот.

Композиции с тканевым фактором также могут быть полезны в виде димеров. Любую из укороченных, мутированных или других конструкций с тканевым фактором можно получить в димерной форме для применения в настоящем изобретении. Что должно быть очевидно для рядовых специалистов в данной области техники, такие TF димеры можно получить с помощью использования стандартных методик молекулярной биологии и рекомбинантной экспрессии, в которых кодирующие участки получают в пределах одной рамки считывания и экспрессируют с вектора экспрессии. В равной мере можно использовать различные технологии химической конъюгации для получения димеров TF. Можно получить производные отдельных мономеров TF перед конъюгацией. Все такие методики хорошо известны специалистам в данной области техники.

При желании, димеры или мультимеры тканевого фактора можно соединить с помощью биологически-расщепляемой связи, такой как избирательно-расщепляемый линкер или последовательность аминокислот. Например, предполагаются пептидные линкеры, которые включают сайт расщепления ферментом, предпочтительно расположенным или активным в опухолевом окружении. Типичные виды таких пептидных линкеров представляют собой такие, которые расщепляются урокиназой, плазмином, тромбином, фактором IXa, фактором Xa или металлопротеиназой, такой как коллагеназа, желатиназа или стромелизин.

В некоторых вариантах реализации димеры тканевого фактора могут дополнительно включать защищенную группу для вставки в гидрофобную мембрану, чтобы позднее способствовать функциональному объединению тканевого фактора с фосфолипидной мембраной, но только при некоторых определенных условиях. Как описано с точки зрения укороченных тканевых факторов, последовательности для объединения с гидрофобной мембраной, как правило, представляют собой участки аминокислот, которые способствуют объединению с фосфолипидным окружением вследствие их гидрофобной природы. В

равной мере можно применять жирные кислоты, чтобы получить потенциальную группу для вставки в мембрану.

Такие последовательности для вставки в мембрану могут быть расположены либо на N-конце, либо на C-конце молекулы TF или в целом присоединены к любой другой точке молекулы при условии, что их присоединение не препятствует функциональным свойствам конструкции TF. Предназначение защищенной вставленной группы состоит в том, что она остается нефункциональной до тех пор, пока конструкция TF не локализуется в опухолевом окружении, и позволяет гидрофобной добавке стать доступной и еще более способствовать физическому объединению с мембраной. Опять-таки, предполагается, что биологически расщепляемые связи и избирательно расщепляемые последовательности будут особенно полезны в этом отношении, при этом указанная связь или последовательность будут расщепляться или иным способом модифицироваться лишь при локализации в опухолевом окружении и воздействии на них конкретных ферментов или других биологически активных молекул.

В других вариантах реализации конструкции tTF могут быть мультимерными или полимерными. В данном контексте "полимерная конструкция" включает 3 или более конструкций тканевого фактора. "Мультимерная или полимерная конструкция TF" представляет собой конструкцию, которая включает первую молекулу или производное TF, функционально связанную по меньшей мере со второй и третьей молекулой или производным TF. Указанные мультимеры могут включать между приблизительно 3 и приблизительно 20 таких молекул TF. Отдельные единицы TF в составе таких мультимеров или полимеров также могут быть связаны с помощью избирательно-расщепляемых пептидных линкеров или других биологически-расщепляемых связей, если это желательно. Вновь, как и с димерами TF, обсуждаемыми выше, указанные конструкции можно легко получить, либо используя рекомбинантные манипуляции и экспрессию, либо применяя стандартную синтетическую химию.

Еще дополнительные конструкции TF, полезные в контексте настоящего изобретения, представляют собой такие мутанты, которые лишены способности активировать фактор VII. Такие "мутанты по активации фактора VII", как правило, определены в данной заявке как мутанты TF, которые связывают функциональный фактор VII/VIIa, протеолитически активируют фактор X, но, по существу, лишены способности протеолитически активировать фактор VII. Соответственно, такие конструкции представляют собой мутанты TF, у которых отсутствует активность активации фактора VII.

Способность таких мутантов по активации фактора VII функционировать, вызывая опухолеспецифичную коагуляцию, основана на их специфичной доставке в сосудистую сеть опухоли, и присутствии фактора VIIa на низких уровнях в плазме. При введении такого конъюгата мутанта по активации фактора VII, указанный мутант будет локализован в сосудистой сети васкуляризированной опухоли. Перед локализацией мутант TF, как правило, будет неспособен вызывать коагуляцию в любых других местах в организме, исходя из его неспособности превратить фактор VII в фактор VIIa. Тем не менее, при локализации и накоплении в области опухоли, указанный мутант встретится с достаточным количеством фактора VIIa из плазмы, чтобы инициировать внешний путь коагуляции, приводя к опухолеспецифичному тромбозу. Экзогенный фактор VIIa также можно вводить пациенту.

Любой один или более из множества мутантов по активации фактора VII можно получить и использовать применительно к настоящему изобретению. Накоплено значительное количество научных знаний, касающихся сайтов узнавания фактора VII/VIIa на молекуле TF. Таким образом, должно быть очевидно, что участок активации фактора VII, как правило, расположен между приблизительно аминокислотой 157 и приблизительно аминокислотой 167 молекулы TF. Тем не менее, предполагается, что остатки, расположенные вне этого участка, также могут иметь отношение к активности активации фактора VII и, следовательно, можно рассматривать введение мутаций в любой один или более остатков, как правило, расположенных между приблизительно аминокислотой 106 и приблизительно аминокислотой 209 в последовательности TF (WO 94/07515; WO 94/28017; каждая из которых включена в данную заявку посредством ссылки).

Целый ряд других факторов свертывания крови можно применять в настоящем изобретении, примером которых являются агенты, описанные ниже. Тромбин, фактор V/Va и производные, фактор VIII/VIIIa и производные, фактор IX/IXa и производные, фактор X/Xa и производные, фактор XI/XIa и производные, фактор XII/XIIa и производные, фактор XIII/XIIIa и производные, активатор фактора X и активатор фактора V можно применять в настоящем изобретении.

Активатор фактора X из яда гадюки Рассела предполагается для применения в настоящем изобретении. Моноклональные антитела, специфичные к активатору фактора X, присутствующие в яде гадюки Рассела, также были получены, и их можно применять для специфичной доставки агента в составе биспецифичного связывающего лиганда.

Тромбоксан A<sub>2</sub> образуется из эндопероксидов путем последовательных действий ферментов цикло-оксигеназы и тромбоксансинтазы в микросомах тромбоцитов. Тромбоксан A<sub>2</sub> легко продуцируется тромбоцитами и представляет собой эффективный вазоконстриктор, вследствие его способности вызывать агрегацию тромбоцитов. Как тромбоксан A<sub>2</sub>, так и его активные аналоги, предполагаются для применения в настоящем изобретении.

Тромбоксансинтаза и другие ферменты, которые синтезируют активирующие тромбоциты простаг-

ландины, также можно применять в качестве "коагулянтов" в контексте настоящего изобретения. Известны моноклональные антитела к тромбоксансинтазе и ее иммуноаффинная очистка; а также кДНК тромбоксансинтазы человека.

$\alpha$ 2-Антиплазмин, или ингибитор  $\alpha$ 2-плазмина, представляет собой ингибитор протеиназы, обычно присутствующий в плазме человека, который функционирует, вызывая эффективное ингибирование лизиса фибриновых сгустков, индуцированного активатором плазминогена.  $\alpha$ 2-Антиплазмин является особенно эффективным ингибитором, и предполагается для применения в настоящем изобретении.

Так как доступна последовательность кДНК  $\alpha$ 2-антиплазмина, рекомбинантная экспрессия и/или слитые белки являются предпочтительными. Также доступны моноклональные антитела к  $\alpha$ 2-антиплазмину, которые можно применять в вариантах реализации настоящего изобретения с биспецифичным связывающим лигандом. Эти антитела можно применять для доставки экзогенного  $\alpha$ 2-антиплазмина к целевому сайту или чтобы получить эндогенный  $\alpha$ 2-антиплазмин и сконцентрировать его внутри целевой области.

### С3. Антитубулиновые лекарственные препараты.

Целый ряд лекарственных препаратов проявляет свое действие посредством препятствования активности тубулина. Так как функции тубулина необходимы для митоза и жизнеспособности клетки, некоторые "антитубулиновые лекарственные препараты" представляют собой эффективные химиотерапевтические агенты. "Антитубулиновые лекарственный препарат(ы)" в данной заявке означает любой агент, лекарственный препарат, пролекарство или их комбинацию, которые ингибируют митоз клетки, предпочтительно путем непосредственного или опосредованного ингибирования активности тубулина, необходимого для митоза клетки, предпочтительно полимеризации или деполимеризации тубулина.

Некоторые из наиболее хорошо известных и в настоящее время предпочтительных антитубулиновых лекарственных препаратов для применения согласно настоящему изобретению представляют собой колицин; таксаны, такие как таксол (паклитаксел) и доцетаксел; алкалоиды барвинка, такие как винбластин, винкристин и виндесцин; и комбретастатины. Другие подходящие антитубулиновые лекарственные препараты представляют собой цитохалазины (включая В, J, Е), доластатин, ауристатин РЕ, паклитаксел, устилоксин (ustiloxin) D, ризоксин, 1069C85, колцемид, альбендазол, азатоксин и нокодазол.

Как описано в патентах США №№ 5892069, 5504074 и 5661143, комбретастатины представляют собой производные эстрадиола, которые, как правило, ингибируют митоз клетки. Типичные комбретастатины, которые можно применять в соответствии с настоящим изобретением, включают такие, которые основаны на комбретастатине А, В и/или D, и такие, которые описаны в патентах США №№ 5892069, 5504074 и 5661143. Комбретастатины А-1, А-2, А-3, А-4, А-5, А-6, В-1, В-2, В-3 и В-4 являются типичными для описанных типов.

В патентах США №№ 5569786 и 5409953 описано выделение, структурное описание и синтез каждого из комбретастатинов А-1, А-2, А-3, В-1, В-2, В-3 и В-4 и лекарственные формы и способы применения таких комбретастатинов для лечения неопластического роста. Любой один или более таких комбретастатинов можно применять в соответствии с настоящим изобретением.

Комбретастатин А-4, как описано в патентах США №№ 5892069, 5504074, 5661143 и 4996237, также можно применять в соответствии с настоящим изобретением. В патенте США № 5561122 дополнительно описаны подходящие пролекарства с комбретастатином А-4, которые предполагаются для комбинированного применения с настоящим изобретением.

В патенте США № 4940726 особенно описаны макроциклические лактоны, названные "комбретастатин D-1" и "комбретастатин D-2", каждый из которых можно применять в комбинации с композициями и способами согласно настоящему изобретению. Патент США № 5430062 касается производных стильбена и аналогов комбретастатина с противораковой активностью, которые можно применять в комбинации с настоящим изобретением.

### С4. Антиангиогенные агенты.

Настоящее изобретение в частности обеспечивает комбинированные антиангиогенные агенты. Антитела человека согласно настоящему изобретению могут быть присоединены к ангиопозтину (Davis и Yancopoulos, 1999; Holash и др., 1999; включен в данную заявку посредством ссылки), такому как ангиопозтин-1 (Ang-1), ангиопозтин-2 (Ang-2), ангиопозтин-3 (мыши) или ангиопозтин-4 (человека) (Valenzuela и др., 1999; Kim и др., 1999).

Типичные антиангиогенные агенты для применения в соответствии с настоящим изобретением включают ангиостатин и эндостатин. Ангиостатин описан в патентах США 5776704; 5639725 и 5733876, каждый из которых включен в данную заявку посредством ссылки. Ангиостатин представляет собой белок, имеющий молекулярный вес между приблизительно 38 и приблизительно 45 кДа, что определили с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в восстановительных условиях, который включает приблизительно с 1 по 4 домены типа "двойная петля" (Kring regions) молекулы плазминогена. Ангиостатин обычно имеет последовательность аминокислот, по существу, аналогичную таковой для фрагмента плазминогена мыши, находящегося, начиная с аминокислоты номер 98 интактной молекулы плазминогена мыши.

Последовательность аминокислот ангиостатина слегка варьируется между видами. Например, в ангиостатине человека, указанная последовательность аминокислот является, по существу, аналогичной последовательности описанного выше фрагмента плазминогена мыши, хотя последовательность активного ангиостатина человека может начинаться с любой из аминокислот с номерами 97 или 99 интактной последовательности аминокислот плазминогена человека. Дополнительно плазминоген человека можно применять, так как он имеет аналогичную антиангиогенную активность, что показано на модели опухоли на мышах.

Ангиостатин и эндостатин стали объектами глубокого исследования, так как они представляют собой первые ингибиторы ангиогенеза, которые проявили способность не только ингибировать опухолевый рост, но также вызывать регрессию опухолей у мышей. Существует множество протеиназ, для которых было показано, что они позволяют получить ангиостатин из плазминогена, включая эластазу, металлоэластазу макрофагов (ММЕ), матрилизин (ММР-7) и 92 кДа желатиназу В/коллагеназу IV типа (ММР-9).

ММЕ может образовывать ангиостатин из плазминогена в опухолях, и колониестимулирующий фактор гранулоцитов-макрофагов (GM-CSF) повышает экспрессию ММЕ макрофагами, индуцируя продукцию ангиостатина. Роль ММЕ в продукции ангиостатина опирается на открытие того, что ММЕ действительно экспрессируется в клинических образцах печечно-клеточных карцином пациентов. Другой протеиназой, которую считают способной продуцировать ангиостатин, является стромелизин-1 (ММР-3). Было показано, что ММР-3 образует ангиостатинподобные фрагменты из плазминогена *in vitro*. Механизм действия ангиостатина в настоящее время неясен, выдвинута гипотеза, что он связывается с неидентифицированным рецептором клеточной поверхности на эндотелиальных клетках, вызывая запрограммированную клеточную гибель или митотический блок эндотелиальных клеток.

Эндостатин, похоже, еще более эффективен в качестве антиангиогенного и противоопухолевого агента и особенно предпочтителен для присоединения к блокирующим VEGFR2 антителам человека к VEGF. Эндостатин эффективно вызывает регрессию множества моделей опухолей на мышах. Опухоли не развивают устойчивость к эндостатину, и после множества циклов лечения опухоли входят в состояние покоя, во время которого они не увеличиваются в объеме. В этом состоянии покоя процент опухолевых клеток, подвергающихся апоптозу, был повышен, что давало популяцию, которая, по существу, оставалась того же размера.

Патент США № 5854205, выданный Folkman и O'Reilly, специально включенный в данную заявку посредством ссылки, относится к эндостатину и его применению в качестве ингибитора пролиферации эндотелиальных клеток и ангиогенеза. Белок эндостатина соответствует С-концевому фрагменту коллагена XVIII типа, и указанный белок может быть выделен из целого ряда источников. В патенте США № 5854205 также описано, что эндостатин может иметь последовательность аминокислот фрагмента коллагена XVIII типа, коллагена XV тип или предгастральной эстеразы BOVMPE 1. Комбинации эндостатина с другими антиангиогенными белками, особенно ангиостатином, также описаны в патенте США № 5854205, при этом комбинированные композиции способны эффективно вызывать регрессию опухолевого образования зависящих от ангиогенеза опухолей.

Эндостатин и ангиостатин, особенно эндостатин, являются предпочтительными агентами для доставки в опухоли согласно настоящему изобретению. Васкулостатин, канстатин и маспин также являются предпочтительными агентами. Белки, слитые с эндостатином, можно получить, как описано в патенте США № 6342221, включенном в данную заявку посредством ссылки. Также можно получить различные формы химически связанных конструкций эндостатина, примеры которых, также описаны в патенте США № 6342221.

#### C5. Индуцирующие апоптоз агенты.

Настоящее изобретение также можно применять для доставки агентов, которые индуцируют апоптоз, в любые клетки внутри опухоли, включая опухолевые клетки и эндотелиальные клетки сосудов опухоли. Хотя многие из противораковых агентов могут проявлять, как часть их механизма действия, вызывающий апоптоз эффект, некоторые агенты были обнаружены, сконструированы или выбраны с этим эффектом как первичным механизмом действия, как описано ниже.

При многих формах рака имеются мутации в генах опухолевых супрессоров, таких как p53. Инактивация p53 приводит к неспособности вызывать апоптоз. С этим нарушением раковые клетки прогрессируют в онкогенезе вместо того, чтобы направляться на клеточную гибель. Таким образом, доставка опухолевых супрессоров также предполагается для применения в настоящем изобретении, чтобы стимулировать клеточную гибель. Типичные опухолевые супрессоры включают, но не ограничены перечисленными, p53, ген ретинобластомы (Rb), опухоль Вильмса (WT1), bax  $\alpha$ , интерлейкин-1b-превращающий фермент и их семейство, ген MEN-1, нейрофиброматоз типа 1 (NF1), ингибитор cdk p16, ген колоректального рака (DCC), ген семейного аденоматоза толстой кишки (FAP), супрессорный ген множественных опухолей (MTS-1), BRCA1 и BRCA2.

Предпочтительными для применения являются гены p53 (патенты США №№ 5747469; 5677178; и 5756455; каждый из которых включен в данную заявку посредством ссылки), ретинобластомы, BRCA1 (патенты США №№ 5750400; 5654155; 5710001; 5756294; 5709999; 5693473; 5753441; 5622829 и

5747282; каждый из которых включен в данную заявку посредством ссылки), MEN-1 (номер доступа в GenBank U93236) и аденовируса E1A (патент США № 5776743; включен в данную заявку посредством ссылки).

Другие композиции, которые могут доставлять блокирующие VEGFR2 антитела человека к VEGF, включают гены, кодирующие связанный с фактором некроза опухоли лиганд, индуцирующий апоптоз TRAIL и полипептид TRAIL (патент США № 5763223; включен в данную заявку посредством ссылки); 24 кДа связанная с апоптозом протеиназа из патента США № 5605826 (включен в данную заявку посредством ссылки); Fas-связанный фактор 1, FAF1 (патент США № 5750653; включен в данную заявку посредством ссылки). Также предполагается для применения в этих аспектах настоящего изобретения введение интерлейкин-1 $\beta$ -превращающего фермента и членов его семейства, про которых также сообщали, что они стимулируют апоптоз.

Также можно применять соединения, такие как производные карбостирола (патенты США №№ 5672603 и 5464833; каждый из которых включен в данную заявку посредством ссылки); разветвленные апогенные пептиды (патент США № 5591717; включен в данную заявку посредством ссылки); ингибиторы фосфотирозина и негидролизуемые аналоги фосфотирозина (патенты США № 5565491 и 5693627; каждый из которых включен в данную заявку посредством ссылки); агонисты ретиноид-Х рецепторов (RXR) (патент США № 5399586; включен в данную заявку посредством ссылки); и даже антиоксиданты (патент США № 5571523; включен в данную заявку посредством ссылки). Ингибиторы тирозинкиназ, такие как генистеин, также могут быть связаны с агентами согласно настоящему изобретению, которые нацелены на рецептор клеточной поверхности VEGFR1 (что подтверждается патентом США № 5587459; включенным в данную заявку посредством ссылки).

"Второй происходящий из митохондрий активатор каспазы" (SMAC), также называемый DIABLO, представляет собой белок, который высвобождается из митохондрий во время апоптоза и связывается с семейством белков, названным "ингибитор белков апоптоза" (IAP). Уровни экспрессии IAP повышены во множестве опухолей человека. Следовательно, антагонисты IAP или миметики SMAC были разработаны как противораковые агенты. Их можно применять в соответствии с настоящим изобретением как в виде конъюгатов, так и в комбинированных методах лечения.

Типичные ингибиторы IAP включают такие, которые разработаны на основании кристаллической структуры взаимодействия SMAC с доменом BIR3 X-связанного IAP (XIAP, также называемый BIRC4), и моновалентные и бивалентные антагонисты IAP были сконструированы с применением основанного на структуре подхода (Vince и др., 2007; Varfolomeev и др., 2007). Миметики SMAC, сконструированные похожими на N-концевые аминокислоты SMAC, которые взаимодействуют с доменом BIR3 XIAP (Petersen и др., 2007), также можно применять. Было показано, что миметики SMAC могут индуцировать регрессию чувствительных ксенотрансплантатов рака легкого человека даже в виде единственных агентов, при этом 40% животных, которых лечили ими, оставались свободными от опухолей (Petersen и др., 2007).

#### С6. Цитокины.

Цитокины и хемокины представляют собой конкретные примеры агентов для присоединения к блокирующему VEGFR2 антителу человека к VEGF согласно настоящему изобретению. Можно применять множество цитокинов, включая IL-3, IL-4, IL-5, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-13, TGF- $\beta$ , M-CSF, G-CSF, TNF $\beta$ , LAF, TCGF, BCGF, TRF, BAF, BDG, MP, LIF, OSM, TMF, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ . Более предпочтительные цитокины включают IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-10, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , моноцитарный хемоаттрактантный белок-1 (MCP-1), тромбоцитарный фактор роста BB (PDGF-BB), C-реактивный белок (CRP) и т.п. Особенно предпочтительными примерами являются TNF $\alpha$ , индукторы TNF $\alpha$ , IL-2, IL-12, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$  и LEC.

IL-12, например, может быть присоединен к блокирующему VEGFR2 антителу человека к VEGF и использоваться, чтобы перенацеливать защитные реакции хозяина на атаку сосудов опухоли. Хемокин LEC (хемокин, экспрессируемый печенью, также называемый NCC-4, HCC-4 или LMC) представляет собой другой предпочтительный компонент (Giovarelli и др., 2000). LEC вызывает хемотаксис дендритных клеток, моноцитов, Т-клеток, NK-клеток и нейтрофилов и, следовательно, может улучшать опосредованные хозяином противоопухолевые реакции.

#### С7. Биологически функциональные эквиваленты.

Теперь можно получить эквиваленты или даже усовершенствования блокирующих VEGFR2 антител человека к VEGF согласно настоящему изобретению. Можно ввести модификации и изменения в структуру таких антител и все еще получить молекулу, имеющую подобные или иные желательные свойства. Например, некоторые аминокислоты могут быть замещены на другие аминокислоты в белковой структуре без заметной потери связывающей способности. Эти соображения также распространяются на токсины, антиангиогенные агенты, индуцирующие апоптоз агенты, коагулянты и т.п.

Поскольку именно способность взаимодействия и природа белка определяют биологическую функциональную активность этого белка, можно ввести некоторые замены последовательности аминокислот в белковую последовательность (или, разумеется, в лежащую в их основе последовательность ДНК) и,

тем не менее, получить белок с подобными (агонистическими) свойствами. Таким образом, предполагается, что можно ввести различные изменения в последовательность антител или терапевтических агентов (или в лежащие в их основе последовательности ДНК) без заметной потери их биологической пользы или активности. Биологически функциональные эквиваленты, полученные путем мутирования лежащей в их основе последовательности ДНК, можно получить, используя сведения о кодонах, приведенные в данном описании в табл. А, и вспомогательные технические подробности относительно сайт-специфичного мутагенеза.

Для квалифицированного специалиста также должно быть очевидно, что неотъемлемой частью определения "биологически функциональный эквивалентный" белок или пептид является тот принцип, что существует предел количества изменений, которые можно ввести в определенную часть молекулы и все еще получить молекулу с приемлемым уровнем эквивалентной биологической активности. Биологически функциональные эквивалентные белки и пептиды, таким образом, определены в данной заявке как такие белки и пептиды, в которых некоторые, но не большинство или не все, аминокислоты могут быть заменены. Разумеется, можно легко получить множество различных белков/пептидов с различными заменами и применять их в соответствии с настоящим изобретением. Такие "биологически функциональные эквивалентные" пептиды могут рассматриваться как дополнительные примеры "по существу, гомологичных" последовательностей, описанных в данной заявке.

Замены аминокислот, как правило, основаны на относительной аналогичности заместителей боковой цепи аминокислот, например, их гидрофобности, гидрофильности, заряде, размере и т.п. Анализ размера, формы и типа заместителей боковой цепи аминокислот показал, что аргинин, лизин и гистидин все являются положительно заряженными остатками; что аланин, глицин и серин все имеют аналогичный размер; и что фенилаланин, триптофан и тирозин все имеют, как правило, аналогичную форму. Следовательно, на основании этих соображений, аргинин, лизин и гистидин; аланин, глицин и серин; и фенилаланин, триптофан и тирозин; определены в данной заявке как биологически функциональные эквиваленты.

Для получения количественных изменений можно рассматривать индекс гидрофобности аминокислот. Каждой аминокислоте был присвоен индекс гидрофобности, исходя из их гидрофобности и заряженности: изолейцин (+4.5); валин (+4.2); лейцин (+3.8); фенилаланин (+2.8); цистеин/цистин (+2.5); метионин (+1.9); аланин (+1.8); глицин (-0.4); треонин (-0.7); серин (-0.8); триптофан (-0.9); тирозин (-1.3); пролин (-1.6); гистидин (-3.2); глутамат (-3.5); глутамин (-3.5); аспартат (-3.5); аспарагин (-3.5); лизин (-3.9) и аргинин (-4.5).

Важность индекса гидрофобности аминокислот для придания белку биологической функции взаимодействия, как правило, известна в данной области техники (Kyte и Doolittle, 1982, включен в данную заявку посредством ссылки). Известно, что некоторые аминокислоты могут быть заменены на другие аминокислоты, имеющие аналогичный индекс или значение гидрофобности, и при этом все еще сохранится аналогичная биологическая активность. При введении изменений на основании индекса гидрофобности замены аминокислот, чьи индексы гидрофобности находятся в диапазоне  $\pm 2$ , являются предпочтительными, с индексами в диапазоне  $\pm 1$  особенно предпочтительными и с индексами в диапазоне  $\pm 0,5$  еще более предпочтительными.

Таким образом, должно быть очевидно, что аминокислота может быть замещена на другую, имеющую аналогичное значение гидрофильности, и при этом все еще будет получен биологически эквивалентный белок. В патенте США № 4554101 (включен в данную заявку посредством ссылки) подробно описано, что аминокислотным остаткам были присвоены следующие значения гидрофильности: аргинин (+3.0); лизин (+3.0); аспартат (+3.0 $\pm$ 1); глутамат (+3.0 $\pm$ 1); серин (+0.3); аспарагин (+0.2); глутамин (+0.2); глицин (0); треонин (-0.4); пролин (-0.5 $\pm$ 1); аланин (-0.5); гистидин (-0.5); цистеин (-1.0); метионин (-1.3); валин (-1.5); лейцин (-1.8); изолейцин (-1.8); тирозин (-2.3); фенилаланин (-2.5); триптофан (-3.4).

При введении изменений на основании значений гидрофильности замены аминокислот, чьи значения гидрофильности находятся в диапазоне  $\pm 2$ , являются предпочтительными, с индексами в диапазоне  $\pm 1$  особенно предпочтительными и с индексами в диапазоне  $\pm 0,5$  еще более предпочтительными.

#### C8. Слитые белки и рекомбинантная экспрессия.

Блокирующее VEGFR2 антитело человека к VEGF или иммуноконъюгаты согласно настоящему изобретению можно легко получить в виде слитых белков, применяя методики молекулярной биологии. Любой слитый белок можно сконструировать и получить, применяя любой из терапевтических агентов, описанных в данной заявке и известных в данной области техники. Технологию слитых белков можно легко приспособить для получения слитых белков, в которых две части соединены избирательно расщепляемой пептидной последовательностью. Любой терапевтический агент может быть присоединен к концу антитела или к любой точке, отличной от гипервариабельных участков. Терапевтические агенты также можно получить целиком, при этом они предпочтительно связаны с избирательно расщепляемым пептидом, чтобы обеспечить высвобождение агента после нацеливания.

Применение методик рекомбинантной ДНК для достижения таких целей сейчас является стандартным способом для специалистов в данной области техники. Эти способы включают, например, методики

рекомбинантной ДНК *in vitro*, синтетические методики и рекомбинация *in vivo*/генетическая рекомбинация. Синтез ДНК и РНК можно дополнительно осуществить, применяя автоматизированные синтезаторы (см., например, методики, описанные в Sambrook и др., 1989; включенной в данную заявку посредством ссылки).

Получение такого слитого белка, как правило, включает получение первой и второй области, кодирующей ДНК, и функциональное лигирование или соединение таких областей, в пределах одной рамки считывания, для получения одного кодирующего участка, который кодирует желательный слитый белок. В контексте настоящего изобретения последовательность ДНК блокирующего VEGFR2 антитела человека к VEGF будет соединена в пределах одной рамки считывания с последовательностью ДНК, кодирующей терапевтический агент. Полагают, что обычно особенно не важно, какая часть конструкции получена в виде N-концевого участка, и какая в виде С-концевого участка.

Как только был получен желательный кодирующий участок создают вектор экспрессии. Векторы экспрессии включают один или более промоторов против хода транскрипции (*upstream*) от встроенных областей ДНК, который вызывает транскрипцию указанной ДНК и, таким образом, вызывает экспрессию кодируемого рекомбинантного белка. Это является значением термина "рекомбинантная экспрессия".

Чтобы получить так называемый "рекомбинантный" вариант блокирующего VEGFR2 антитела человека к VEGF согласно настоящему изобретению или его иммуноконъюгат, его экспрессируют в рекомбинантной клетке. Конструирование фрагмента(ов) ДНК для экспрессии в прокариотической или эукариотической системе можно осуществить с помощью методик, как правило, известных для специалистов в рекомбинантной экспрессии. Полагают, что можно использовать практически любую систему экспрессии для экспрессии блокирующего VEGFR2 антитела человека к VEGF или иммуноконъюгатных конструкций.

Такие белки можно успешно экспрессировать в эукариотических системах экспрессии, например в клетках CHO, тем не менее, представляется, что бактериальные системы экспрессии, такие как *E. coli* pQE-60, будут особенно полезны для крупномасштабного получения и последующей очистки блокирующего VEGFR2 антитела человека к VEGF или иммуноконъюгатов. кДНК также можно экспрессировать в бактериальных системах, в которых кодируемые белки экспрессируются в виде белков, слитых с  $\alpha$ -галактозидазой, убиквитином, глутатион-S-трансферазой *Schistosoma japonicum* и т.п.

Полагают, что бактериальная экспрессия будет иметь преимущества над эукариотической экспрессией в аспекте простоты использования и количества материала, полученного таким способом.

В аспекте микробной экспрессии патенты США №№ 5583013; 5221619; 4785420; 4704362 и 4366246 включены в данную заявку посредством ссылки с целью дополнительного пополнения настоящего описания информацией относительно экспрессии генов в рекомбинантных клетках-хозяевах.

Полученные рекомбинантным способом иммуноконъюгаты блокирующих VEGFR2 антител человека к VEGF можно очистить и ввести в состав лекарственной формы для введения человеку. В качестве альтернативы нуклеиновые кислоты, кодирующие указанные иммуноконъюгаты, можно доставить посредством генотерапии. Хотя можно использовать изолированные рекомбинантные ДНК или плазмиды, применение липосом или векторов является предпочтительным. Способность некоторых вирусов входить в клетки путем рецептор-опосредованного эндоцитоза, и встраиваться в геном клетки-хозяина и стабильно и эффективно экспрессировать вирусные гены сделало их привлекательными кандидатами для переноса чужеродных генов в клетки млекопитающих. Предпочтительные векторы для генотерапии для применения в настоящем изобретении, как правило, будут представлять собой вирусные векторы.

Ретровирусы имеют перспективы в качестве векторов доставки генов вследствие их способности встраивать свои гены в геном хозяина, переносить большое количество чужеродного генетического материала, инфицировать широкий спектр видов и типов клеток и упаковываться в особые линии клеток. Другие вирусы, такие как аденовирус, вирусы простого герпеса (HSV), цитомегаловирус (CMV) и аденоассоциированный вирус (AAV), такие как описанные в патенте США № 5139941 (включен в данную заявку посредством ссылки), также можно сконструировать для использования в качестве векторов для переноса генов.

Хотя некоторые вирусы, которые могут принимать чужеродный генетический материал, ограничены количеством нуклеотидов, которое они могут вместить, и диапазоном клеток, которые они могут инфицировать, было показано, что эти вирусы успешно влияют на экспрессию генов. Тем не менее, аденовирусы не встраивают свой генетический материал в геном хозяина и, следовательно, не требуют системы репликации хозяина для экспрессии генов, что делает их идеально подходящими для быстрой, эффективной, гетерологичной экспрессии генов. Методики получения инфицирующих вирусов с нарушением репликации хорошо известны в данной области техники.

В некоторых дополнительных вариантах реализации вектором для генотерапии будет являться HSV. Фактор, который делает HSV привлекательным вектором, представляет собой размер и устройство его генома. Так как HSV достаточно большой, включение множества генов или экспрессионных кассет менее проблематично, чем в других меньших вирусных системах. Вдобавок, доступность различных контрольных последовательностей вируса с различным действием (например, временным, сильным) делает возможным контроль экспрессии в большей степени, чем в других системах. Также преимуществом



является то, что указанный вирус имеет относительно немного вариантов сплайсинга, дополнительно облегчая генетические манипуляции. HSV также относительно легко манипулировать и можно выращивать его до высоких титров.

Разумеется, для применения систем вирусной доставки, потребуется достаточно хорошо очистить вирион, чтобы сделать его, по существу, свободным от нежелательных загрязнений, таких как мешающие дефектные вирусные частицы или эндотоксины и другие пирогены, таким образом, чтобы он не вызывал какие-либо нежелательные реакции в клетке, животном или индивиде, получающем векторную конструкцию. Предпочтительные средства для очистки вектора включают применение центрифугирования в градиентах плавучей плотности, таких как градиенты хлорида цезия.

#### C9. Конъюгаты антител.

Блокирующие VEGFR2 антитела человека к VEGF могут быть конъюгированы с противоклеточными или цитотоксическими агентами для получения "иммунотоксина"; или функционально связаны с компонентами, которые способны непосредственно или опосредованно стимулировать коагуляцию, таким образом формируя "коагулиганд". В коагулигандах антитело может быть непосредственно связано с фактором, непосредственно или опосредованно стимулирующим свертывание крови, или может быть связано со вторым участком связывания, который связывает и затем высвобождает фактор, непосредственно или опосредованно стимулирующий свертывание крови. В подходе со "вторым участком связывания", как правило, применяют коагулянтсвязывающее антитело в качестве второго участка связывания, таким образом позволяя получить конструкцию с биспецифичным антителом. Получение и применение биспецифичных антител обычно хорошо известно в данной области техники и дополнительно описано в данной заявке.

При получении иммунотоксина, коагулигандов и биспецифичных антител, можно использовать рекомбинантную экспрессию. Последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие выбранное антитело, присоединены в пределах одной рамки считывания к последовательности нуклеиновых кислот, кодирующей выбранный токсин, коагулянт или второй участок связывания, чтобы создать экспрессионную единицу или вектор. Рекомбинантная экспрессия приводит к трансляции новой нуклеиновой кислоты с получением желательного белкового продукта. Хотя используются нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела, вместо связывающих белок лигандов рекомбинантный подход, по существу, остается таким же, что и описанный выше в данной заявке.

Возвращаясь к конъюгатной технологии, получение иммунотоксина, как правило, хорошо известно в данной области техники. Тем не менее, можно достигнуть некоторых преимуществ путем применения некоторой предпочтительной технологии как при получении иммунотоксина, так и при их очистке для последующего клинического введения. Например, тогда как основанные на IgG иммунотоксины обычно проявляют лучшую связывающую способность и более медленный клиренс из крови, чем их Fab'-аналоги, основанные на Fab'-фрагменте иммунотоксина, как правило, проявляют лучшую способность проникать внутрь ткани по сравнению с основанными на IgG иммунотоксинами.

Дополнительно, хотя известно множество типов линкеров, включающих дисульфидную связь, которые можно успешно использовать для конъюгирования молекулы токсина с блокирующим VEGFR2 антителом человека к VEGF, некоторые линкеры, как правило, будут предпочтительными над другими линкерами на основании отличающихся фармакологических свойств и функциональных возможностей. Например, линкеры, которые включают дисульфидную связь, которая стерически "защищена", будут предпочтительными, вследствие их большей стабильности *in vivo*, таким образом предотвращая высвобождение молекулы токсина до связывания в месте действия.

Известно большое разнообразие цитотоксических агентов, которые можно конъюгировать с блокирующим VEGFR2 антителом человека к VEGF, включая токсины, полученные из растений, грибов и бактерий, такие как А-цепь рицина или дегликозилированная А-цепь. Перекрестное связывание А-цепи токсина с антителом в некоторых случаях требует перекрестно-сшивающего агента, в котором присутствуют дисульфидные функциональные группы. Причина этого неясна, но, вероятно, это является следствием необходимости того, чтобы некоторые молекулы токсина легко высвобождались от антитела, как только указанный агент "доставил" токсин к целевым клеткам.

Каждый тип перекрестно-сшивающего агента, а также способ осуществления перекрестного связывания, будет изменять фармакодинамику полученного конъюгата. В конечном счете, в случае, когда предполагается высвобождаемый токсин, будет желательно иметь конъюгат, который останется неизменным при условиях, характерных любой области организма, за исключением предполагаемого места действия, в котором желательно, чтобы конъюгат имел хорошие свойства "высвобождения". Следовательно, конкретная схема перекрестного связывания, включая, в частности, используемый конкретный перекрестно-связывающий реагент и структуры, которые перекрестно связаны, будут иметь некоторое значение.

В зависимости от конкретного соединения токсина, используемого как часть слитого белка, может быть необходимым получить пептидный спейсер, функционально связывающий антитело и соединение токсина, который способен складываться в связанную дисульфидными связями структуру петли. Протеолитическое расщепление петли затем позволит получить гетеродимерный полипептид, в котором анти-

тело и соединение токсина связаны только одной дисульфидной связью. Примером такого токсина является токсичная А-цепь рицина.

Если используются некоторые другие соединения токсина, может быть обеспечен нерасщепляемый пептидный спейсер, чтобы функционально присоединить блокирующее VEGFR2 антитело человека к VEGF к соединению токсина слитого белка. Токсины, которые можно применять в сочетании с нерасщепляемыми пептидными спейсерами, представляют собой такие, которые сами по себе могут превратиться в результате протеолитического расщепления в цитотоксическую связанную дисульфидными связями форму. Примером такого соединения токсина является соединение экзотоксина *Pseudomonas*.

Могут быть ситуации, например, когда целевой антиген не следует по пути, соответствующему эффективной интоксикации иммунотоксинами, в которых будет желательно нацелить химиотерапевтические агенты, такие как противоопухолевые лекарственные препараты, другие цитокины, антиметаболиты, алкилирующие агенты, гормоны и т.п. Целый ряд химиотерапевтических и других фармакологических агентов в настоящее время успешно конъюгирован с антителами, и показано, что они функционируют как фармакологические препараты. Типичные противоопухолевые агенты, которые были исследованы, включают доксорубин, дауномицин, метотрексат, винбластин и различные другие агенты. Более того, было описано присоединение других агентов, таких как неокарциостатин, макромидин, тренимон и  $\alpha$ -аманитин.

Если в настоящем изобретении используются факторы свертывания крови, любое ковалентное присоединение к антителу должно находиться в сайте, отличном от их функционального коагулирующего сайта. Композиции, таким образом, "связаны" любым функциональным способом, который позволяет каждому участку осуществлять предполагаемую функцию без значительного ее нарушения. Таким образом, антитело связывается с VEGF и фактор свертывания крови вызывает свертывание крови.

#### C10. Биохимические перекрестносвязывающие агенты.

Вдобавок к основным сведениям, приведенным выше, блокирующие VEGFR2 антитела человека к VEGF могут быть конъюгированы с одним или более терапевтическими агентами с применением некоторых предпочтительных биохимических перекрестно-связывающих агентов. Перекрестно-связывающие реагенты применяют, чтобы получить молекулярные мостики, которые связывают функциональные группы двух различных молекул. Чтобы связать два различных белка поэтапным способом, можно применять гетеробифункциональные перекрестно-связывающие агенты, которые исключают образование нежелательного гомополимера. Типичные гетеробифункциональные перекрестно-связывающие агенты описаны в табл. В.

Таблица В

Гетеробифункциональные перекрестно-связывающие агенты

| Линкер         | Реагирует с                             | Преимущества и применения                                                                                                  | Длина плеча спейсера после перекрестного связывания |
|----------------|-----------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| SMPT           | Первичные амины<br>Сульфидрилы          | Большая стабильность                                                                                                       | 11.2 Å                                              |
| SPDP           | Первичные амины<br>Сульфидрилы          | Тиолирование<br>Расщепляемое перекрестное связывание                                                                       | 6.8 Å                                               |
| LC-SPDP        | Первичные амины<br>Сульфидрилы          | Удлиненное плечо спейсера                                                                                                  | 15.6 Å                                              |
| Сульфо-LC-SPDP | Первичные амины<br>Сульфидрилы          | Удлиненное плечо спейсера<br>Водорастворимый                                                                               | 15.6 Å                                              |
| SMCC           | Первичные амины<br>Сульфидрилы          | Стабильная малеимидная реакционно-способная группа<br>Конъюгация фермент-антитело<br>Конъюгация гаптена с белком-носителем | 11.6 Å                                              |
| Сульфо-SMCC    | Первичные амины<br>Сульфидрилы          | Стабильная малеимидная реакционно-способная группа<br>Водорастворимый<br>Конъюгация фермент-антитело                       | 11.6 Å                                              |
| MBS            | Первичные амины<br>Сульфидрилы          | Конъюгация фермент-антитело<br>Конъюгация гаптена с белком-носителем                                                       | 9.9 Å                                               |
| Сульфо-MBS     | Первичные амины<br>Сульфидрилы          | Водорастворимый                                                                                                            | 9.9 Å                                               |
| SIAB           | Первичные амины<br>Сульфидрилы          | Конъюгация фермент-антитело                                                                                                | 10.6 Å                                              |
| Сульфо-SIAB    | Первичные амины<br>Сульфидрилы          | Водорастворимый                                                                                                            | 10.6 Å                                              |
| SMPB           | Первичные амины<br>Сульфидрилы          | Удлиненное плечо спейсера<br>Конъюгация фермент-антитело                                                                   | 14.5 Å                                              |
| Сульфо-SMPB    | Первичные амины<br>Сульфидрилы          | Удлиненное плечо спейсера<br>Водорастворимый                                                                               | 14.5 Å                                              |
| EDC/Сульфо-NHS | Первичные амины<br>Карбоксильные группы | Конъюгация гаптен-носитель                                                                                                 | 0                                                   |
| ABH            | Углеводы<br>Неизбирательно              | Реагирует с сахарными группами                                                                                             | 11.9 Å                                              |

Гетеробифункциональные перекрестно-связывающие агенты включают две реакционноспособные группы: одна, как правило, реагирует с первичной аминогруппой (например, N-гидроксисукцинимид) и другая, как правило, реагирует с тиольной группой (например, пиридилдисульфид, малеимиды, галогены и т.д.). Посредством первичной реакционноспособной аминогруппы, перекрестно-сшивающий агент может реагировать с остатком(ами) лизина одного белка (например, выбранного антитела или фрагмента) и посредством тиольной реакционноспособной группы перекрестно-сшивающий агент, уже связанный с первым белком, реагирует с остатком цистеина (свободной сульфгидрильной группой) другого белка (например, коагулянта).

Композиции, следовательно, как правило, включают или их делают включающими, функциональную группу, доступную для перекрестного связывания. Это требование не рассматривается ограничивающим, так как большое разнообразие групп можно применять таким способом. Например, первичные или вторичные аминогруппы, гидразидные или гидразиновые группы, карбоксильные, спиртовые, фосфатные или алкилирующие группы можно применять для связывания или перекрестного связывания.

Плечо спейсера между двумя реакционноспособными группами перекрестно-сшивающего агента может иметь различную длину и химический состав. Более длинное плечо спейсера обеспечивает лучшую гибкость компонентов конъюгата, тогда как некоторые конкретные компоненты в мостике (например, бензольная группа) могут придать дополнительную стабильность реакционноспособной группе или повышенную устойчивость химической связи к действию различных агентов (например, дисульфидная связь устойчива к восстанавливающим агентам). Применение пептидных спейсеров, таких как L-Leu-L-Ala-L-Leu-L-Ala, также предполагается.

Предпочтительно, чтобы использовался перекрестно-сшивающий агент, имеющий необходимую стабильность в крови. Известно множество типов линкеров, включающих дисульфидную связь, которые можно успешно использовать для конъюгирования антител и токсичных или коагулирующих агентов. Линкеры, которые включают дисульфидную связь, которая стерически защищена, могут обеспечивать большую стабильность *in vivo*, предотвращая высвобождение агента раньше, чем он связывается в месте действия. Эти линкеры, таким образом, представляют собой одну предпочтительную группу соединяющих агентов.

Одним из наиболее предпочтительных перекрестно-связывающих реагентов для применения в иммунотоксинах является SMPT, который представляет собой бифункциональный перекрестно-сшивающий агент, включающий дисульфидную связь, которая "стерически защищена" прилегающим бензольным кольцом и метильными группами. Полагают, что стерическая блокировка дисульфидной связи служит для защиты связи от атаки тиолят-анионов, таких как глутатион, который может присутствовать в ткани и крови и, тем самым, помогает предотвращать разъединение конъюгата перед тем, как присоединенный агент доставлен в место локализации опухоли. Предполагается, что агент SMPT также можно применять вместе с биспецифичными лигандами согласно настоящему изобретению.

Перекрестно-связывающий реагент SMPT, как и многие другие известные перекрестно-связывающие реагенты, проявляет способность перекрестно связывать функциональные группы, такие как SH-группа цистеина или группы первичных аминов (например, эпислон аминогруппа лизина). Другой возможный тип перекрестно-сшивающего агента включает гетеробифункциональные фотореактивные фенилазиды, включающие расщепляемую дисульфидную связь, такие как сульфосукцинимидил-2-(п-азидосалициламидо)этил-1,3'-дителиопропионат. N-гидроксисукцинимидильная группа реагирует с первичными аминогруппами и фенилазид (при фотолизе) реагирует неизбирательно с любым аминокислотным остатком.

Вдобавок к защищенным перекрестно-связывающим агентам, незащищенные линкеры также можно использовать в соответствии с настоящим изобретением. Другие полезные перекрестно-связывающие агенты, не включающие или не образующие защищенный дисульфид, включают SATA, SPDP и 2-иминотиолан. Применение таких перекрестно-связывающих агентов хорошо известно в данной области техники.

Как только произошло конъюгирование, конъюгат отделяют от неконъюгированных нацеливающих и терапевтических агентов и от других примесей. Множество методик очистки доступно для применения для обеспечения конъюгатов достаточной степени чистоты, чтобы сделать их клинически полезными. Способы очистки, основанные на разделении по размерам, такие как гель-фильтрация, гель-проникающая или высокоэффективная жидкостная хроматография, как правило, будут применяться наиболее часто. Также можно применять другие хроматографические методики, такие как разделение на голубой сефарозе.

#### C11. Биологически расщепляемые линкеры.

Хотя предпочтительно, чтобы любая соединяющая молекула имела необходимую стабильность в крови, чтобы предотвратить существенное высвобождение присоединенного агента перед нацеливанием на место развития заболевания или опухоли, в некоторых аспектах предполагается применение биологически расщепляемых связей и/или избирательно расщепляемых спейсеров или линкеров. "Биологически расщепляемые связи" и "избирательно расщепляемые спейсеры или линкеры" все же имеют необходимую стабильность в кровотоке.

Блокирующие VEGFR2 антитела человека к VEGF согласно настоящему изобретению, таким образом, могут быть связаны с одним или более терапевтическими агентами через биологически расщепляемую связь. Можно использовать любую форму блокирующего VEGFR2 антитела человека к VEGF, включая интактные антитела, хотя ScFv-фрагменты будут предпочтительными в некоторых вариантах реализации.

"Биологически расщепляемые связи" или "избирательно гидролизуемые связи" включают все связи, которые расщепляются, могут расщепляться или гидролизироваться только или предпочтительно при определенных условиях. Они включают дисульфидные и трисульфидные связи и неустойчивые к кислотам связи, описанные в патентах США №№ 5474765 и 5762918, каждый из которых специально включен в данную заявку посредством ссылки.

В частности, предполагается применение чувствительного к кислотам спейсера для присоединения терапевтического агента или лекарственного препарата к антителу согласно настоящему изобретению. В таких вариантах реализации терапевтические агенты или лекарственные препараты высвобождаются в кислых компартментах внутри клетки. Предполагается, что чувствительное к кислоте высвобождение может происходить внеклеточно, но только после специфичного нацеливания предпочтительно в место локализации опухоли. Некоторые в настоящее время предпочтительные примеры включают антитела человека, связанные с колхицином или доксорубицином через чувствительный к кислоте спейсер. Также предполагается присоединение через углеводные молекулы антител. В таких вариантах реализации терапевтические агенты или лекарственные препараты высвобождаются в кислых компартментах внутри клетки.

Антитело человека к VEGF также можно модифицировать, чтобы оно включало функциональные группы, позволяющие присоединение терапевтического агента(ов) через биологически расщепляемую связь. Антитело человека, таким образом, можно изменить, чтобы оно включало боковые цепи, оканчивающиеся гидразидной, гидразиновой, первичной amino- или вторичной аминогруппами. Терапевтические агенты могут быть конъюгированы через связь основания Шиффа, гидразоновую или ацилгидразоновую связь или гидразидный линкер (патенты США №№ 5474765 и 5762918, каждый из которых специально включен в данную заявку посредством ссылки).

Также в патентах США №№ 5474765 и 5762918, каждый из которых специально включен в данную заявку посредством ссылки, описано, что антитело человека к VEGF может быть функционально связано с терапевтическим агентом(ами) через одну или более биологически расщепляемых связей, которые представляют собой чувствительные к ферменту связи, включая пептидные связи, эфирные, амидные, фосфодиэфирные и гликозидные связи.

Предпочтительные аспекты настоящего изобретения относятся к применению пептидных линкеров, которые включают, по меньшей мере, первый сайт расщепления пептидазой и/или протеиназой, которая предпочтительно находится в месте развития заболевания, особенно в опухолевом окружении. Опосредованная антителом доставка присоединенного терапевтического агента, таким образом, завершается расщеплением именно в месте развития заболевания или в опухолевом окружении, в результате чего происходит специфичное высвобождение активного агента. Некоторые пептидные линкеры включают сайт расщепления, который узнается одним или более ферментами, вовлеченными в ремоделирование.

Пептидные линкеры, которые включают сайт расщепления урокиназой, проурокиназой, плазмином, плазминогеном, TGF $\beta$ , стафилокиназой, тромбином, фактором IXa, фактором Xa или металлопротеиназой, такой как интерстициальная коллагеназа, желатиназа или стромелизин, являются особенно предпочтительными. Патенты США №№ 6004555, 5877289 и 6093399 специально включены в данную заявку посредством ссылки с целью дополнительного описания и руководства относительно создания и применения конструкций нацеливающий агент-терапевтический агент, включающих биологически расщепляемые связи и избирательно расщепляемые линкеры и пептиды. Патенты США №№ 5877289 и 6342221, в частности, специально включены в данную заявку посредством ссылки с целью дополнительного описания и руководства относительно создания и применения конструкций антител, которые включают избирательно расщепляемый пептидный линкер, который расщепляется урокиназой, плазмином, тромбином, фактором IXa, фактором Xa или металлопротеиназой, такой как интерстициальная коллагеназа, желатиназа или стромелизин, в опухолевом окружении.

В настоящее время предпочтительные избирательно расщепляемые пептидные линкеры представляют собой такие, которые включают сайт расщепления плазмином или металлопротеиназой (также называемыми "матриксные металлопротеиназы" или "MMP"), такой как интерстициальная коллагеназа, желатиназа или стромелизин. Дополнительные пептидные линкеры, которые можно успешно применять в настоящем изобретении, включают, например, расщепляемые последовательности из проурокиназы, TGF $\beta$ , плазминогена, стафилокиназы, желатиназы A, различных коллагенов,  $\alpha_2$ M, PZP,  $\alpha_1$ M,  $\alpha_1$ I<sub>3</sub>(2J) и  $\alpha_1$ I<sub>3</sub>(27J), включая конкретные последовательности, описанные и заявленные в патенте США № 6342221, специально включенном в данную заявку посредством ссылки.

C12. Биспецифичные антитела.

Биспецифичные антитела особенно полезны в коагулигандном и комбинированных антиангиоген-

ных аспектах настоящего изобретения. Тем не менее, биспецифичные антитела, как правило, можно использовать при условии, что одно плечо связывается с VEGF, и биспецифичное антитело присоединено к терапевтическому агенту, как правило, в сайте, отличном от сайта связывания антигена.

Обычно получение биспецифичных антител также хорошо известно в данной области техники. Один способ включает отдельное получение антител, имеющих специфичность к целевому антигену, с одной стороны, и (как описано в данной заявке) коагулирующему агенту - с другой. Пепсиновые  $F(ab'\gamma)_2$ -фрагменты получают из двух выбранных антител, а затем восстанавливают каждый, чтобы получить отдельные  $Fab'\gamma_{SH}$ -фрагменты. SH-группы на одном из двух соединяемых партнеров затем алкилируют с помощью перекрестно-связывающего реагента, такого как о-фенилендималеимид, чтобы получить свободные малеимидные группы на одном партнере. Этого партнера можно затем конъюгировать с другим посредством тиоэфирного связывания, с получением желательного  $F(ab'\gamma)_2$ -гетероконъюгата. Известны другие методики, в которых осуществляют перекрестное связывание с SPDP или белком A, или получают триспецифичную конструкцию.

#### D. Фармацевтические композиции.

Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению, как правило, будут включать эффективное количество, по меньшей мере, первого блокирующего VEGFR2 антитела человека к VEGF или иммуноконъюгата, растворенного или диспергированного в фармацевтически приемлемом носителе или водной среде. Комбинированные лекарственные препараты также предполагаются, и можно использовать один и тот же тип базовых фармацевтических композиций как для отдельных, так и для комбинированных лекарственных средств.

Выражения "фармацевтически или фармакологически приемлемый" относятся к молекулярным единицам и композициям, которые не вызывают нежелательные, аллергические или другие побочные реакции при введении животному или человеку, в случае необходимости. Ветеринарные применения в равной мере включены в настоящее изобретение и "фармацевтически приемлемые" лекарственные формы включают лекарственные формы для любого из клинических и/или ветеринарных применений.

В данной заявке "фармацевтически приемлемый носитель" включает любой и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и отсрочивающие всасывание агенты и т.п. Применение таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ хорошо известно в данной области техники. За исключением случаев, когда какие-либо обычные среды или агент несовместимы с активным ингредиентом, предполагается их применение в терапевтической композиции. Для введения человеку препараты должны удовлетворять стерильности, пирогенности, общей безопасности и стандартам чистоты, требуемым Службой стандартов биопрепаратов Управления по контролю за продуктами питания и лекарственными средствами (FDA). Дополнительные активные ингредиенты также могут быть включены в композиции.

Лекарственные формы, содержащие "одну дозу", представляют собой такие, которые включают дозу или часть дозы вводимого ингредиента, приспособленную для отрегулированной по времени доставки. Например, типичные лекарственные формы, содержащие "одну дозу", представляют собой такие, которые включают ежедневную дозу или единицу или ежедневную часть дозы, или еженедельную дозу или единицу или еженедельную часть дозы и т.п.

#### D1. Инъецируемые лекарственные формы.

Антитела или иммуноконъюгаты с блокирующим VEGFR2 антителом человека к VEGF согласно настоящему изобретению чаще всего будут входить в состав лекарственной формы для парентерального введения, например входить в состав лекарственной формы для инъекции внутривенным, внутримышечным, подкожным, трансдермальным или другим таким путем, включая перистальтическое введение и непосредственное введение по каплям в место развития опухоли или заболевания (внутриполостное введение). Получение водной композиции, которая включает такое антитело или иммуноконъюгат в качестве активного ингредиента, должно быть очевидно для специалистов в данной области техники в свете настоящего описания. Обычно такие композиции можно получить в инъецируемом виде, в виде либо жидких растворов, либо суспензий; также можно получить твердые формы, подходящие для применения в приготовлении растворов или суспензий при добавлении жидкости перед инъекцией; и указанные препараты также можно эмульгировать.

Фармацевтические формы, подходящие для применения в виде инъекций, включают стерильные водные растворы или дисперсии; лекарственные формы, включающие кунжутное масло, арахисовое масло или водный пропиленгликоль; и стерильные порошки для немедленного получения стерильных инъецируемых растворов или дисперсий. Во всех случаях указанная форма должна быть стерильной и жидкой до такой степени, чтобы ее можно было вводить через шприц. Она должна быть стабильной при условиях производства и хранения и должна быть предохранена от контаминирующего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибки.

Композиции блокирующего VEGFR2 антитела человека к VEGF или иммуноконъюгата могут входить в состав стерильной водной композиции в нейтральной или солевой форме. Растворы в виде свободного основания или фармакологически приемлемых солей можно получить в воде, подходящим обра-

зом смешанной с поверхностно-активным веществом, таким как гидроксипропилцеллюлоза. Фармацевтически приемлемые соли включают соли присоединения кислоты (образованные со свободными аминоклассами белка) и соли, которые образованы с неорганическими кислотами, такими как, например, соляная или фосфорная кислоты, или такими органическими кислотами, как уксусная, трифторуксусная, щавелевая, винная, миндальная и т.п. Соли, образованные со свободными карбоксильными группами, также можно получить из неорганических оснований, таких как, например, гидроксиды натрия, калия, аммония, кальция или гидроокись железа, и таких органических оснований, как изопропиламин, триметиламин, гистидин, прокаин и т.п.

Подходящие носители включают растворители и дисперсионные среды, включающие, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.п.), подходящие их смеси и растительные масла. Во многих случаях будет предпочтительным включение изотонических агентов, например сахаров или хлорида натрия. Подходящую текучесть может быть поддерживать, например, с помощью применения покрытия, такого как лецитин, с помощью сохранения требуемого размера частиц в случае дисперсии и/или с помощью применения поверхностно-активных веществ.

При обычных условиях хранения и применения все такие препараты должны включать консервант для предотвращения роста микроорганизмов. Предотвращение воздействия микроорганизмов может быть обеспечено различными антибактериальными и противогрибковыми агентами, например, такими как парабены, хлорбутанол, фенол, сорбиновая кислота, тимеросал и т.п. Пролонгированное всасывание инъектируемых композиций может быть обеспечено применением в композициях агентов, отсрочивающих всасывание, например моностеарата алюминия и желатина.

Перед или после составления лекарственной формы блокирующее VEGFR2 антитело человека к VEGF или иммуноконъюгат следует тщательно диализировать, чтобы удалить нежелательные низкомолекулярные соединения, и/или лиофилизировать для получения более готовой лекарственной формы для растворения в желательной среде, когда это необходимо. Стерильные инъектируемые растворы получают путем включения активных агентов в требуемом количестве в подходящий растворитель с различными другими ингредиентами, перечисленными выше, при желании, а затем стерилизуют фильтрованием. Как правило, дисперсии получают путем включения различных стерилизованных активных ингредиентов в стерильную среду, которая включает основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты из перечисленных выше.

В случае стерильных порошков для получения стерильных инъектируемых растворов предпочтительные способы получения представляют собой методики вакуумной сушки и сушки сублимацией, которые позволяют получить порошок активного ингредиента вместе с любым дополнительным желательным ингредиентом из их раствора, предварительно стерилизованного фильтрацией.

Подходящие фармацевтические композиции в соответствии с настоящим изобретением, как правило, будут включать некоторое количество блокирующего VEGFR2 антитела человека к VEGF или иммуноконъюгата, смешанного с приемлемым фармацевтическим разбавителем или вспомогательным веществом, таким как стерильный водный раствор, с получением диапазона конечных концентраций, в зависимости от предполагаемого применения. Методики получения, как правило, хорошо известны в данной области техники и описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences, 16-е изд. Mack Publishing Company, 1980, включенном в данную заявку посредством ссылки. Должно быть очевидно, что включение эндотоксина должно быть на минимальном безопасном уровне, например менее чем 0,5 нг/мг белка. Более того, для введения человеку препараты должны удовлетворять стандартам стерильности, пирогенности, общей безопасности и чистоты, требуемым Службой стандартов биопрепаратов FDA. После составления лекарственной формы растворы антитела или иммуноконъюгата вводят способом, соответствующим лекарственной форме дозировки, и в таком количестве, которое терапевтически эффективно.

#### D2. Лекарственные формы с замедленным высвобождением.

Лекарственные формы растворов блокирующих VEGFR2 антител человека к VEGF или иммуноконъюгатов легко вводить во множестве лекарственных форм, таких как тип инъектируемых растворов, описанный выше, но также предполагаются другие фармацевтически приемлемые формы, например таблетки, пилюли, капсулы или другие твердые формы для перорального введения, суппозитории, пессарии, назальные растворы или спреи, аэрозоли, ингаляторы, топические лекарственные формы, липосомальные формы и т.п. Тип формы для введения будет соответствовать заболеванию или расстройству, от которого нужно лечить.

Можно применять фармацевтические капсулы с "медленным высвобождением" или композиции или препараты с "замедленным высвобождением", и они, как правило, пригодны. Лекарственные формы с медленным высвобождением, как правило, разработаны, чтобы обеспечить постоянный уровень лекарственного препарата на протяжении длительного периода, и их можно применять для доставки блокирующего VEGFR2 антитела человека к VEGF или иммуноконъюгата в соответствии с настоящим изобретением. Лекарственные формы с медленным высвобождением обычно вводят вблизи от места развития заболевания, например в месте развития опухоли.

Подходящие примеры препаратов с замедленным высвобождением включают полупроницаемые матрицы твердых гидрофобных полимеров, включающих антитело или иммуноконъюгат, эти матрицы

представляют собой изделия, имеющие определенную форму, например пленки или микрокапсулы. Примеры матриц с замедленным высвобождением включают полиэфиры; гидрогели, например поли(2-гидроксиэтилметакрилат) или поливиниловый спирт; полилактиды, например, см. патент США № 3773919; сополимеры L-глутаминовой кислоты и  $\gamma$ -этил-L-глутамата; неразлагаемый этиленвинилацетат; разлагаемые сополимеры молочной кислоты-гликолевой кислоты, такие как Lupron Depot<sup>TM</sup> (инъеклируемые микросферы, состоящие из сополимера молочной кислоты-гликолевой кислоты и лейпролида-ацетата); и поли-D-(-)-3-гидроксимасляную кислоту.

Тогда как полимеры, такие как этиленвинилацетат и молочная кислота-гликолевая кислота, обеспечивают высвобождение молекул в течение более 100 дней, некоторые гидрогели высвобождают белки в течение более коротких периодов времени. Если инкапсулированные антитела остаются в организме в течение продолжительного периода времени, они могут денатурировать или агрегировать в результате воздействия на них влажности при 37°C, таким образом, снижая биологическую активность и/или изменяя иммуногенность. Доступны целесообразные стратегии для стабилизации в зависимости от вовлеченного механизма. Например, если механизм агрегации включает образование межмолекулярной S-S связи посредством тиодисульфидного обмена, стабилизации достигают путем модифицирования сульфгидрильных остатков, лиофилизирования из кислых растворов, контролирования содержания влаги, применяя подходящие добавки, разработки композиций с определенными полимерными матрицами и т.п.

#### D3. Липосомы и наночастицы.

В некоторых вариантах реализации с блокирующими VEGFR2 антителами человека к VEGF или иммуноконъюгатами также можно применять липосомы и/или наночастицы. Получение и применение липосом, как правило, известно специалистам в данной области техники и описано ниже.

Липосомы получают из фосфолипидов, которые диспергируются в водной среде и самопроизвольно образуют многослойные концентрические бислойные везикулы (также называемые многослойными везикулами (MLV)). MLV, как правило, имеют диаметр от 25 нм до 4 мкм. Обработка MLV ультразвуком приводит к образованию малых однослойных везикул (SUV) с диаметрами в диапазоне от 200 до 500 Å, включающих водный раствор в центре.

Фосфолипиды могут образовывать целый ряд структур, отличных от липосом, когда их диспергируют в воде, в зависимости от молярного отношения липидов к воде. При низком отношении липосома представляет собой предпочтительную структуру. Физические свойства липосом зависят от pH, ионной силы и присутствия двухвалентных катионов. Липосомы могут проявлять низкую проницаемость для ионных и полярных веществ, но при повышенных температурах претерпевают фазовый переход, который заметно изменяет их проницаемость. Фазовый переход приводит к изменению плотно упакованной, упорядоченной структуры, также называемой гелеобразным состоянием, на неплотно упакованную, менее упорядоченную структуру, также называемую жидким состоянием. Это происходит при характерной температуре фазового перехода и приводит к увеличению проницаемости для ионов, сахаров и лекарственных препаратов.

Липосомы взаимодействуют с клетками посредством четырех различных механизмов: эндоцитоза фагоцитарными клетками ретикулоэндотелиальной системы, такими как макрофаги и нейтрофилы; адсорбции на клеточной поверхности, либо с помощью неспецифичных слабых гидрофобных или кулоновских сил, либо путем специфичных взаимодействий с компонентами клеточной поверхности; слияния с плазматической мембраной клетки путем внедрения липидного бислоя липосомы в плазматическую мембрану, с одновременным высвобождением содержимого липосом в цитоплазму; и путем переноса липосомальных липидов в клеточные или субклеточные мембраны, или наоборот, без какого-либо связывания содержимого липосом. Изменением лекарственной формы липосом можно влиять на то, какой механизм будет осуществляться, хотя одновременно может осуществляться более чем один механизм.

Наночапсулы, как правило, могут захватывать соединения стабильным и воспроизводимым способом. Чтобы избежать побочных эффектов вследствие избыточной внутриклеточной нагрузки полимерами, следует разработать такие ультратонкодисперсные частицы (размером около 0,1 мкм), применяя полимеры, способные разлагаться *in vivo*. Биоразлагаемые наночастицы из полиалкилцианоакрилата, которые удовлетворяют этим требованиям, предполагаются для применения в настоящем изобретении, и такие частицы можно легко получить.

#### D4. Офтальмические лекарственные формы.

Многие заболевания с ангиогенным компонентом связаны с глазами. Например, заболевания, связанные с неоваскуляризацией роговицы, которые можно лечить согласно настоящему изобретению, включают, но не ограничены перечисленными, диабетическую ретинопатию, ретинопатию недоношенных, отторжение имплантата роговицы, неоваскулярную глаукому и ретролентальную фиброплазию, эпидемический кератоконъюнктивит, дефицит витамина А, чрезмерное использование контактных линз, атопический кератит, верхний лимбальный кератит, сухой кератит птеригиума (pterygium keratitis sicca), синдром Шегрена, розовые угри, фликтенулез, сифилис, инфицирование микобактериями, разрушение липидов, химические ожоги, бактериальные язвы, грибковые язвы, инфицирование вирусом простого герпеса, инфицирование вирусом опоясывающего герпеса, инфицирование простейшими, саркому Ка-

поши, язву Морена, краевой дегенерации Терьена, краевой кератолиз, травму, ревматоидный артрит, системную волчанку, полиартериит, саркоидоз Вегенера, склерит, болезнь Стивенса-Джонсона, пемфигондую радиальную кератотомию и отторжение имплантата роговицы.

Заболевания, связанные с ретинальной/хороидальной неоваскуляризацией, которые можно лечить согласно настоящему изобретению, включают, но не ограничены перечисленными, диабетическую ретинопатию, дистрофию желтого пятна, серповидноклеточную анемию, саркоид, сифилис, эластическую псевдоксантому, болезнь Педжета, закупорку вен, закупорку артерии, обструктивную болезнь сонных артерий, хронический увеит/витрит, инфицирование микобактериями, болезнь Лайма, системную красную волчанку, ретинопатию недоношенных, болезнь Илза, болезнь Бехчета, инфицирование, вызывающее ретинит или хориоидит, предполагаемый гистоплазмоз глаз, болезнь Беста, миопию, ямку диска зрительного нерва, болезнь Штаргардта, средний увеит (*pars planitis*), хроническое отслоение сетчатки, синдромы повышенной вязкости крови, токсоплазмоз, травму и осложнения после лазерной хирургии.

Другие заболевания, которые можно лечить согласно настоящему изобретению, включают, но не ограничены перечисленными, заболевания, связанные с рубецом (неоваскуляризация радужки), и заболевания, вызванные аномальной пролиферацией фиброваскулярной или фиброзной ткани, включая все формы пролиферативной витреоретинопатии, связанные с диабетом или нет.

Блокирующие VEGFR2 антитела человека к VEGF и иммуноконъюгаты согласно настоящему изобретению, таким образом, можно успешно применять для получения фармацевтических композиций, подходящих для применения в качестве офтальмических растворов, включая растворы для внутривитреального введения и/или введения внутрь камеры, либо в виде отдельного агента, либо в комбинации с другими офтальмологическими лекарственными препаратами или агентами. Для лечения любого из описанных или других расстройств композицию с блокирующим VEGFR2 антителом человека к VEGF согласно настоящему изобретению можно вводить в глаз или глаза субъекта, нуждающегося в лечении, в виде офтальмического препарата, полученного в соответствии с обычной фармацевтической практикой, см., например, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15-е изд., стр. с 1488 по 1501 (Mack Publishing Co., Истон, Пенсильвания).

Офтальмические препараты будут включать, по меньшей мере, блокирующее VEGFR2 антитело человека к VEGF в концентрации от приблизительно 0,01 до приблизительно 1 мас.%, предпочтительно от приблизительно 0,05 до приблизительно 0,5% в фармацевтически приемлемом растворе, суспензии или мази. Некоторые вариации концентрации обязательно возникнут в зависимости от конкретного используемого соединения, состояния субъекта, от которого нужно лечить, и т.п., и человек, отвечающий за лечение, будет определять наиболее подходящую концентрацию для конкретного субъекта. Офтальмические препараты предпочтительно будут находиться в форме стерильного водного раствора, включающего, при желании, дополнительные ингредиенты, например консерванты, буферы, агенты, регулирующие тоничность, антиоксиданты и стабилизаторы, неионные смачивающие или осветляющие агенты, повышающие вязкость агенты и т.п.

Подходящие консерванты для применения в таком растворе включают хлорид бензалкония, хлорид бензетония, хлорбутанол, тимеросал и т.п. Подходящие буферы включают борную кислоту, бикарбонат натрия и калия, бораты натрия и калия, карбонат натрия и калия, ацетат натрия, бифосфат натрия и т.п. в количествах, достаточных для поддержания pH на уровне между приблизительно pH 6 и pH 8, предпочтительно между приблизительно pH 7 и pH 7.5. Подходящие агенты, регулирующие тоничность, представляют собой декстран 40, декстран 70, декстрозу, глицерин, хлорид калия, пропиленгликоль, хлорид натрия и т.п., при этом эквивалент офтальмического раствора по хлориду натрия лежит в диапазоне 0,9 плюс или минус 0,2%.

Подходящие антиоксиданты и стабилизаторы включают бисульфит натрия, метабисульфит натрия, тиосульфит натрия, тиомочевину и т.п. Подходящие смачивающие и осветляющие агенты включают полисорбат 80, полисорбат 20, полксамер 282 и тилоксапол. Подходящие повышающие вязкость агенты включают декстран 40, декстран 70, желатин, глицерин, гидроксипропилцеллюлозу, гидроксиметилпропилцеллюлозу, ланолин, метилцеллюлозу, вазелин, полиэтиленгликоль, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон, карбоксиметилцеллюлозу и т.п. Офтальмический препарат должен вводиться топически на поверхность глаза субъекта, нуждающегося в лечении, с помощью обычных способов, например в форме капель или путем промывания глаза в офтальмическом растворе.

#### D5. Топические лекарственные формы.

В наиболее широком смысле лекарственные формы для топического введения включают такие, которые доставляются через рот (буккально) и через кожу. "Топические системы доставки" также включают трансдермальные пластыри, включающие ингредиент для введения. Доставку через кожу можно дополнительно осуществить с помощью ионтофореза или электропереноса, при необходимости.

Лекарственные формы, подходящие для топического введения в рот, включают таблетки для рассасывания, включающие ингредиенты в ароматизированной основе, как правило, в сахарозе и гуммиарабике или трагаканте; пастилки, включающие активный ингредиент в инертной основе, такой как желатин и глицерин, или сахароза и гуммиарабик; и жидкости для полоскания рта, включающие ингредиент, который нужно ввести, в подходящем жидком носителе.



Лекарственные формы, подходящие для топического введения в кожу, включают мази, кремы, гели и пасты, включающие ингредиент, который нужно ввести, в фармацевтический приемлемый носитель. Лекарственная форма блокирующих VEGFR2 антител человека к VEGF для топического применения, такого как в виде кремов, мазей и гелей, включает получение маслянистой или водорастворимой основы мази, хорошо известной специалистам в данной области техники. Например, эти композиции могут включать растительные масла, животные жиры и более предпочтительно полутвердые углеводороды, полученные из нефти. Конкретные используемые компоненты могут включать белую мазь, желтую мазь, воск цетиловых эфиров, масляную кислоту, оливковое масло, парафин, вазелин, белый вазелин, спермацет, смесь крахмала с глицерином, белый воск, желтый воск, ланолин, безводный ланолин и глицерилмоностеарат. Также можно применять различные водорастворимые основы для мазей, включая гликолевые эфиры и их производные, полиэтиленгликоли, полиоксил-40-стеарата и полисорбаты.

Лекарственные формы для ректального введения могут быть представлены в виде суппозитория с подходящей основой, включающей, например, масло какао или салицилат. Лекарственные формы, подходящие для вагинального введения, могут быть представлены в виде лекарственных форм pessaries, тампонов, кремов, гелей, паст, пенок или спреев, включающих, вдобавок к активному ингредиенту, такие носители, которые известны в данной области техники как подходящие.

#### D6. Назальные лекарственные формы.

Местная доставка назальным и респираторным путями предполагается для лечения различных состояний. Эти пути доставки также подходят для доставки агентов в кровоток. Лекарственные формы активных ингредиентов в носителях, подходящих для назального введения, следовательно, также включены в настоящее изобретение, например, назальные растворы, спреи, аэрозоли и ингаляторы. Если носитель твердый, лекарственные формы включают крупный порошок, включающий частицы размером, например, в диапазоне от 20 до 500 мкм, который вводят, например, путем быстрой ингаляции через носовой ход из контейнера с порошком, который держат близко к носу.

Подходящие лекарственные формы, в которых носителем является жидкость, полезны для назального введения. Назальные растворы, как правило, представляют собой водные растворы, разработанные для введения в носовые ходы в виде капель или спреев, и их получают таким образом, чтобы они были аналогичными во многих отношениях носовому секрету так, чтобы сохранялось нормальное функционирование ресничек. Таким образом, водные назальные растворы, как правило, являются изотоническими и немного забуференными, чтобы поддерживать pH от 5.5 до 6.5. Вдобавок, противомикробные консерванты, аналогичные используемым в офтальмических препаратах, и подходящие стабилизаторы лекарственных препаратов, в случае необходимости, также можно включить в указанную лекарственную форму. Различные промышленные назальные препараты известны и включают, например, антибиотики и антигистаминные средства и используются для профилактики астмы.

Средства для ингаляции и ингаляторы представляют собой фармацевтические препараты, разработанные для доставки лекарственного препарата или соединения в респираторное дерево пациента. Средство для ингаляции или аэрозоль вводится и достигает поврежденной области. Этот путь также можно применять для доставки агентов в кровоток. Ингаляции можно вводить через назальные или пероральные респираторные пути. Введение ингаляционных растворов эффективно лишь в том случае, если капли достаточно мелкие и одинакового размера, такие, чтобы аэрозоль достиг бронхов.

Другая группа продуктов, также называемая ингаляциями, и иногда называемая инсуффляциями, включает тонкоизмельченные или жидкие лекарственные препараты, которые доставляются в респираторные пути с помощью специальных систем доставки, таких как фармацевтические аэрозоли, в которых раствор или суспензия лекарственного препарата находится в пропелленте из сжиженного газа. После высвобождения через подходящий клапан и пероральный адаптер, отмеренная доза средства для ингаляции вдывается в респираторный тракт пациента. Размер частиц имеет весьма существенное значение для введения этого типа препаратов. Сообщалось, что оптимальный размер частиц для проникновения в полость легкого имеет порядок от 0,5 до 7 мкм. Мелкодисперсный туман производится находящимися под давлением аэрозолями, и, следовательно, их применение считают полезным.

#### Е. Терапевтические наборы.

Настоящее изобретение также обеспечивает терапевтические наборы, включающие блокирующее VEGFR2 антитело человека к VEGF или иммуноконъюгат для применения в способах лечения согласно настоящему изобретению. Такие наборы, как правило, будут включать в подходящих средствах для хранения фармацевтически приемлемую лекарственную форму по меньшей мере одного блокирующего VEGFR2 антитела человека к VEGF или иммуноконъюгата. Указанные наборы также могут включать другие фармацевтически приемлемые лекарственные формы, либо для диагностики/визуализации, либо для комбинированной терапии. Например, такие наборы могут включать любой один или более из множества химиотерапевтических или радиотерапевтических лекарственных препаратов; антиангиогенных агентов; антител против опухолевых клеток и/или направленных против сосудистой сети опухоли или направленных против стромы опухоли иммуноотоксинов или коагулирантов.

Указанные наборы могут находиться в одном контейнере (средстве для хранения), который включает блокирующее VEGFR2 антитело человека к VEGF или иммуноконъюгат с любыми дополнительными

ми компонентами или без них, или они могут находиться в различных контейнерах для каждого желательного агента. Если предусмотрено комбинированное лечение, один раствор может быть заранее смешан, либо в молярно эквивалентной комбинации, либо при избыточном содержании одного компонента над другим. В качестве альтернативы каждый из компонентов набора: блокирующее VEGFR2 антитело человека к VEGF или его иммуноконъюгат и другой противораковый агент, могут храниться отдельно в различных контейнерах перед введением пациенту.

Если компоненты набора предусмотрены в виде одного или более жидких растворов, указанный жидкий раствор предпочтительно представляет собой водный раствор, при этом стерильный водный раствор является особенно предпочтительным. Тем не менее, компоненты набора могут быть предусмотрены в виде высушенного порошка(ов). Если реагенты или компоненты предусмотрены в виде сухого порошка, можно восстановить влагосодержание указанного порошка путем добавления подходящего растворителя. Представляется, что растворитель также может быть предусмотрен в другом контейнере.

Контейнеры из набора, как правило, будут включать по меньшей мере одну ампулу, пробирку, колбу, бутылку, шприц или другие средства для хранения, в которые блокирующее VEGFR2 антитело человека к VEGF или его иммуноконъюгат и любой другой желательный агент могут быть помещены и предпочтительно подходящим образом разделены на аликвоты. Если включены отдельные компоненты, набор будет также, как правило, включать вторую ампулу или другой контейнер, в который они помещены, обеспечивая введение разделенных предусмотренных доз. Наборы также могут включать второй/третий контейнер, предназначенные для включения стерильного, фармацевтически приемлемого буфера или другого разбавителя.

Указанные наборы также могут включать средства, с помощью которых можно вводить блокирующее VEGFR2 антитело человека к VEGF или иммуноконъюгат животному или пациенту, например, одну или более игл или шприцев, или даже глазную пипетку, пипетку или другой подобный инструмент, которым лекарственную форму можно инъектировать животному или применять на области тела, пораженной заболеванием. Наборы согласно настоящему изобретению также обычно включают средства, содержащие в себе ампулы, или т.п., и другой компонент, удерживающие их в близком положении, для продажи на рынке, такие как, например, изготовленные литьем под давлением или выдувным формованием пластиковые контейнеры, в которые помещены и хранятся необходимые ампулы и другие инструменты.

#### Г. Антиангиогенная терапия.

Настоящее изобретение можно применять для лечения животных и пациентов с нарушенным ангиогенезом, который способствует множеству заболеваний и расстройств, либо отдельно, либо в комбинированных методах лечения. Наиболее широко распространенные и/или клинически важные из них, не относящиеся к области лечения рака, включают артрит, ревматоидный артрит, псориаз, атеросклероз, диабетическую ретинопатию, возрастную дистрофию желтого пятна, болезнь Грейвса, сосудистый рестеноз, включая рестеноз, возникающий после ангиопластики, артериовенозные мальформации (AVM), менингиому, гемангиому и неоваскулярную глаукому. Другие потенциальные мишени для вмешательства включают ангиофиброму, атеросклеротические бляшки, неоваскуляризацию имплантата роговицы, гемофилическую артропатию, гипертрофические рубцы, синдром Ослера-Вебера, пиогенную гранулему, ретролентальную фиброплазию, склеродермию, трахому, сосудистые адгезии, синовит, дерматит, различные другие воспалительные заболевания и расстройства и даже эндометриоз. Дополнительные заболевания и расстройства, которые можно лечить с помощью настоящего изобретения, и комплексная основа таких ангиогенных расстройств описаны ниже.

Одним заболеванием, в которое вовлечен ангиогенез, является ревматоидный артрит, при котором кровеносные сосуды в синовиальной выстилке суставов перетерпевают ангиогенез. Вдобавок к образованию новых сосудистых сетей, эндотелиальные клетки высвобождают факторы и активные формы кислорода, которые приводят к росту паннуса и разрушению хряща. Факторы, вовлеченные в ангиогенез, могут активно участвовать и способствовать поддержанию хронически воспаленного состояния - ревматоидного артрита. Факторы, связанные с ангиогенезом, также играют роль в остеоартрите, способствуя разрушению сустава.

Narada и др. (1998, специально включен в данную заявку посредством ссылки) показали, что VEGF участвует в патогенезе ревматоидного артрита и, более того, что измерение концентрации VEGF в сыворотке является неинвазивным, полезным способом наблюдения за активностью заболевания ревматоидным артритом. Это поддерживает терапевтические и диагностические применения настоящего изобретения для лечения ревматоидного артрита.

Nagashima и др. (1999, специально включен в данную заявку посредством ссылки) описали ингибиторные эффекты противоревматических лекарственных препаратов на VEGF в культивируемых ревматоидных синовиальных клетках. VEGF конститутивно экспрессируется в синовиальной мембране при ревматоидном артрите. Было показано, что известный противоревматический лекарственный препарат, буцилламин (BUC), в своем механизме действия включает ингибирование продукции VEGF синовиальными клетками. Таким образом, противоревматические эффекты BUC опосредованы супрессией ангиогенеза и синовиальной пролиферацией в артритической синовиальной мембране посредством ингибирования производства VEGF синовиальными клетками. Применение настоящего изобретения в качестве

противоартритической терапии опирается на ингибирующие VEGF действия этого существующего лекарственного препарата.

Другой пример заболевания, опосредованного ангиогенезом, представляет собой офтальмологическое неоваскулярное заболевание. Это заболевание описывается инвазией новых кровеносных сосудов в структуры глаза, такие как сетчатка или роговица. Оно представляет собой наиболее частую причину слепоты и участвует в приблизительно двадцати заболеваниях глаз. При возрастной дистрофии желтого пятна связанные с этим зрительные проблемы вызваны прорастанием капилляров сосудистой оболочки глаза через нарушения в оболочке Бруха с пролиферацией сосудисто-волоконистой ткани под ретинальным пигментным эпителием. Ангиогенное повреждение также связано с диабетической ретинопатией, ретинопатией недоношенных, отторжением имплантата роговицы, неоваскулярной глаукомой и ретролентальной фиброплазией.

Другие заболевания, связанные с неоваскуляризацией роговицы, включают, но не ограничены перечисленными, эпидемический кератоконъюнктивит, дефицит витамина А, чрезмерное использование контактных линз, атопический кератит, верхний лимбальный кератит, сухой кератит птеригиума (*pterygium keratitis sicca*), синдром Шегрена, розовые угри, фликтенулез, сифилис, инфицирование микобактериями, разрушение липидов, химические ожоги, бактериальные язвы, грибковые язвы, инфицирование вирусом простого герпеса, инфицирование вирусом опоясывающего герпеса, инфицирование простейшими, саркому Капоши, язву Морена, краевую дегенерацию Терье, краевой кератолит, ревматоидный артрит, системную волчанку, полиартериит, травму, саркоидоз Вегенера, склерит, болезнь Стивенса-Джонсона, пемфигоидную радиальную кератотомию и отторжение трансплантата роговицы.

Заболевания, связанные с ретинальной/хориоидальной неоваскуляризацией, включают, но не ограничены перечисленными, диабетическую ретинопатию, дистрофию желтого пятна, включая возрастную дистрофию желтого пятна (AMD), серповидноклеточную анемию, саркоид, сифилис, эластическую псевдоксантому, болезнь Педжета, закупорку вен, закупорку артерии, обструктивную болезнь сонных артерий, хронический увеит/витрит, инфицирование микобактериями, болезнь Лайма, системную красную волчанку, ретинопатию недоношенных, болезнь Илза, болезнь Бехчета, инфекции, вызывающие ретинит или хориоидит, предполагаемый офтальмологический гистоплазмоз, болезнь Беста, миопию, ямку диска зрительного нерва, болезнь Штаргардта, средний увеит (*pars planitis*), хроническое отслоение сетчатки, синдромы повышенной вязкости крови, токсоплазмоз, травму и осложнения после лазерной хирургии.

Что касается хориоидальной неоваскуляризации, такой как связанная с дистрофией желтого пятна, AMD и другими офтальмологическими заболеваниями, блокирующие VEGFR2 антитела человека к VEGF согласно настоящему изобретению особенно хорошо подходят для применения для ее лечения. Это происходит, отчасти, благодаря тому, что они, по существу, блокируют связывание VEGF с VEGFR2, но, по существу, не блокируют связывание VEGF с VEGFR1 и приносят пользу для глаз (Nozaki и др., 2006), что выделяет другое преимущество настоящего изобретения над существующими лекарствами против VEGF, такими как, например, Авастин и родственный продукт Луцентис®.

Другие заболевания включают, но не ограничены перечисленными, заболевания, связанные с покраснением радужки (неоваскуляризацией радужки), и заболевания, вызванные аномальной пролиферацией фиброваскулярной или фиброзной ткани, включая все формы пролиферативной витреоретинопатии.

Хроническое воспаление также включает патологический ангиогенез. Такие болезненные состояния, как язвенный колит и болезнь Крона, проявляют гистологические изменения с прорастанием новых кровеносных сосудов в воспаленные ткани. Бартонеллез, бактериальная инфекция, обнаруживаемая в Южной Америке, может привести к хронической стадии, которая описывается пролиферацией эндотелиальных клеток сосудов.

Другая патологическая роль, связанная с ангиогенезом, обнаруживается при атеросклерозе. Было показано, что бляшки, образующиеся в просвете кровеносных сосудов, имеют стимулирующую ангиогенез активность. Экспрессия VEGF при коронарных атеросклеротических повреждениях у человека была продемонстрирована у Inoue и др. (1998, специально включен в данную заявку посредством ссылки). Это свидетельствует о патофизиологической значимости VEGF в прогрессировании коронарного атеросклероза человека, а также в процессах восстановления проходимости сосудов при обструктивных коронарных заболеваниях. Настоящее изобретение обеспечивает эффективное лечение таких патологических состояний.

Одним из наиболее часто встречающихся ангиогенных заболеваний в детском возрасте является гемангиома. В большинстве случаев опухоли являются доброкачественными и регрессируют без вмешательства. В более тяжелых случаях опухоли прогрессируют до больших кавернозных и инфильтрирующих форм и вызывают клинические осложнения. Системные формы гемангиом, гемангиоматозы, приводят к высокому уровню смертности. Существуют устойчивые к терапии гемангиомы, которые нельзя вылечить лекарствами, используемыми в настоящее время.

Ангиогенез также ответствен за повреждение, обнаруживаемое при наследственных заболеваниях, таких как заболевание Ослера-Вебера-Рандю, или наследственная геморрагическая телеангиэктазия. Это наследственное заболевание, характеризующееся множеством небольших ангиом, опухолей кровенос-

ных или лимфатических сосудов. Ангиомы обнаруживаются в коже и слизистых оболочках и часто сопровождаются эпистаксисом (носовыми кровотечениями) или кровотечениями в желудочно-кишечном тракте и иногда легочным или печеночным артериовенозным свищом.

Ангиогенез также вовлечен в нормальные физиологические процессы, такие как размножение и заживление ран. Ангиогенез является важным этапом при овуляции, а также при имплантации бластулы после оплодотворения. Предотвращение ангиогенеза можно применять, чтобы вызвать аменорею, блокировать овуляцию или предотвратить имплантацию бластулы.

При заживлении ран избыточное восстановление или фиброплазия может быть неблагоприятным побочным эффектом хирургических процедур и может быть вызвана или усилена ангиогенезом. Спайки представляют собой часто встречающиеся осложнения после хирургического вмешательства и приводят к таким проблемам, как непроходимость тонкой кишки.

Заболевания и расстройства, характеризующиеся нежелательной сосудистой проницаемостью, также можно лечить согласно настоящему изобретению. Такие заболевания включают эдему, связанную с опухлями мозга, асцит, связанный со злокачественными новообразованиями, синдром Мейгса, воспаление легких, нефротический синдром, перикардиальный выпот и плевральный выпот, как описано в WO 98/16551, специально включенной в данную заявку посредством ссылки.

Каждое из перечисленных заболеваний и расстройств, наряду со всеми типами опухолей, описанными в следующих разделах, можно эффективно лечить, как описано в настоящем изобретении согласно практике, принятой в данной области техники, как описано, например, в патенте США № 5712291 (специально включенном в данную заявку посредством ссылки), в котором обобщены преимущества от применения антиангиогенных стратегий для лечения ангиогенных заболеваний. Более того, конкретно патент США № 6524583 включен в данную заявку посредством ссылки в целях как включения дополнительного описания, так и обеспечения возможности лечения широкого диапазона заболеваний и расстройств с применением антитела к VEGF.

Антитела человека и/или иммуноконъюгаты согласно настоящему изобретению наиболее предпочтительно применяют при лечении опухолей. Опухоли, для которых важен ангиогенез, включают злокачественные опухоли, и доброкачественные опухоли, такие как акустическая невринома, нейрофиброма, трахома и пиогенные гранулемы. Ангиогенез имеет особенное значение в образовании и метастазировании солидных опухолей. Тем не менее, ангиогенез также связан с гемопоэтическими опухолями, такими как лейкемии, и различными острыми или хроническими неопластическими заболеваниями костного мозга, при которых происходит неограниченная пролиферация белых кровяных клеток, как правило, сопровождаемая анемией, нарушенным свертыванием крови и увеличением лимфатических узлов, печени и селезенки. Ангиогенез также играет роль в аномалиях в костном мозге, которые приводят к подобным лейкомиам опухолям.

Ангиогенез важен на двух этапах метастазирования опухоли. При васкуляризации первичной опухоли ангиогенез позволяет клеткам войти в кровоток и циркулировать по всему организму. После того как опухолевые клетки оставили первичное место и осели во вторичном месте метастазирования, должен произойти ангиогенез перед тем, как новая опухоль сможет вырасти и увеличиться в объеме. Следовательно, предотвращение ангиогенеза может предотвратить метастазирование опухолей и ограничить неопластический рост первичным местом, позволяя лечение другими лекарствами, особенно конструкциями терапевтический агент-нацеливающий агент (см. ниже).

Способы, включающие применение блокирующего VEGFR2 антитела человека к VEGF или его иммуноконъюгата, обеспеченные настоящим изобретением, таким образом, широко применимы для лечения любой злокачественной опухоли, включающей сосудистый компонент. При применении антител и/или иммуноконъюгатов согласно настоящему изобретению для лечения опухолей, особенно васкуляризированных, злокачественных опухолей, указанные агенты можно применять отдельно или в комбинации, например, с химиотерапевтическими, радиотерапевтическими, апоптическими, антиангиогенными агентами и/или иммунотоксинами или коагулигандами.

Типичные васкуляризированные опухоли для указанного лечения представляют собой солидные опухоли, особенно карциномы, которые требуют сосудистого компонента для получения кислорода и питательных веществ. Типичные солидные опухоли, которые можно лечить, применяя настоящее изобретение, включают, но не ограничены перечисленными, карциномы легкого, груди, яичников, желудка, поджелудочной железы, гортани, пищевода, яичков, печени, околоушной железы, желчных путей, толстой кишки, прямой кишки, шейки матки, матки, эндометрия, почки, мочевого пузыря, предстательной железы, щитовидной железы, плоскоклеточные карциномы, аденокарциномы, мелкоклеточные карциномы, меланомы, глиомы, глиобластомы, нейробластомы и т.п. WO 98/45331 также включена в данную заявку посредством ссылки, чтобы дополнительно проиллюстрировать множество типов опухоли, которые можно эффективно лечить, применяя антитело к VEGF.

Знание роли ангиогенеза для поддержания и метастазирования опухолей обеспечило прогностический индикатор для таких видов рака, таких как рак молочной железы. Степень неоваскуляризации, обнаруживаемую в первичной опухоли, определяют путем подсчета плотности микрососудов в области с наиболее интенсивной неоваскуляризацией при инвазивной карциноме груди. Было обнаружено, что вы-

сокий уровень плотности микрососудов коррелирует с рецидивом опухоли. Контролирование ангиогенеза с помощью способов лечения согласно настоящему изобретению уменьшит или сведет к нулю рецидив таких опухолей.

Настоящее изобретение предполагается для применения для лечения любого пациента, у которого есть солидная опухоль. В свете специфичных свойств композиций блокирующего VEGFR2 антитела человека к VEGF лекарство согласно настоящему изобретению будет проявлять пониженные побочные эффекты. Конкретные преимущества будут заключаться в сохранении или усилении иммунных ответов хозяина против опухоли и в отсутствие нежелательных эффектов на костную ткань. Настоящее изобретение, таким образом, будет представлять собой наиболее предпочтительную антиангиогенную терапию для лечения педиатрического рака и пациентов, страдающих или находящихся в группе риска развития остеопороза и других костных дефектов.

Хотя все злокачественные новообразования и солидные опухоли можно лечить с помощью настоящего изобретения, неконъюгированные блокирующие VEGFR2 антитела человека к VEGF согласно настоящему изобретению особенно предполагаются для применения при лечении пациентов, страдающих от более ангиогенных опухолей, или пациентов, находящихся в группе риска метастазирования.

Настоящее изобретение также предназначено для превентивного или профилактического лечения. Эти аспекты настоящего изобретения включают возможность лечить с помощью настоящего изобретения пациентов, у которых присутствует первичная опухоль, которые могут иметь метастатические опухоли или опухолевые клетки на ранних стадиях метастазирования опухоли. В качестве антиангиогенной стратегии настоящее изобретение также можно применять для предотвращения развития опухоли у субъектов с умеренным или высоким риском развития опухоли, выявленном в прогностических тестах и/или у близких родственников людей, страдающих от наследственного рака.

Конъюгированные или иммунотоксичные формы блокирующих VEGFR2 антител человека к VEGF согласно настоящему изобретению особенно предполагаются для применения для разрушения или уменьшения массы солидных опухолей. Эти аспекты настоящего изобретения можно применять в сочетании с неконъюгированными антиангиогенными антителами согласно настоящему изобретению или с другими антиангиогенными подходами.

Для специалистов в данной области техники должно быть очевидно, что иммуноконъюгатные и пролекарственные формы способов лечения согласно настоящему изобретению имеют особое преимущество, состоящее в том, что оно обеспечивает один терапевтический агент с двумя свойствами: характерное антиангиогенное свойство антитела и терапевтическое свойство присоединенного агента (например, цитотоксического, коагулирующего, апоптического и т.п.). Конъюгированные и пролекарственные формы антител согласно настоящему изобретению, таким образом, имеют поразительно широкую применимость в области лечения рака.

Согласно рекомендациям, приведенным в настоящей заявке, которые касаются наиболее подходящих пациентов в отношении применения различных аспектов настоящего изобретения, следует, что некоторые параметры пациента могут оказаться полезными при выборе пациентов для лечения с помощью настоящего изобретения. Предварительный выбор некоторых пациентов или категорий пациентов никоим образом не отрицает пользу настоящего изобретения применительно к лечению всех пациентов, имеющих васкуляризованную опухоль или другое ангиогенное заболевание, описанное выше. Дополнительным соображением является тот факт, что атака опухоли, обеспеченная настоящим изобретением, может предрасположить опухоль к дополнительному терапевтическому лечению, таким образом, что последующее лечение приводит к общему синергическому эффекту или даже приводит к полной ремиссии или исцелению.

Было бы неправильно полагать, что какой-либо конкретный тип опухоли должен быть исключен из лечения с применением настоящего изобретения. Тем не менее, тип опухолевых клеток может быть подходящим для применения согласно настоящему изобретению в комбинации с другими терапевтическими агентами, особенно химиотерапевтическими веществами и направленными против опухолевой клетки иммунотоксинами. Как неконъюгированные, так и конъюгированные аспекты настоящих методов лечения будут включать антиангиогенный эффект, который будет ингибировать пролиферацию сосудистой сети опухоли. Конъюгированные и пролекарственные аспекты лечения будут дополнительно разрушать или закупоривать сосудистую сеть опухоли. Так как сосудистая сеть, по существу, или полностью одна и та же во всех солидных опухолях, должно быть очевидно, что настоящая методика широко или полностью пригодна для лечения всех солидных опухолей вне зависимости от конкретного фенотипа или генотипа самих опухолевых клеток.

Терапевтически эффективные дозы блокирующих VEGFR2 антител человека к VEGF или иммуноконъюгатных конструкций легко определить, используя результаты исследований на модельных животных, например, которые представлены в исследованиях, подробно описанных в данной заявке. Экспериментальных животных, несущих солидные опухоли, часто используют для оптимизации подходящих терапевтических доз перед применением в клинической практике. Известно, что такие модели очень достоверны в прогнозировании эффективных противораковых стратегий. Например, мыши, несущие солидные опухоли, такие как используемые в примерах, широко применяются в доклинических испытаниях.

Авторы настоящего изобретения использовали такие общепринятые в данной области техники модели на мышах, чтобы определить рабочие диапазоны терапевтических агентов, которые вызывают полезные противоопухолевые эффекты при минимальной токсичности.

При применении неконъюгированных блокирующих VEGFR2 антител человека к VEGF в антиангиогенных методах лечения можно также обратиться к другим опубликованным результатам для помощи в определении доз для клинического лечения. Например, хотя антитела согласно настоящему изобретению имеют особые преимущества над существующими в данной области, сведения в литературе, касающиеся лечения другими антителами к VEGF, все же можно использовать в комбинации с результатами и идеями, описанными в настоящей заявке, чтобы разработать и/или оптимизировать протоколы и дозы для лечения.

Например, в Borgstrom и др. (1999), специально включенном в данную заявку посредством ссылки, описана важность VEGF в ангиогенезе рака молочной железы *in vivo* с применением MAb A4.6.1. Гуманизированная форма антитела A4.6.1 (Авастин, бевацизумаб) была одобрена для клинического применения (Hugwitz и др., 2004). Так как антитела человека согласно настоящему изобретению проявляли эквивалентные или еще более улучшенные противоопухолевые действия в сравнительных исследованиях с A4.6.1/Авастин, эти антитела также будут приносить значительную пользу при лечении рака у людей, включая рак молочной железы. Авторы настоящего изобретения дополнительно осознают, что должно быть очевидно для специалистов в данной области техники, что пациентами, страдающими от рака молочной железы, обычно являются женщины в средней или более поздней возрастных группах, для которых также очевидны опасения, касающиеся остеопороза. Блокирующие VEGFR2 антитела человека к VEGF согласно настоящему изобретению, таким образом, будут иметь дополнительное преимущество, состоящее в том, что они не вызывают нежелательного действия на метаболизм костей и поэтому будут предпочтительными для применения у пациентов, страдающих от рака молочной железы, имеющих или находящихся в группе риска развития остеопороза.

Аналогичные преимущества делают лекарственные средства, содержащие блокирующее VEGFR2 антитело человека к VEGF, предпочтительными лекарственными препаратами для лечения педиатрических видов рака. У детей, страдающих от рака, очевидна необходимость продолжать здоровый и существенный рост костей. Так как блокирующие VEGFR2 антитела человека к VEGF, по существу, не нарушают активности остеокластов и хондрокластов, которые важны при развитии кости, эти антитела будут иметь важные преимущества над другими антителами, такими как Авастин.

Borgstrom и др. (1999), специально включенный в данную заявку посредством ссылки, также сообщали, что MAb A4.6.1 приводило к значительной регрессии опухоли при применении в комбинации с доксорубицином. Это дополнительно поддерживает комбинированное применение блокирующих VEGFR2 антител человека к VEGF и обычных цитотоксических или химиотерапевтических агентов для достижения значительных клинических результатов при лечении целого ряда видов рака. Предполагаются комбинации как с неконъюгированным доксорубицином, так и с доксорубициновыми пролекарствами.

Ferrara и коллеги также сообщали об эффективности и зависимости концентрация-эффект моноклонального антитела мыши к VEGF у мышей-опухоленосителей и экстраполяции для лечения человека (Mordenti и др., 1999, специально включенный в данную заявку посредством ссылки). Указанные исследования были разработаны, чтобы оценить соотношение концентрация-эффект для моноклонального антитела мыши к VEGF, чтобы можно было оценить эффективную концентрацию рекомбинантной гуманизированной формы антитела в плазме у пациентов, страдающих от рака. Mordenti и др. (1999) пришли к заключению, что удовлетворительная супрессия опухоли в "голых" мышах достигалась применением таких доз антитела мыши, которые можно легко применять в системе человека, чтобы определить клинические схемы приема, эффективные для поддержания уровня терапевтического антитела для применения человеком в требуемом эффективном диапазоне. Соответственно, результаты для общепринятых в данной области техники моделей на мышах также можно пересчитывать в подходящие для человека дозы, применяя тип анализов, описанных у Mordenti и др. (1999), вдобавок к методикам, известным квалифицированному специалисту, описанным в данной заявке.

Результаты доклинической оценки безопасности рекомбинантной гуманизированной формы антитела к VEGF от Genentech у обезьян (Ryan и др., 1999, особенно включенный в данную заявку посредством ссылки) служат иллюстрацией недостатков этого конкретного кандидатного терапевтического препарата. Хотя указанное антитело проявляет фармакологическую активность у этого животного, обезьяны в этих исследованиях проявляли хрящевую дисплазию зон роста, описываемую зависящим от дозы увеличением количества гипертрофированных хондроцитов, образованием субхондральной костной пластины и ингибированием сосудистой инвазии ростовой пластины. Таких недостатков не было обнаружено при применении блокирующих VEGFR2 антител человека к VEGF, которые не ингибируют связывание и передачу сигналов от VEGF в хондрокластах и хондроцитах, которая опосредуется VEGFR1.

Результаты дополнительного исследования доклинической фармакокинетики, межвидового масштабирования и тканевого распределения гуманизированного моноклонального антитела к VEGF от Genentech были описаны у Lin и др. (1999, специально включен в данную заявку посредством ссылки). Эти исследования осуществляли на мышах, крысах, обезьянах и кроликах, в последнем применяя <sup>125</sup>I-

меченое антитело. Фармакокинетические результаты для мышей, крыс и обезьян использовали для предсказания фармакокинетики гуманизированного аналога антитела, применяя аллометрическое масштабирование на людей. Соответственно, можно получить сведения о подходящей дозировке для лечения патологических состояний человека, таких как ревматоидный артрит, офтальмологическая неоваскуляризация и рак.

Гуманизированный вариант антитела к VEGF A4.6.1 (Авастин, бевацизумаб) в настоящее время одобрен для клинического применения (Hurwitz и др., 2004, включен в данную заявку посредством ссылки). Следовательно, такие клинические результаты также можно рассматривать как опорный источник при разработке терапевтических доз для лечения блокирующим VEGFR2 антителом человека к VEGF согласно настоящему изобретению. В настоящем изобретении показано, что новые антитела человека так же эффективны, как и A4.6.1/Авастин в исследованиях на мышах-опухоленосителях, хотя специфичность ингибирования только VEGFR2-опосредованных действий VEGF является преимуществом. WO 98/45331 также включена в данную заявку посредством ссылки, чтобы дополнительно проиллюстрировать дозы гуманизированных антител к VEGF, которые можно применять для лечения.

В аспекте применения конъюгированных блокирующих VEGFR2 антител человека к VEGF в терапии опухоли можно обратиться к научной и патентной литературе для обзора успешной доставки широкого диапазона лекарств в сосудистую сеть опухоли, чтобы достигнуть полезного эффекта. В качестве примера, каждый из патентов США №№ 5855866; 5877289; 5965132; 6051230; 6004555; 5776427; 6004554; 6036955 и 6093399 включен в данную заявку посредством ссылки с целью дополнительного описания применения таких конструкций терапевтический агент-нацеливающий агент. В данном случае конструкции терапевтический агент-нацеливающий агент включают нацеливающий агент, который оказывает антиангиогенный эффект, который будет усиливать или иным способом увеличивать противоопухолевую активность присоединенного терапевтического агента.

Как известно в данной области техники, существуют практические задачи, которыми можно руководствоваться при доклинических испытаниях перед переходом к клиническому лечению. Тем не менее, в свете прогресса других антител к VEGF в клинической практике, продемонстрированных противоопухолевых эффектов в общепринятых моделях, представленных в данной заявке, и повышенной безопасности настоящих стратегий настоящее изобретение обеспечивает данному терапевтическому препарату быстрый переход к клиническому лечению. Таким образом, доклинические испытания можно использовать для отбора наиболее полезных антител, доз или комбинаций.

Любая доза блокирующего VEGFR2 антитела человека к VEGF или иммуноконъюгата, или комбинированное лекарственное средство, которое приводит к какому-либо постоянному антиангиогенному эффекту, ингибированию метастазирования, разрушению сосудистой сети опухоли, тромбозу опухоли, некрозу и/или общему противоопухолевому эффекту, будет являться полезным изобретением. Настоящее изобретение также может быть эффективно против сосудов, выходящих из опухоли, т.е. нацелено, по меньшей мере, на подгруппу дренирующих сосудов, особенно, так как цитокины, высвобожденные из указанной опухоли, будут действовать на эти сосуды, изменяя их антигенный профиль.

Также должно быть очевидно, что даже в таких случаях, в которых антиангиогенные и/или противоопухолевые эффекты дозы блокирующего VEGFR2 антитела человека к VEGF или иммуноконъюгата, или комбинированной терапии стремятся к нижнему пределу предполагаемого терапевтического диапазона, возможно, что эта терапия все же в равной мере или еще более эффективна, чем все другие известные методы лечения с точки зрения конкретной опухолевой мишени или пациента. К сожалению, для практикующего врача очевидно, что некоторые опухоли и патологические состояния нельзя эффективно вылечить на средний или долгий срок, но это не отрицает пользы терапии согласно настоящему изобретению, особенно если она, по меньшей мере, приблизительно также эффективна, как и другие обычно предлагаемые стратегии.

При разработке подходящих доз блокирующего VEGFR2 антитела человека к VEGF или иммуноконъюгатных конструкций, или комбинированного лечения для лечения васкуляризированных опухолей можно легко экстраполировать данные из исследований на животных, описанных в данной заявке, и информацию в литературе, чтобы выявить подходящие дозы для клинического введения. Чтобы преобразовать дозы для животного в дозы для человека, следует учитывать массу агентов, вводимых на единицу массы экспериментального животного, и предпочтительно учитывать разницу в площади поверхности организма ( $m^2$ ) между экспериментальным животным и пациентом-человеком. Все такие расчеты хорошо известны и стандартны для рядовых специалистов в данной области техники.

Например, если взять результативные дозы из исследований на мышах и применить стандартные расчеты, основанные на массе и площади поверхности, эффективные дозы для применения у пациентов-людей будут находиться между приблизительно 1 и приблизительно 1000  $mg/m^2$ , предпочтительно между приблизительно 50 и 500  $mg/m^2$  и наиболее предпочтительно между приблизительно 10 и приблизительно 100  $mg/m^2$ . Эти дозы являются подходящими для блокирующих VEGFR2 изолированных антител человека к VEGF и блокирующих VEGFR2 иммуноконъюгатов человека к VEGF, хотя указанные дозы являются предпочтительными для применения изолированных или неконъюгированных антител для применения в качестве антиангиогенных агентов.

Соответственно, учитывая эти сведения, авторы настоящего изобретения предполагают, что полезные низкие дозы блокирующих VEGFR2 антител человека к VEGF или иммуноконъюгатов для введения человеку будут составлять приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или приблизительно 50 мг/м<sup>2</sup>; и что полезные высокие дозы таких антител или иммуноконъюгатов для введения человеку будут составлять приблизительно 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 925, 950, 975 или приблизительно 1000 мг/м<sup>2</sup>. Полезные промежуточные дозы блокирующих VEGFR2 антител человека к VEGF или иммуноконъюгатов для введения человеку предполагаются представляющими собой любую дозу в промежутке между нижними и верхними диапазонами доз, такую как приблизительно 55, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 525, 550 или приблизительно 575 мг/м<sup>2</sup> или около того.

Предполагается любой конкретный диапазон, включающий любую из описанных выше типичных доз или любое промежуточное значение между конкретными установленными диапазонами. Если применяются блокирующие VEGFR2 иммуноконъюгаты человека к VEGF, также должно быть очевидно, что иммуноконъюгаты с коагулянтами, как правило, можно применять в более высоких дозах, чем иммуноконъюгаты с токсинами.

Обычно диапазоны дозировок, составляющие между приблизительно 10-100 мг/м<sup>2</sup>, приблизительно 10-90 мг/м<sup>2</sup>, приблизительно 10-80 мг/м<sup>2</sup>, приблизительно 20-100 мг/м<sup>2</sup>, приблизительно 20-90 мг/м<sup>2</sup>, приблизительно 20-80 мг/м<sup>2</sup>, приблизительно 30-100 мг/м<sup>2</sup>, приблизительно 30-90 мг/м<sup>2</sup>, приблизительно 30-80 мг/м<sup>2</sup>, приблизительно 15-100 мг/м<sup>2</sup>, приблизительно 25-100 мг/м<sup>2</sup>, приблизительно 35-100 мг/м<sup>2</sup>, приблизительно 15-90 мг/м<sup>2</sup>, приблизительно 25-90 мг/м<sup>2</sup>, приблизительно 35-90 мг/м<sup>2</sup> или около того, блокирующих VEGFR2 антител человека к VEGF или иммуноконъюгатов будут предпочтительны. Несмотря на эти установленные диапазоны, должно быть очевидно, что, учитывая параметры и подробное руководство, представленное в данной заявке, дополнительные варианты активных или оптимальных диапазонов будут входить в объем настоящего изобретения.

Следовательно, должно быть очевидно, что более низкие дозы могут быть более подходящими в комбинации с другими агентами, и что высокие дозы могут быть все еще переносимыми, особенно учитывая повышенную безопасность блокирующих VEGFR2 антител человека к VEGF и их иммуноконъюгатов. Применение антител человека (и возможно, коагулянтных или антиангиогенных белков человека) делает настоящее изобретение еще более безопасным для клинического применения, дополнительно снижая возможность значительной токсичности или побочных эффектов в здоровых тканях.

Назначение терапевтических схем приема согласно настоящему изобретению, как правило, состоит в получении значительных противоопухолевых эффектов и, в то же время, сохранении дозы ниже уровней, связанных с неприемлемой токсичностью. Вдобавок к изменению самой дозы схему введения также можно приспособить, чтобы оптимизировать стратегию лечения. Один протокол лечения будет включать введение между приблизительно 1 и приблизительно 1000 мг/м<sup>2</sup>, предпочтительно между приблизительно 50 и 500 мг/м<sup>2</sup> и наиболее предпочтительно, между приблизительно 10 и приблизительно 100 мг/м<sup>2</sup> блокирующего VEGFR2 антитела человека к VEGF или иммуноконъюгата, или терапевтического коктейля, включающего его, приблизительно от 1 до 3 раз в неделю, предпочтительно путем внутривенного или внутримышечного введения и наиболее предпочтительно, внутривенно.

При введении конкретных доз предпочтительно пациенту системно вводят фармацевтически приемлемую композицию (согласно стандартам FDA стерильности, пирогенности, чистоты и общей безопасности). Внутривенная инъекция, как правило, является предпочтительной. Непрерывное вливание в течение периода времени, составляющего приблизительно 1 или 2 ч или около того, также предполагается.

Естественно, перед широким применением следует провести клинические испытания. Различные элементы проведения клинического испытания, включая лечение и наблюдение за пациентом, должны быть очевидны для специалистов в данной области техники в свете настоящего описания. Следующие сведения представлены как основное руководство для применения при проведении таких испытаний.

Пациенты, выбранные для первых исследований лечения блокирующим VEGFR2 антителом человека к VEGF, будут представлять собой таких, которые не отвечали по меньшей мере на один курс обычной терапии, и будут иметь объективно измеримое заболевание, определенное с помощью физического обследования, лабораторных способов и/или рентгенографических процедур. Любую химиотерапию следует остановить по меньшей мере за 2 недели до начала участия в указанных испытаниях. Если используются моноклональные антитела или участки антител мыши, пациенты не должны иметь в истории болезни аллергии на иммуноглобулин мыши.

Некоторые преимущества можно обеспечить применением постоянного центрального венозного катетера с трехпросветным портом. Блокирующее VEGFR2 антитело человека к VEGF должно быть профильтровано, например, через 0,22 мкм фильтр и разбавлено подходящим образом, например, солевым раствором до конечного объема 100 мл. Перед применением пробный образец также следует профильтровать аналогичным образом и его концентрацию оценить перед и после фильтрации путем определения A<sub>280</sub>. Ожидаемый выход должен быть в диапазоне от 87 до 99%, и затем можно вычислить поправки на потерю белка.

Блокирующие VEGFR2 антитела человека к VEGF или их конъюгаты можно вводить в течение пе-



риода приблизительно 4-24 ч, при этом каждый пациент должен получать по 2-4 инфузии с интервалами в 2-7 дней. Введение также можно осуществлять при постоянной скорости вливания в течение 7-дневного периода. Инфузия любым уровнем дозы должна зависеть от наблюдаемой токсичности. Следовательно, если токсичность II степени была достигнута после любой одной инфузии или через конкретный период времени при вливании с постоянной скоростью, следует воздержаться от дополнительных доз или остановить вливание с постоянной скоростью до тех пор, пока токсичность не уменьшится. Повышать дозы блокирующего VEGFR2 антитела человека к VEGF группам пациентов следует до тех пор, пока приблизительно 60% пациентов не проявит неприемлемую токсичность III или IV степени в любой категории. Дозы, которые будут составлять 2/3 от этого значения, считают безопасными дозами.

Физическое обследование, измерение опухоли и лабораторные тесты, разумеется, следует осуществлять перед лечением и с интервалами вплоть до 1 месяца после. Лабораторные тесты должны включать полный анализ крови, измерение сывороточного креатинина, креатинкиназы, электролитов, мочевины, азота, сывороточной глютаминовой оксалоацетиновой трансаминазы (SGOT), билирубина, альбумина и общего белка сыворотки крови. В образцах сыворотки, отобранных вплоть до 60 дней после лечения, следует оценить с помощью радиоиммуноанализа присутствие введенного терапевтического препарата и антител против любых его частей. Иммунологические анализы сывороток с применением любого стандартного анализа, такого как, например, ELISA или RIA, позволят оценить фармакокинетику и клиренс блокирующего VEGFR2 антитела человека к VEGF.

Чтобы оценить противоопухолевые ответы, пациентов следует исследовать через 48 ч - 1 неделю и снова через 30 дней после последнего вливания. Если присутствовало пальпируемое заболевание, следует измерять два перпендикулярных диаметра всех образований ежедневно во время лечения, через 1 неделю после завершения терапии и через 30 дней. Чтобы измерить непальпируемое заболевание, можно получить серию срезов КТ с интервалами 1 см всей груди, живота и таза через 48 ч - 1 неделю и снова через 30 дней. Образцы ткани также следует оценить гистологически и/или с помощью проточной цитометрии, используя биопсийные материалы из мест заболевания или даже кровь или жидкие образцы, при необходимости.

Клинические ответы можно определить с помощью приемлемого критерия. Например, полный ответ можно определить по исчезновению всей измеримой опухоли через 1 месяц после лечения. Тогда как частичный ответ можно определить по 50% или большему уменьшению суммы произведений перпендикулярных диаметров всех поддающихся измерению опухолевых утолщений через 1 месяц после лечения, при отсутствии увеличения опухолей. Аналогично, смешанный ответ можно определить по уменьшению суммы произведений перпендикулярных диаметров всех измеримых патологических изменений на 50% или больше через 1 месяц после лечения, при котором происходит прогрессирование в одном или более местах.

В свете результатов клинических испытаний, таких как описанные выше, можно составить еще более точную схему лечения. Тем не менее, некоторое изменение дозировки может позже оказаться необходимым в зависимости от состояния субъекта, которого лечат. Лечащий врач, ответственный за введение, в свете настоящего описания сможет определить подходящую дозу для конкретного субъекта. Такая оптимизация и корректирование выполняется обычным способом в данной области техники и ни в коем случае не связана с большим количеством экспериментов.

#### G. Комбинированные способы лечения.

При применении для лечения ангиогенных заболеваний, таких как артрит, псориаз, атеросклероз, диабетическая ретинопатия, возрастная дистрофия желтого пятна, болезнь Грейвса, сосудистый ретиноз, гемангиома и неоваскулярная глаукома (или другие заболевания, описанные выше), или солидные опухоли, настоящее изобретение можно комбинировать с другими способами лечения.

Способы лечения блокирующим VEGFR2 антителом человека к VEGF согласно настоящему изобретению можно комбинировать с любыми другими способами, как правило, используемыми при лечении конкретной опухоли, заболевания или расстройства, которые обнаруживаются у пациента. При условии, что конкретный терапевтический подход по своей сущности не известен как неблагоприятный для лечения патологического состояния пациента и значительно не противодействует лечению блокирующим VEGFR2 антителом человека к VEGF, предполагается его комбинация с настоящим изобретением.

Применительно к лечению солидной опухоли настоящее изобретение можно применять в комбинации с классическими подходами, такими как хирургическое вмешательство, лучевая терапия, химиотерапия и т.п. Настоящее изобретение, следовательно, обеспечивает комбинированные способы лечения, в которых конструкции блокирующего VEGFR2 антитела человека к VEGF применяют одновременно, перед или после хирургического вмешательства или лучевой терапии или вводят пациентам одновременно, перед или после введения обычных химиотерапевтических, радиотерапевтических или антиангиогенных агентов или нацеленных иммунотоксинов или коагулигандов.

Комбинированное применение согласно настоящему изобретению вместе с лучевой терапией, радиотерапевтическими, антиангиогенными агентами, индуцирующими апоптоз агентами и антифибриновыми лекарственными препаратами является особенно предпочтительным. Множество примеров таких агентов было описано выше в сочетании с иммуноконъюгатами согласно настоящему изобретению. Лю-

бой из указанных агентов, исходно описанный для применения в качестве части терапевтического конъюгата, также можно применять отдельно, но при этом в функциональной комбинации с настоящим изобретением.

Если один или более агентов применяют в комбинации с терапией блокирующим VEGFR2 антителом человека к VEGF, не требуется, чтобы комбинированные результаты представляли собой аддитивный эффект, наблюдаемый, когда каждое лечение осуществляют отдельно. Хотя, как правило, желательны, по меньшей мере, аддитивные эффекты, будет полезен любой повышенный противоопухолевый эффект относительно отдельной терапии. Также не требуется, чтобы комбинированное лечение проявляло синергические эффекты, хотя это, несомненно, возможно и полезно.

Для применения комбинированной антиангиогенной терапии, например для лечения офтальмологического или другого ангиогенного заболевания или расстройства, следует просто вводить животному блокирующее VEGFR2 антитело человека к VEGF в комбинации с другим терапевтическим агентом, включая другой (второй) антиангиогенный агент, таким образом, что это приведет к их эффективному комбинированному терапевтическому или антиангиогенному действию у животного. Агенты, следовательно, будут обеспечены в эффективных количествах и в течение эффективных периодов времени, чтобы привести к их комбинированному присутствию в месте развития заболевания и их комбинированным действиям в окружении заболевания, таком как глаз.

Чтобы достигнуть этой цели, блокирующее VEGFR2 антитело человека к VEGF и другой терапевтический или антиангиогенный агент(ы) можно вводить животному одновременно либо в составе одной композиции, либо в виде двух отдельных композиций, применяя различные пути введения. В качестве альтернативы лечение блокирующим VEGFR2 антителом человека к VEGF может предшествовать или следовать за другим терапевтическим или антиангиогенным лечением, например, с интервалами в диапазоне от минут до недель и месяцев. Следует осуществлять такое лечение таким образом, чтобы блокирующее VEGFR2 антитело человека к VEGF и другой терапевтический или антиангиогенный агент(ы) проявляли полезный комбинированный терапевтический эффект.

Что касается терапии опухоли, для осуществления комбинированной противоопухолевой терапии следует аналогичным образом вводить животному блокирующее VEGFR2 антитело человека к VEGF в комбинации с другим противораковым агентом, таким образом, чтобы это привело к эффективным комбинированным противоопухолевым эффектам у животного. Агенты, опять же, будут обеспечены в эффективных количествах и в течение эффективных периодов времени, чтобы привести к их комбинированному присутствию в сосудистой сети опухоли и их комбинированным действиям в опухолевом окружении.

Блокирующее VEGFR2 антитело человека к VEGF и противораковые агенты можно вводить животному одновременно, либо в составе одной композиции, либо в виде двух отдельных композиций, применяя различные пути введения. В качестве альтернативы блокирующее VEGFR2 антитело человека к VEGF можно вводить перед или после противоракового агента, например, с интервалом от минут до недель и месяцев. Противораковый агент и блокирующее VEGFR2 антитело человека к VEGF будет проявлять полезный комбинированный эффект на опухоль. Многие противораковые агенты следует вводить предварительно перед антиангиогенной терапией блокирующим VEGFR2 антителом человека к VEGF. Тем не менее, многие другие противораковые агенты следует вводить одновременно с блокирующим VEGFR2 антителом человека к VEGF или после него, особенно после применения блокирующих VEGFR2 иммуноконъюгатов человека к VEGF.

Обычное применение комбинаций веществ при лечении рака хорошо известно. Например, в патенте США № 5710134 (включен в данную заявку посредством ссылки) описаны компоненты, которые индуцируют некроз опухолей в комбинации с нетоксичными веществами или "пролекарствами". Ферменты, высвобожденные при некротических процессах, расщепляют нетоксичное "пролекарство", превращая его в токсичное "лекарство", которое приводит к гибели опухолевых клеток. Также в патенте США № 5747469 (включен в данную заявку посредством ссылки) описано комбинированное применение вирусных векторов, кодирующих p53 и повреждающие ДНК агенты. Любые аналогичные подходы можно применять в настоящем изобретении.

В некоторых случаях может даже быть желательным значительно продлить период времени лечения, чтобы прошло несколько дней (2, 3, 4, 5, 6 или 7), несколько недель (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8) или даже несколько месяцев (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8) между соответствующими введениями. Это будет иметь преимущества в тех случаях, когда одно лечение предполагается для существенного разрушения опухоли, такое как хирургическое вмешательство или химиотерапия, и другое лечение предполагается для предотвращения микрометастазирования или возобновления роста опухоли, такое как основанная на антиангиогенных препаратах терапия. Антиангиогенные агенты следует вводить через определенное время после хирургического вмешательства, чтобы обеспечить эффективное заживление ран.

Также предусматривается, что будет использоваться более чем одно введение либо блокирующего VEGFR2 антитела человека к VEGF, либо противоракового агента. Указанные агенты можно вводить попеременно, с чередованием в дни или недели; или можно проводить цикл лечения блокирующим VEGFR2 антителом человека к VEGF, а затем цикл терапии противораковым агентом. В любом случае,

чтобы достигнуть регрессии опухоли с применением комбинированной терапии, все, что требуется, это доставка обоих агентов в комбинированном количестве, эффективном для оказания противоопухолевого эффекта, вне зависимости от времени введения.

В аспекте хирургического вмешательства любое хирургическое вмешательство можно осуществить в комбинации с настоящим изобретением. Применительно к лучевой терапии предполагается любой механизм индуцирования локального повреждения ДНК в опухолевых клетках, как, например,  $\gamma$ -облучение, рентгеновское облучение, УФ-облучение, микроволновое облучение и даже электронная эмиссия и т.п. Также предполагается направленная доставка радиоактивных изотопов к опухолевым клеткам, и ее можно применять вместе с нацеливающим антителом или другими нацеливающими средствами и предпочтительно блокирующими VEGFR2 антителами человека к VEGF.

Терапия цитокинами также доказала свою эффективность при комбинированных схемах лечения. В таких комбинированных подходах можно применять различные цитокины. Примеры цитокинов включают IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, TGF- $\beta$ , GM-CSF, M-CSF, G-CSF, TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , LAF, TCGF, BCGF, TRF, BAF, BDG, MP, LIF, OSM, TMF, PDGF, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ . Цитокины вводят согласно стандартным схемам приема в соответствии с клиническими показаниями, такими как состояние пациента и относительная токсичность цитокина. Утероглобины также можно применять для предотвращения или ингибирования метастаз (патент США № 5696092; включен в данную заявку посредством ссылки).

G1. Химиотерапевтические вещества.

В некоторых вариантах реализации блокирующие VEGFR2 антитела человека к VEGF согласно настоящему изобретению можно вводить в комбинации с химиотерапевтическим агентом. Целый ряд химиотерапевтических агентов можно применять в комбинированных способах лечения, описанных в данной заявке. Химиотерапевтические агенты, предполагаемые в качестве примера, включают, например, адриамицин, дактиномицин, митомицин, карминомицин, дауномицин, доксорубицин, тамоксифен, таксол, таксотер, винкристин, винбластин, винорелбин, этопозид (VP-16), 5-фторурацил (5FU), цитозинарабинозид, циклофосфамид, тиотепа, метотрексат, камптотецин, актиномицин-D, митомицин C, цисплатин (CDDP), аминоптерин, комбретастин(ы) и их производные и пролекарства.

Для специалистов в данной области техники должно быть очевидно, что подходящие дозы химиотерапевтических агентов, как правило, будут в таких диапазонах, которые обычно используются в клинических способах лечения, в которых химиотерапевтические вещества вводят отдельно или в комбинации с другими химиотерапевтическими веществами. Исключительно в качестве примера можно применять агенты, такие как цисплатин, и другие алкилирующие ДНК агенты. Цисплатин широко применяется для лечения рака, при этом эффективные дозы, используемые в клинических применениях, составляют 20 мг/м<sup>2</sup> в течение 5 дней каждые три недели на протяжении трех курсов. Цисплатин не всасывается при пероральном введении и, следовательно, должен доставляться посредством внутривенной, подкожной, внутриопухолевой или интраперитонеальной инъекции.

Дополнительные полезные агенты включают соединения, которые нарушают репликацию ДНК, митоз и расхождение хромосом. Такие химиотерапевтические соединения включают адриамицин, также называемый доксорубицином, этопозид, верапамил, подофиллотоксин и т.п. Эти соединения, широко применяемые в клинических ситуациях для лечения новообразований, вводят посредством болюсных инъекций внутривенно в дозах в диапазоне от 25-75 мг/м<sup>2</sup> с 21-дневными интервалами для адриамицина, до 35-50 мг/м<sup>2</sup> для этопозидов внутривенно или двойную внутривенную дозу вводят перорально.

Также можно применять агенты, которые нарушают синтез и точность воспроизведения полинуклеотидных предшественников. Особенно полезными являются агенты, которые подверглись обширному тестированию и легко доступны в настоящее время. Например, агенты, такие как 5-фторурацил (5-FU), предпочтительно используются неопластической тканью, что делает этот агент особенно полезным для нацеливания на неопластические клетки. Хотя он достаточно токсичен, 5-FU является пригодным в широком диапазоне носителей, включая топические, тем не менее, широко используется внутривенное введение доз в диапазоне от 3 до 15 мг/кг/день.

Типичные химиотерапевтические агенты для комбинированной терапии перечислены в табл. С. Каждый из перечисленных агентов является примером и не ограничивает настоящее изобретение. Квалифицированному специалисту предлагается ознакомиться со стр. 624-652 гл. 33 15-го изд. "Remington's Pharmaceutical Sciences". Изменение дозировок, вероятно, будет происходить в зависимости от патологического состояния, которое лечат. Лечащий врач, осуществляющий введение лекарства, сможет определить подходящую дозу для конкретного субъекта.

## Химиотерапевтические агенты, полезные при неопластическом заболевании

| КЛАСС               | ТИП АГЕНТА                 | ПРИМЕРЫ                                                                                   | ЗАБОЛЕВАНИЕ                                                                                                                                                                                                             |
|---------------------|----------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Алкилирующие агенты | Азотистые иприты           | Мехлоретамин (хлорметин, мустин, азотистый иприт, HN <sub>2</sub> )<br>Мустарген®         | Болезнь Ходжкина, неходжкинские лимфомы                                                                                                                                                                                 |
|                     |                            | Циклофосфамид (циклофосфан)<br>Цитоксан®, Неозар®, Ревимун®                               | Острые и хронические лимфоцитарные лейкозы, болезнь Ходжкина, неходжкинские лимфомы, множественная миелома, нейробластома, рак груди, яичников, легкого, опухоль Вильмса, рак шейки матки, яичка, саркомы мягких тканей |
|                     |                            | Ифосфамид<br>Митоксана®, Ифекс®                                                           | Неходжкинские лимфомы, саркома мягких тканей, остеобластическая саркома, рак яичка, груди, легкого, шейки матки, яичников, кости                                                                                        |
|                     |                            | Мелфалан (L-сарколизин)<br>Алкеран®                                                       | Множественная миелома, рак груди, яичников, меланома                                                                                                                                                                    |
|                     |                            | Хлорамбуцил<br>Лейкеран®                                                                  | Хроническая лимфоцитарная лейкозия, первичная макроглобулинемия, болезнь Ходжкина, неходжкинские лимфомы, рак яичников                                                                                                  |
|                     | Этиленмины и метилмеламины | Гексаметилмеламин (Алтретамин, НММ)<br>Гексален®                                          | Рак яичников                                                                                                                                                                                                            |
|                     |                            | Тиотепа                                                                                   | Рак мочевого пузыря, груди, яичников                                                                                                                                                                                    |
|                     | Алкилсульфонаты            | Бусульфан<br>Милеран®, Бусульфекс®                                                        | Хроническая гранулоцитарная лейкозия                                                                                                                                                                                    |
|                     | Нитрозомочевины            | Кармустин<br>BiCNU®                                                                       | Болезнь Ходжкина, неходжкинские лимфомы, первичные опухоли мозга, множественная миелома, злокачественная меланома, глиома, мультиформная глиобластома, медуллобластома, астроцитома                                     |
|                     |                            | Ломустин (CCNU)<br>CeeNU®                                                                 | Болезнь Ходжкина, неходжкинские лимфомы, первичные опухоли мозга, мелкоклеточный рак легкого                                                                                                                            |
|                     |                            | Семустин (метил-CCNU)                                                                     | Первичные опухоли мозга, рак желудка, толстой кишки                                                                                                                                                                     |
|                     |                            | Стрептозоцин (стрептозотоцин)<br>Занозар®                                                 | Злокачественная инсулинома поджелудочной железы, злокачественный карциноид                                                                                                                                              |
|                     | Триазины                   | Дакарбазин (диметилтриазеноимидазолкарбоксамид, имидазолкарбоксамид)<br>DTIC®, DTIC-Dome® | Злокачественная меланома, болезнь Ходжкина, саркомы мягких тканей, злокачественная инсулинома поджелудочной железы                                                                                                      |
|                     |                            | Темозоломид<br>Темодар®, Темодал®                                                         | Астроцитома                                                                                                                                                                                                             |
|                     | Производное метилгидразина | Прокарбазин (N-метилгидразин, МИН)<br>Матулан®, Натулан®, Индикарб® (Indicarb®)           | Болезнь Ходжкина, мультиформная глиобластома                                                                                                                                                                            |

|                    |                                         |                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                     |
|--------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Антиметаболиты     | Аналоги фолиевой кислоты                | Метотрексат (аметоптерин)                                                                                                               | Острая лимфоцитарная лейкемия, хориокарцинома, фунгоидный микоз, рак груди, головы и шеи, легкого, остеогенная саркома, глиобластома                                |
|                    |                                         | Аминоптерин                                                                                                                             | Лейкемия                                                                                                                                                            |
|                    | Антиметаболиты фолата                   | Пеметрексед<br>Алимта®                                                                                                                  | Мезотелиома плевры, немелкоклеточная карцинома легкого, рак пищевода                                                                                                |
|                    |                                         | Ралтитрексид<br>Томудекс®                                                                                                               | Колоректальный рак                                                                                                                                                  |
|                    | Аналоги пиримидина                      | Фторурацил (5-фторурацил, 5-FU, флуороурацил, фтордезоксидин)<br>Эфудекс®, Карак®, Флуороплекс®<br>Флоксуриндин (пролекарство)<br>FUDR® | Рак груди, толстой кишки, желудка, поджелудочной железы, яичников, головы и шеи, мочевого пузыря, предопухолевые поражения кожи (топические)                        |
|                    |                                         | Цитарабин (цитозинарабинозид, ара С)<br>Цитозар-U®, Тарабин PFS®, ДепоЦит®, Капецитабин (пролекарство)<br>Кселода®                      | Острая гранулоцитарная и острая лимфоцитарная лейкемии, неходжкинская лимфома                                                                                       |
|                    |                                         | Гемцитабин<br>Гемзар®                                                                                                                   | Опухоли поджелудочной железы, мочевого пузыря, груди, пищевода и немелкоклеточные раки легкого, лимфомы                                                             |
|                    | Аналоги пурина и родственные ингибиторы | Тиогуанин (тиогуанин, 6-тиогуанин; TG)                                                                                                  | Острая гранулоцитарная, острая лимфоцитарная, хроническая гранулоцитарная и хроническая миелоидная лейкемии                                                         |
|                    |                                         | Пентостатин (2-дезоксикофорицин)                                                                                                        | Волосатоклеточная лейкемия, фунгоидный микоз, хроническая лимфоцитарная лейкемия                                                                                    |
|                    |                                         | Меркаптопурин (6-меркаптопурин, 6-MP)<br>Пуринетол®                                                                                     | Острая лимфоцитарная, острая гранулоцитарная и хроническая гранулоцитарная лейкемии, неходжкинская лимфома                                                          |
|                    |                                         | Кладрибин (2CDA)<br>Леустатин®                                                                                                          | Волосатоклеточная лейкемия, В-клеточные лейкемии, лимфомы                                                                                                           |
|                    |                                         | Клофарабин<br>Клолар®, Эволтра (Evoltra®)                                                                                               | Острая лимфобластная лейкемия, острая миелоидная лейкемия, ювенильная миеломоноцитарная лейкемия                                                                    |
|                    |                                         | Флударабин (Флударабина фосфат)<br>Флудара®                                                                                             | Гематологические злокачественные новообразования                                                                                                                    |
| Алкалоиды барвинка |                                         | Винбластин (VLB)                                                                                                                        | Болезнь Ходжкина, неходжкинские лимфомы, рак груди, яичка, немелкоклеточный рак легкого                                                                             |
|                    |                                         | Винкристин<br>Онковин®                                                                                                                  | Острая лимфоцитарная лейкемия, нейробластома, опухоль Вильмса (нефробластома), рабдомиосаркома, болезнь Ходжкина, неходжкинские лимфомы, мелкоклеточный рак легкого |
|                    |                                         | Виндесцин<br>Элдезин®                                                                                                                   | Лейкемия, лимфома, меланома, рак груди, легкого                                                                                                                     |

|                       |                                                  |                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|-----------------------|--------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                       |                                                  | Винорелбин<br>Навельбин®                                                                                                        | Рак груди, немелкоклеточный<br>рак легкого                                                                                                                                                                                                                                                    |
|                       | Подофиллотоксины<br><br>Эпидофиллотоксины        | Этопозид<br>(этопозид<br>фосфат)<br>Эпозин®,<br>Этопосфос®,<br>Вепезид®, VP-16®                                                 | Рак яичка, мелкоклеточный<br>рак легкого и другой рак<br>легкого, груди, болезнь<br>Ходжкина, неходжкинские<br>лимфомы, острая<br>гранулоцитарная лейкемия,<br>саркома Капоши,<br>мультиформная глиобластома                                                                                  |
|                       |                                                  | Тенипозид<br>Вумон®, VM-26®                                                                                                     | Острая лимфоцитарная<br>лейкемия                                                                                                                                                                                                                                                              |
| Природные<br>продукты | Антрациклиновые<br>антибиотики<br>(Антрациклины) | Даунорубин<br>(дауномицин,<br>рубидомицин)<br>Церубидин®                                                                        | Острая гранулоцитарная и<br>острая лимфоцитарная<br>лейкемии, нейробластома                                                                                                                                                                                                                   |
|                       |                                                  | Доксорубин<br>(гидроксиддаунор<br>убинин,<br>адриамицин)<br>Рубекс®, Доксил®                                                    | Мягких тканей, остеогенная и<br>другие саркомы; болезнь<br>Ходжкина, неходжкинские<br>лимфомы, острые лейкемии;<br>опухоли груди, мочеполовой<br>системы, щитовидной железы,<br>легкого, желудка, яичников,<br>щитовидной железы, мочевого<br>пузыря, нейробластома,<br>множественная миелома |
|                       |                                                  | Эпирубин<br>Элленс®,<br>Фарморубин®,<br>Эбеве®                                                                                  | Опухоли груди, яичников,<br>ЖКТ, легкого; лимфомы                                                                                                                                                                                                                                             |
|                       |                                                  | Идарубин (4-<br>деметоксидаунор<br>убинин)<br>Заведос®,<br>Идамицин®                                                            | Острая миелоидная лейкемия                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|                       |                                                  |                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|                       |                                                  | Валрубин (N-<br>трифторацетилад<br>риамицин-14-<br>валерат)<br>Валстар®                                                         | Рак мочевого пузыря                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|                       | Антрацендион                                     | Митоксантрон                                                                                                                    | Острая гранулоцитарная<br>лейкемия, рак груди,<br>неходжкинская лимфома                                                                                                                                                                                                                       |
|                       |                                                  | Пиксантрон                                                                                                                      | Рак груди, неходжкинская<br>лимфома                                                                                                                                                                                                                                                           |
|                       | Полипептидные и<br>пептидные<br>антибиотики      | Блеомицин<br>Бленоксан®                                                                                                         | Рак яичка, головы и шеи,<br>кожи, пищевода, легкого и<br>мочеполовой системы; болезнь<br>Ходжкина, неходжкинские<br>лимфомы, плоскоклеточные<br>карциномы                                                                                                                                     |
|                       |                                                  | Актиномицин-D<br>Дактиномицин®                                                                                                  | Хориокарцинома, опухоль<br>Вильмса, рабдомиосаркома,<br>яичка, саркома Капоши                                                                                                                                                                                                                 |
|                       |                                                  | Пликамицин<br>(митрамицин)<br>Митрацин®                                                                                         | Рак яичка, злокачественная<br>гиперкальциемия                                                                                                                                                                                                                                                 |
|                       |                                                  | Митомицин<br>(митомицин C)                                                                                                      | Рак желудка, шейки матки,<br>толстой кишки, груди,<br>поджелудочной железы,<br>мочевого пузыря, головы и<br>шеи, пищевода                                                                                                                                                                     |
|                       | Ферменты                                         | L-аспарагиназа<br>Элспар®                                                                                                       | Острая лимфоцитарная<br>лейкемия, тучноклеточные<br>опухоли                                                                                                                                                                                                                                   |
|                       | Модификаторы<br>биологических<br>реакций         | Интерферон<br>альфа (IFNα)<br>Пегилированные<br>интерфероны<br>Мультиферон®,<br>Роферон®,<br>Пегасис®, Интрон<br>А®, ПегИнтрон® | Волосатоклеточная лейкемия,<br>саркома Капоши, меланома,<br>карциноид, почечноклеточный<br>рак, рак яичников, мочевого<br>пузыря, неходжкинские<br>лимфомы, фунгиоидный микоз,<br>множественная миелома,<br>хроническая гранулоцитарная<br>лейкемия                                           |
|                       |                                                  |                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|                       |                                                  |                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                               |

|                            |                                         |                                                      |                                                                                                                                                      |
|----------------------------|-----------------------------------------|------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Дезинтеграторы цитоскелета | Таксаны                                 | Таксол (паклитаксел)<br>Абраксан®                    | Рак груди, яичников, легкого, головы и шеи, саркома Капоши                                                                                           |
|                            |                                         | Доцетаксел<br>Таксотер®                              | Рак груди, яичников, легкого, колоректальный рак, рак яичников, ЖКТ, почек, предстательной железы, печени, головы и шеи, меланома                    |
|                            | Комбретастатины                         | Комбретастатин А-4<br>СА-4-Р                         | Рак щитовидной железы                                                                                                                                |
|                            | Координационные комплексы платины       | Цисплатин (cis-DDP, цисплатина)                      | Рак яичка, яичников, мочевого пузыря, головы и шеи, легкого, щитовидной железы, шейки матки, эндометрия, нейробластома, остеогенная саркома, лимфома |
|                            |                                         | Карбоплатин<br>Параплатин®                           | Рак яичников, легкого, головы и шеи                                                                                                                  |
|                            |                                         | Оксалиплатин<br>Элоксатин®, Оксалиплатин<br>Медакс®  | Колоректальный рак                                                                                                                                   |
|                            | Камптотецины                            | Топотекан<br>Гикамтин®                               | Рак яичников, легкого                                                                                                                                |
|                            |                                         | Иринотекан (CPT-11)<br>Камптозар                     | Рак толстой кишки                                                                                                                                    |
|                            | Содержащая заместители мочевины         | Гидроксимочевина (гидроксикарбамид)                  | Хроническая гранулоцитарная лейкопения, истинная полицитемия, тромбоцитоз неясной этиологии, злокачественная меланома                                |
| Другие агенты              | Адренокортикостероиды                   | Митоган (o,p'-DDD)<br>Лизодрен®                      | Рак коры надпочечников                                                                                                                               |
|                            | Ингибитор стероидов                     | Аминоглутетимид<br>Цитадрен®                         | Рак груди                                                                                                                                            |
|                            | Ингибиторы тирозинкиназ                 | Акситиниб                                            | Рак груди, почечноклеточная карцинома, рак поджелудочной железы                                                                                      |
|                            |                                         | Дазатиниб (BMS-354825)<br>Сприцель®                  | Хроническая миелоидная лейкопения, острая лимфобластная лейкопения, метастатическая меланома                                                         |
|                            |                                         | Эрлотиниб (OSI-774)<br>Тарцева®                      | Немелкоклеточная карцинома легкого, рак поджелудочной железы                                                                                         |
|                            |                                         | Гефитиниб (ZD1839)<br>Иресса®                        | Немелкоклеточная карцинома легкого                                                                                                                   |
|                            |                                         | Иматиниб (CGP57148B или STI-571)<br>Гливек®, Glivec® | Хроническая миелоидная лейкопения, рак желудочно-кишечного тракта                                                                                    |
|                            |                                         | Лапатиниб (GW572016)<br>Тикербо®, Тивербо®           | Рак груди                                                                                                                                            |
|                            |                                         | Сорафениб<br>Нексавар®                               | Почечноклеточная карцинома, печеночно-клеточная карцинома                                                                                            |
|                            |                                         | Сунитиниб (SU11248)<br>Сутент®                       | Почечноклеточная карцинома, рак желудочно-кишечного тракта, немелкоклеточная карцинома легкого, рак груди                                            |
|                            | Рецепторы с тирозинкиназной активностью | Цетуксимаб (анти-EGFR)<br>Эрбитус®                   | Колоректальный рак, рак головы и шеи                                                                                                                 |
|                            |                                         | Панитумумаб (анти-EGFR)<br>Вектибикс®                | Колоректальный рак                                                                                                                                   |

|                         |                                      |                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                   |
|-------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Моноклональные антитела |                                      | Трастузумаб (анти-HER2/neu, рецептор erbB2)<br>Герцептин®                                   | Рак груди, раки HER2/neu                                                                                                                                                                                          |
|                         | CD20                                 | Ритуксимаб<br>Ритуксан®,<br>МабТера®,<br>Редитукс®                                          | Неходжкинская лимфома, В-клеточные лейкоми                                                                                                                                                                        |
|                         |                                      | Тозитумомаб (анти-CD20- <sup>131</sup> I)<br>Бексар®                                        | Фолликулярная лимфома, неходжкинская лимфома                                                                                                                                                                      |
|                         |                                      | Алемтузумаб (анти-CD52)<br>Кэмпас®                                                          | Хроническая лимфоцитарная лейкомия (CLL), Т-клеточная лимфома                                                                                                                                                     |
|                         |                                      | Бевацизумаб (анти-VEGF)<br>Авастин®                                                         | Рак толстой кишки, немелкоклеточная карцинома легкого, рак груди, почечноклеточная карцинома, мультиформная глиобластома, рефрактерный к гормональной терапии рак предстательной железы, рак поджелудочной железы |
|                         |                                      | Гемтузумаб (анти-CD33-каликхимидин)<br>Милотарг®                                            | Острая миелоидная лейкомия                                                                                                                                                                                        |
|                         | Адренокортикостероиды                | Преднизон                                                                                   | Острые и хронические лимфоцитарные лейкоми, неходжкинские лимфомы, болезнь Ходжкина, рак груди, множественная миелома                                                                                             |
| Гормоны и антагонисты   | Прогестины                           | Гидроксипрогестерона капроат<br>Медроксипрогестерона ацетат<br>Мегестрола ацетат<br>Мегейс® | Рак эндометрия, груди                                                                                                                                                                                             |
|                         | Эстрогены                            | Диэтилстильбэстрол<br>Этинилэстрадиол<br>Эстрамустин® (производное мехлоретамин)            | Рак груди, предстательной железы                                                                                                                                                                                  |
|                         | Антиэстроген                         | Тамоксифен<br>Нолвадекс®,<br>Истубал (Istubal®),<br>Валодекс®                               | Рак груди                                                                                                                                                                                                         |
|                         | Андрогены                            | Тестостерона пропионат<br>Флуоксиместерон (Халотестин)                                      | Рак груди                                                                                                                                                                                                         |
|                         | Антиандроген                         | Флутамид (Флутамин)<br>Эулексин®                                                            | Рак предстательной железы                                                                                                                                                                                         |
|                         | Аналог гонадотропин-рилизинг гормона | Лейпролид<br>Лупрон®, Лупрон Депо®, Виадур®,<br>Элигард®, Простап®                          | Рак предстательной железы, груди                                                                                                                                                                                  |

## G2. Антиангиогенные агенты.

При нормальных физиологических условиях люди или животные претерпевают ангиогенез лишь в ограниченном количестве случаев. Например, ангиогенез обычно наблюдается при заживлении ран, зачатии и эмбриональном развитии и образовании желтого тела, эндометрия и плаценты. Неконтролируемый (постоянный и/или нерегулируемый) ангиогенез связан с различными болезненными состояниями и происходит во время метастазирования опухоли.

Считают, что как контролируемый, так и неконтролируемый ангиогенез происходит аналогичным образом. Эндотелиальные клетки и перициты, окруженные базальной мембраной, образуют капиллярные кровеносные сосуды. Ангиогенез начинается с разрушения базальной мембраны ферментами, высвобожденными эндотелиальными клетками и лейкоцитами. Эндотелиальные клетки, которые выстилают полость кровеносных сосудов, затем выступают через базальную мембрану. Ангиогенные стимулирующие



факторы индуцируют эндотелиальные клетки к мигрированию через разрушенную базальную мембрану. Мигрирующие клетки образуют "отросток" от родительского кровеносного сосуда, где эндотелиальные клетки претерпевают митоз и пролиферируют. Эндотелиальные отростки сливаются друг с другом с образованием капиллярных петель, создавая новый кровеносный сосуд.

Блокирующее VEGFR2 антитело человека к VEGF согласно настоящему изобретению можно применять в комбинации с любым одним или более другими антиангиогенными способами лечения. Также включены комбинации с другими агентами, которые ингибируют VEGF, такими как другие нейтрализующие антитела (Kim и др., 1992; Presta и др., 1997; Sioussat и др., 1993; Kondo и др., 1993; Asano и др., 1995; Hurwitz и др., 2004), конструкции с растворимым рецептором (Kendall и Thomas, 1993; Aiello и др., 1995; Lin и др., 1998; Millauer и др., 1996), ингибиторы тирозинкиназы (Siemeister и др., 1998), антисмысловые стратегии, аптамеры РНК и рибозимы против VEGF или рецепторов VEGF (Saleh и др., 1996; Cheng и др., 1996; каждый из которых включен в данную заявку посредством ссылки). Варианты VEGF с антагонистическими свойствами также можно применять, как описано в WO 98/16551, специально включенной в данную заявку посредством ссылки.

Антиангиогенные способы лечения могут быть основаны на введении антиангиогенного агента или ингибировании ангиогенного агента. Ингибирования ангиогенных агентов можно достигнуть с помощью одного или более способов, описанных для ингибирования VEGF, включая нейтрализующие антитела, конструкции с растворимым рецептором, низкомолекулярные ингибиторы, антисмысловые технологии, аптамерные РНК и рибозимы, каждый из которых можно использовать. Например, антитела к ангиогенину можно использовать, как описано в патенте США № 5520914, специально включенном в данную заявку посредством ссылки. Поскольку FGF связан с ангиогенезом, ингибиторы FGF также можно применять. Некоторые примеры представляют собой соединения, включающие в качестве основных повторяющихся единиц N-ацетилглюкозамин, чередующийся с последовательностью 2-О-сульфатированной уроновой кислоты, включая гликозаминогликаны, такие как ахарана (archaran) сульфат. Такие соединения описаны в патенте США № 6028061, специально включенном в данную заявку посредством ссылки, и их можно применять в комбинации с настоящим изобретением.

В настоящее время известны многочисленные ингибиторы тирозинкиназы, полезные для лечения ангиогенеза, который проявляется в различных болезненных состояниях. Они включают, например, 4-аминопирроло[2,3-d]пиримидины из патента США № 5639757, специально включенного в данную заявку посредством ссылки, который также можно применять в комбинации с настоящим изобретением. Дополнительные примеры органических молекул, способных модулировать тирозинкиназную передачу сигнала через рецептор VEGFR2, представляют собой соединения и композиции хиназолина из патента США № 5792771, который специально включен в данную заявку посредством ссылки с целью описания дополнительных комбинаций для применения совместно с настоящим изобретением при лечении ангиогенных заболеваний.

Соединения других химических классов также были показаны как ингибирующие ангиогенез, и их можно применять в комбинации с настоящим изобретением. Например, стероиды, такие как ангиостатические 4,9(11)-стероиды и C21-оксигенированные стероиды, описанные в патенте США № 5972922, специально включенном в данную заявку посредством ссылки, можно использовать в комбинированной терапии. В патентах США № 5712291 и 5593990, каждый из которых специально включен в данную заявку посредством ссылки, описаны талидомид и родственные соединения, предшественники, аналоги, метаболиты и продукты гидролиза, которые также можно применять в комбинации с настоящим изобретением, чтобы ингибировать ангиогенез. Соединения из патентов США №№ 5712291 и 5593990 можно вводить перорально. Дополнительные типичные антиангиогенные агенты, которые полезны в комбинированной терапии, перечислены в табл. D. Каждый из агентов, перечисленных в этой таблице, является примером и ни в коем случае не ограничивает настоящее изобретение.

## Ингибиторы и отрицательные регуляторы ангиогенеза

| Вещества                                                                                        | Ссылки                                                                                                              |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Растворимый VEGFR1                                                                              | Shibuya, 2006                                                                                                       |
| Растворимый нейропилин-1 (NRP-1)                                                                | Gagnon и др., 2000                                                                                                  |
| Ангиостатин                                                                                     | O'Reilly и др., 1994                                                                                                |
| Эндостатин                                                                                      | O'Reilly и др., 1997                                                                                                |
| Ангиопэтин 2                                                                                    | Maisonpierre и др., 1997                                                                                            |
| Кальретикулин                                                                                   | Pike и др., 1999                                                                                                    |
| Вазостатин                                                                                      | Pike и др., 1998                                                                                                    |
| Васкулостатин                                                                                   | Kaug и др., 2005                                                                                                    |
| Канстатин                                                                                       | Kamphaus и др., 2000                                                                                                |
| Маспин                                                                                          | Zou и др., 1994                                                                                                     |
| 16 кДа фрагмент пролактина                                                                      | Ferrara и др., 1991; Clapp и др., 1993; D'Angelo и др., 1995; Lee и др., 1998                                       |
| Ламининовые пептиды                                                                             | Kleinman и др., 1993; Yamamura и др., 1993; Iwamoto и др., 1996; Tryggvason, 1993                                   |
| Фибронектиновые пептиды                                                                         | Grant и др., 1998; Sheu и др., 1997                                                                                 |
| Тканевые ингибиторы металлопротеиназы (TIMP 1, 2, 3, 4)                                         | Sang, 1998                                                                                                          |
| Ингибиторы активатора плазминогена (PAI-1, -2)                                                  | Soff и др., 1995                                                                                                    |
| Фактор некроза опухоли $\alpha$ (высокая доза, <i>in vitro</i> )                                | Frater-Schroder и др., 1987                                                                                         |
| TGF- $\beta$ 1                                                                                  | RayChadhury и D'Amore, 1991; Tada и др., 1994                                                                       |
| Интерфероны (IFN- $\alpha$ , - $\beta$ , $\gamma$ )                                             | Moore и др., 1998; Lingen и др., 1998                                                                               |
| ELR- CXC хемокины: IL-12; IL-4; IL-18; SDF-1; MIG; тромбоцитарный фактор 4 (PF4); IP-10; CXCL10 | Moore и др., 1998; Hiscox и Jiang, 1997; Coughlin и др., 1998; Tanaka и др., 1997                                   |
| Тромбоспондин (TSP), TSP-1 и TSP-2                                                              | Good и др., 1990; Frazier, 1991; Bornstein, 1992; Tolsma и др., 1993; Sheibani и Frazier, 1995; Volpert и др., 1998 |
| SPARC                                                                                           | Hasselaar и Sage, 1992; Lane и др., 1992; Jendraschak и Sage, 1996                                                  |
| 2-метоксиэстрадиол                                                                              | Fotsis и др., 1994                                                                                                  |
| Родственный пролиферину белок                                                                   | Jackson и др., 1994                                                                                                 |
| Сурамин                                                                                         | Gagliardi и др., 1992; Takano и др., 1994; Waltenberger и др., 1996; Gagliardi и др., 1998; Manetti и др., 1998     |
| Талидомид                                                                                       | D'Amato и др., 1994; Kenyon и др., 1997 Wells, 1998                                                                 |
| Карбоксиамидотриазол (CAI)                                                                      | Hussain и др., 2003                                                                                                 |
| Кортизон                                                                                        | Thorpe и др., 1993 Folkman и др., 1983 Sakamoto и др., 1986                                                         |
| Линомид                                                                                         | Vukanovic и др., 1993; Ziche и др., 1998; Nagler и др., 1998                                                        |
| Фумагиллин (AGM-1470; TNP-470)                                                                  | Sipos и др., 1994; Yoshida и др., 1998                                                                              |
| Тамоксифен                                                                                      | Gagliardi и Collins, 1993; Lindner и Borden, 1997; Haran и др., 1994                                                |
| Экстракт корейской омелы ( <i>Viscum album coloratum</i> )                                      | Yoon и др., 1995                                                                                                    |
| Ретиноиды                                                                                       | Oikawa и др., 1989; Lingen и др., 1996; Majewski и др. 1996                                                         |
| CM101                                                                                           | Hellerqvist и др., 1993; Quinn и др., 1995; Wamil и др., 1997; DeVore и др., 1997                                   |
| Дексаметазон                                                                                    | Hori и др., 1996; Wolff и др., 1997                                                                                 |
| Ингибиторный фактор лейкемии (LIF)                                                              | Pepper и др., 1995                                                                                                  |

Некоторые предпочтительные компоненты для применения для ингибирования ангиогенеза представляют собой ангиостатин, эндостатин, васкулостатин, канстатин и маспин. Такие агенты описаны выше в сочетании с иммуноконъюгатами согласно настоящему изобретению, но их можно применять в комбинированной, но неконъюгированной форме.

Уже было показано, что некоторые антиангиогенные способы лечения вызывают регрессии опухолей, включая бактериальный полисахарид CM101 и антитело LM609. CM101 представляет собой бактериальный полисахарид, способность которого индуцировать неоваскулярное воспаление в опухоли была хорошо описана. CM101 связывается и перекрестно связывает рецепторы, экспрессированные на дедифференцированном эндотелии, которые стимулируют активацию системы комплемента. Он также инициирует запускаемый цитокинами воспалительный ответ, который избирательно направлен на опухоль. Он представляет собой уникальный антипатоангиогенный агент, который снижает экспрессию VEGF и его рецепторов. В настоящее время CM101 проходит клинические испытания как противораковый лекарственный препарат, и его можно применять в комбинации с настоящим изобретением.

Тромбоспондин (TSP-1) и тромбоцитарный фактор 4 (PF4) также можно применять в комбинации с настоящим изобретением. Они представляют собой ингибиторы ангиогенеза, которые связываются с гепарином и обнаруживаются в  $\alpha$ -гранулах тромбоцитов. TSP-1 представляет собой большой 450 кДа многодоменный гликопротеин, который является составляющей внеклеточного матрикса. TSP-1 связывается со многими молекулами протеогликанов, обнаруживаемыми во внеклеточном матриксе, включая гепаран сульфат протеогликан (HSPG), фибронектин, ламинин и различные типы коллагена. TSP-1 ингибирует миграцию и пролиферацию эндотелиальных клеток *in vitro* и ангиогенез *in vivo*. TSP-1 также может подавлять злокачественный фенотип и онкогенез трансформированных эндотелиальных клеток. Было показано, что ген опухолевого супрессора p53 непосредственно регулирует экспрессию TSP-1 таким образом, что потеря активности p53 вызывает значительное снижение продукции TSP-1 и сопутствующее увеличение опухоли, инициировавшей ангиогенез.

PF4 представляет собой 70 АК белок, который является членом семейства ELR-хемокинов CXC, которые способны эффективно ингибировать пролиферацию эндотелиальных клеток *in vitro* и ангиогенез *in vivo*. PF4, который вводят внутрь опухоли или доставляют с помощью аденовирусного вектора, способен вызывать ингибирование опухолевого роста.

Интерфероны и ингибиторы металлопротеиназ представляют собой два других класса встречающихся в природе ангиогенных ингибиторов, которые можно комбинировать с настоящим изобретением. Противэндотелиальная активность интерферонов была известна с начала 1980-х гг., тем не менее, механизм ингибирования все еще неясен. Известно, что они могут ингибировать миграцию эндотелиальных клеток и что они действительно проявляют некоторую антиангиогенную активность *in vivo*, которая, возможно, опосредована способностью ингибировать продукцию ангиогенных промоторов опухолевыми клетками. Сосудистые опухоли, в частности, чувствительны к интерферону, например, пролиферирующие гемангиомы можно успешно лечить IFN $\alpha$ .

Тканевые ингибиторы металлопротеиназ (TIMP) представляют собой семейство встречающихся в природе ингибиторов матриксных металлопротеиназ (MMP), которые также могут ингибировать ангиогенез и которые можно применять в комбинированных схемах лечения. MMP играют ключевую роль в ангиогенном процессе, так как они разрушают матрикс, через который эндотелиальные клетки и фибробласты мигрируют при расширении или ремоделировании сосудистой сети. Фактически, было показано, что один член семейства MMP, MMP-2, связывается с активированным эндотелием посредством интегрина  $\alpha_v\beta_3$  предположительно для этой цели. Если это взаимодействие нарушается фрагментом MMP-2, тогда ангиогенез подавляется и рост опухоли ингибируется.

Существует целый ряд фармакологических агентов, которые ингибируют ангиогенез, любой один или более из которых можно применять в комбинации с настоящим изобретением. Такие агенты включают AGM-1470/TNP-470, талидомид и карбоксиамидотриазол (CAI). Фумагиллин был обнаружен как эффективный ингибитор ангиогенеза в 1990 г., и с тех пор были разработаны синтетические аналоги фумагиллина, AGM-1470 и TNP-470. Оба этих лекарственных препарата ингибируют пролиферацию эндотелиальных клеток *in vitro* и ангиогенез *in vivo*. TNP-470 был тщательно исследован в клинических испытаниях на человеке, результаты которых позволили предложить, что длительное введение является оптимальным.

Талидомид исходно применялся как седативное средство, но затем было обнаружено, что он является мощным тератогеном, и он был снят с производства. В 1994 г. обнаружили, что талидомид является ингибитором ангиогенеза. Талидомид в настоящее время проходит клинические испытания в качестве противоракового агента, а также для лечения сосудистых заболеваний глаз.

CAI представляет собой низкомолекулярный синтетический ингибитор ангиогенеза, действующий как блокатор кальциевых каналов, который предотвращает реорганизацию актина, миграцию эндотелиальных клеток и распределение по коллагену IV. CAI ингибирует неоваскуляризацию при физиологически достижимых концентрациях и хорошо переносится раковыми пациентами при пероральном введении. Клинические испытания CAI позволили достигнуть стабилизации заболевания у 49% раковых паци-

ентов, имеющих прогрессирующее заболевание перед началом лечения.

Было показано, что кортизон в присутствии гепарина или фрагментов гепарина ингибирует опухолевый рост у мышей посредством блокирования пролиферации эндотелиальных клеток. Механизм, вовлеченный в аддитивный ингибиторный эффект указанного стероида и гепарина, неясен, хотя полагают, что гепарин может повышать поглощение стероида эндотелиальными клетками. Было показано, что смесь повышает разрушение базальной мембраны под вновь образованными капиллярами, и это также является возможным объяснением аддитивного ангиостатического эффекта. Конъюгаты гепарин-кортизол также проявляют эффективное ангиостатическое и противоопухолевое действие *in vivo*.

Дополнительные специфичные ингибиторы ангиогенеза, включая, но не ограничиваясь перечисленными, противоинвазивный фактор, ретиновые кислоты и паклитаксел (патент США № 5716981; включен в данную заявку посредством ссылки); AGM-1470 (Ingber и др., 1990; включен в данную заявку посредством ссылки); экстракт хряща акулы (патент США № 5618925; включен в данную заявку посредством ссылки); анионный полиамид или олигомеры полимочевины (патент США № 5593664; включен в данную заявку посредством ссылки); производные оксидола (патент США № 5576330; включен в данную заявку посредством ссылки); производные эстрадиола (патент США № 5504074; включен в данную заявку посредством ссылки) и производные тиазолопиримидина (патент США № 5599813; включен в данную заявку посредством ссылки), также предполагаются в качестве антиангиогенных композиций для комбинированного применения согласно настоящему изобретению.

Композиции, включающие антагонист интегрин  $\alpha_v\beta_3$ , также можно применять для ингибирования ангиогенеза в комбинации с настоящим изобретением. В патенте США № 5766591 (включен в данную заявку посредством ссылки) описано, что полипептиды, включающие RGD, и их соли, включая циклические полипептиды, являются подходящими примерами антагонистов  $\alpha_v\beta_3$  интегрин.

Антитело LM609 к интегрину  $\alpha_v\beta_3$  также индуцирует регрессии опухолей. Антагонисты интегрин  $\alpha_v\beta_3$ , такие как LM609, индуцируют апоптоз ангиогенных эндотелиальных клеток, оставляя неактивные кровеносные сосуды неповрежденными. LM609 или другие антагонисты  $\alpha_v\beta_3$  также могут действовать путем ингибирования взаимодействия  $\alpha_v\beta_3$  и MMP-2, протеолитического фермента, который считают играющим важную роль в миграции эндотелиальных клеток и фибробластов. Патент США № 5753230 специально включен в данную заявку посредством ссылки, чтобы описать антитело к  $\alpha_v\beta_3$  (витронектин  $\alpha_v\beta_3$ ) для комбинированного применения с настоящим изобретением для ингибирования ангиогенеза.

Апоптоз ангиогенного эндотелия в этом случае может оказывать каскадный эффект на остальную сосудистую сеть. Ингибирование сосудистой сети опухоли относительно полностью отвечающей на сигнал опухоли расширяться, фактически, может инициировать частичное или полное разрушение сети, что приводит к гибели опухолевых клеток и потере объема опухоли. Возможно, что эндостатин и ангиостатин действуют аналогичным образом. Тот факт, что LM609 не поражает неактивные сосуды, но способен вызывать регрессии опухолей, убедительно позволяет предположить, что не все кровеносные сосуды в опухоли должны быть мишенью для лечения, чтобы получить противоопухолевый эффект.

Другие способы терапевтического вмешательства, основанные на изменениях передачи сигналов через рецептор Tie2, также можно применять в комбинации с настоящим изобретением, например, можно использовать растворимый рецептор Tie2, способный блокировать активацию Tie2 (Lin и др., 1998). Было показано, что доставка такой конструкции с применением рекомбинантной аденовирусной генотерапии эффективна для лечения рака и уменьшения метастаз (Lin и др., 1998).

### G3. Индуцирующие апоптоз агенты.

Терапевтические агенты с блокирующим VEGFR2 антителом человека к VEGF также можно полезно комбинировать со способами индуцирования апоптоза. Различные индуцирующие апоптоз агенты были описаны выше применительно к иммуноконъюгатам согласно настоящему изобретению. Любой такой индуцирующий апоптоз агент можно применять в комбинации с настоящим изобретением в не связанном с антителом согласно настоящему изобретению виде.

Помимо индуцирующих апоптоз агентов, описанных выше как иммуноконъюгаты, был идентифицирован целый ряд онкогенов, которые ингибируют апоптоз или программированную клеточную гибель. Типичные онкогены в этой категории включают, но не ограничены перечисленными, bcr-abl, bcl-2 (отличный от bcl-1, циклин D1; номер доступа в GenBank M14745, X06487; патенты США № 5650491 и 5539094; каждый из которых включен в данную заявку посредством ссылки) и члены их семейства, включая Bcl-xl, Mcl-1, Bak, A1, A20. Чрезмерная экспрессия bcl-2 была впервые открыта в Т-клеточных лимфомах. bcl-2 функционирует как онкоген путем связывания и инактивирования Bax, белка апоптического пути. Ингибирование функции bcl-2 предотвращает инактивацию Bax и позволяет происходить апоптическому пути.

Ингибирование этого класса онкогенов, например, применяя антисмысловые последовательности нуклеотидов, предполагается для применения в настоящем изобретении, чтобы добиться усиления апоптоза (патенты США № 5650491; 5539094 и 5583034; каждый из которых включен в данную заявку посредством ссылки).

### G4. Иммунотоксины и коагулиганды.

Способы лечения согласно настоящему изобретению можно применять в комбинации с иммунотоксинами и/или коагулигандами, в которых нацеливающая их часть, например антитело или лиганд, направлена на относительно специфичный маркер опухолевых клеток, сосудистой сети опухоли или стромы опухоли. Подобно химиотерапевтическим и антиангиогенным агентам, обсуждаемым выше, комбинированное применение целевых токсинов или коагулянтов, как правило, приведет к аддитивным, заметно большим, чем аддитивные, или даже синергическим противоопухолевым результатам.

Вообще говоря, антитела или лиганды для применения в этих дополнительных аспектах настоящего изобретения будут предпочтительно узнавать доступные опухолевые антигены, которые предпочтительно или специфично экспрессируются в месте локализации опухоли. Антитела или лиганды также предпочтительно будут проявлять свойства высокой аффинности; и указанные антитела, лиганды или их конъюгаты не будут проявлять значительных побочных эффектов *in vivo* против жизнеобеспечивающих нормальных тканей, таких как одна или более тканей, выбранных из сердца, почки, мозга, печени, костного мозга, толстой кишки, груди, предстательной железы, щитовидной железы, желчного пузыря, легкого, надпочечника, мышц, нервных волокон, поджелудочной железы, кожи или других жизнеобеспечивающих органов или тканей в организме человека. Термин "значительные побочные эффекты" в данной заявке относится к антителу, лиганду или конъюгату антитела, которые при введении *in vivo* будут вызывать лишь незначительные или клинически контролируемые побочные эффекты, такие которые обычно встречаются во время химиотерапии.

По меньшей мере один участок связывания этих вторых противораковых агентов, используемых в комбинации с настоящим изобретением, будет представлять собой компонент, который способен доставлять токсин или фактор свертывания крови в участок опухоли, т.е. способен локализоваться в месте локализации опухоли. Такие нацеливающие агенты могут быть направлены против компонента опухолевой клетки, сосудистой сети опухоли или стромы опухоли. Нацеливающие агенты, как правило, будут связываться с экспрессированным на поверхности, доступным на поверхности или локализованным на поверхности компонентом опухолевой клетки, сосудистой сети опухоли или стромы опухоли. Тем не менее, как только начнется разрушение сосудистой сети опухоли и опухолевой клетки, внутренние компоненты будут высвобождены, позволяя дополнительное нацеливание на практически любой компонент опухоли.

Были описаны многие антигены опухолевой клетки, любой из которых можно использовать в качестве целевого применительно к комбинированным аспектам настоящего изобретения. Подходящие антигены опухолевой клетки для дополнительного нацеливания иммунотоксина и коагулиганда включают такие, которые узнаются антителами B3 (патент США № 5242813); включен в данную заявку посредством ссылки; ATCC HB 10573); KSI/4 ((патент США № 4975369); включен в данную заявку посредством ссылки; полученным из клетки, включающей векторы NRRL B-18356 и/или NRRL B-18357); 260F9 (ATCC HB 8488); и D612 (патент США № 5183756); включен в данную заявку посредством ссылки; ATCC HB 9796). Также можно обратиться к каталогу ATCC любого из последующих лет, чтобы определить другие подходящие линии клеток, продуцирующие антитела против опухолевых клеток.

Для нацеливания на сосудистую сеть опухоли нацеливающее антитело или лиганд часто будет связываться с маркером, экспрессированным, адсорбированным, индуцированным или иным способом локализованным на внутриопухолевых кровеносных сосудах васкуляризированной опухоли. Подходящие экспрессированные целевые молекулы включают, например, эндоглин, Е-селектин, Р-селектин, VCAM-1, ICAM-1, PSMA (Liu и др., 1997), TIE, лиганд, реагирующий с LAM-1, рецептор VEGF/VPF, рецептор FGF, интегрин  $\alpha_v\beta_3$ , плейотропин и эндосиалин. Подходящие адсорбированные мишени представляют собой такие, как VEGF, FGF, TGF $\beta$ , HGF, PF4, PDGF, TIMP, лиганд, который связывается с TIE, и связанные с опухолью изоформы фибронектина. Также могут быть целевыми антигены, которые естественным и искусственным образом индуцируются цитокинами и коагулянтами, такие как ELAM-1, VCAM-1, ICAM-1, лиганд, реагирующий с LAM-1, эндоглин и даже МНС II класса (индуцируемые цитокинами, например, IL-1, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-4 и/или TNF- $\beta$ ); и Е-селектин, Р-селектин, PDGF и ICAM-1 (индуцируемый коагулянтами, например тромбином, фактором IX/IXa, фактором X/Xa и/или плазмином).

Следующие патенты специально включены в данную заявку посредством ссылки с целью еще большего дополнения настоящей идеи, касающейся получения и применения иммунотоксинов, направленных против экспрессированных, адсорбированных, индуцированных или локализованных маркеров сосудистой сети опухоли: патенты США №№ 6093399; 5855866; 5965132; 6051230; 6004555; 5877289; 6004554; 5776427; 5863538; 5660827 и 6036955.

Дополнительные композиции и способы нацеливания на сосудистую сеть опухоли включают такие, которые нацелены на аминокислоты, такие как фосфатидилсерин и фосфатидилэтаноламин, про которые недавно выяснили, что они являются доступными, специфичными маркерами кровеносных сосудов опухоли. Введения отдельно антител против аминокислот достаточно, чтобы индуцировать тромбоз и регрессию опухоли. Настоящее изобретение, таким образом, можно эффективно комбинировать с неконъюгированными антителами против фосфатидилсерина и/или фосфатидилэтаноламина; или можно применять иммуноконъюгаты таких антител.

Следующие патенты особенно включены в данную заявку посредством ссылки с целью еще большего дополнения настоящей идеи, касающейся получения и применения антител против аминоксифолипидов и их иммунотоксинов: патенты США №№ 6406693; 6312694; 6783760; 6818213 и 7067109. Патенты США №№ 6312694; 6783760; 6818213 и 7067109 дополнительно включены в данную заявку посредством ссылки с целью дополнительного пополнения настоящей идеи, касающейся применения конъюгатов белков, связывающих аминоксифолипиды, таких как конъюгаты с аннексином, для применения для доставки токсинов и коагулянтов в кровеносные сосуды опухоли и для индуцирования тромбоза и регрессии опухоли.

Подходящие мишени стромы опухоли включают компоненты внеклеточного матрикса или стромы опухоли или компоненты, связанные с ними; включая маркеры базальной мембраны, коллаген типа IV, ламинин, гепарансульфат, протеогликан, фибронектины, активированные тромбоциты, LIBS и тенацин. Предпочтительной мишенью для таких применений является RIBS.

Следующие патенты специально включены в данную заявку посредством ссылки с целью еще большего дополнения настоящей идеи, касающейся получения и применения нацеливающих на строму опухоли агентов: патенты США №№ 6093399; 6004555; 5877289 и 6036955.

Второе противораковое лекарство может быть функционально связано с любыми цитотоксическими или другим образом направленными против клеток агентами, описанными в данной заявке, для применения в блокирующем VEGFR2 антителе к VEGF или иммунотоксинах, основанных на блокирующем VEGFR2 антителе к VEGF. Тем не менее, подходящие направленные против клеток агенты также включают радиоактивные изотопы. Молекулы токсина будут предпочтительными, такие как А-цепь и дегликозилированная А-цепь (dgA) рицина.

Второй целевой агент для возможного применения с настоящим изобретением может включать нацеленный компонент, который способен активировать коагуляцию, т.е. коагулиганд. В настоящей заявке нацеливающее антитело или лиганд может быть непосредственно или опосредованно, например посредством другого антитела, связан с любым фактором, который непосредственно или опосредованно стимулирует коагуляцию, включая любой из описанных в данной заявке для применения с блокирующим VEGFR2 антителом к VEGF или в основанных на блокирующем VEGFR2 антителе к VEGF коагулигандах. Предпочтительные факторы свертывания крови для таких применений представляют собой тканевый фактор (TF) и производные TF, такие как укороченный TF (tTF), димерный и мультимерный TF и мутантный TF, лишенный способности активировать фактор VII.

Эффективные дозы иммунотоксинов и коагулигандов для комбинированного применения при лечении рака будут составлять между приблизительно 0,1 и приблизительно 2 мг/кг и предпочтительно между приблизительно 0,8 и приблизительно 1,2 мг/кг при введении внутривенным путем с частотой приблизительно 1 раз в неделю. Некоторые изменения дозировки обязательно будут происходить в зависимости от состояния субъекта, которого лечат. Лечащий врач, ответственный за введение, определит подходящую дозу для конкретного субъекта.

#### G5. Агонисты TLR

В настоящее время установлено, что передача сигналов через Toll-подобные рецепторы (TLR) способствует действию известных противораковых агентов, включая *S. choleraesuis* со сниженной вирулентностью, BCG и таксол, каждый из которых активирует TLR4. Действительно, передача сигналов через TLR4 способствует противораковым эффектам химиотерапии и лучевой терапии (Apetoh и др., 2007). Помимо лучшего понимания механизмов действия некоторых известных противораковых агентов, обнаружение важности передачи сигналов через TLR также стимулировало разработку новых лекарств от рака, которые действуют путем активирования TLR.

Следовательно, блокирующие VEGFR2 антитела человека к VEGF согласно настоящему изобретению можно применять для лечения рака в комбинации с одним или более агентами, которые стимулируют передачу сигналов через TLR, т.е. с одним или более агонистами TLR. По меньшей мере, первый агонист TLR также может быть функционально связан с антителом человека согласно настоящему изобретению, чтобы создать терапевтический конъюгат, как описано в данной заявке в разделе про иммуноконъюгаты. Любой один или более из следующих или других агонистов TLR можно применять в комбинированном лечении рака согласно настоящему изобретению.

Подходящие агонисты TLR включают агонисты любого одного или более из TLR1-TLR11, предпочтительно TLR1, TLR2, TLR4, TLR7, TLR8 или TLR9 и наиболее предпочтительно TLR4, TLR7, TLR8 или TLR9. Агонисты TLR1/TLR2 включают липопротеины, например OspA и триацилированные липопептиды, и агонисты TLR2 включают бактериальные липопротеины, LAM, MALP-2, GPI, гликолипиды и порины.

Конкретные примеры агонистов TLR4 включают агонистическое антитело к TLR4, названное 5D24.D4 (Cohen и др., 2003), липополисахарид (LPS), липид А и его производные, из которых монофосфорил-липид А (MPL) и аналоги MPL в настоящее время являются предпочтительными. Аналоги MPL, также называемые AGP, можно применять в качестве синтетических агонистов TLR4 в комбинации с настоящим изобретением (Alderson и др., 2006). Агонисты, стимулирующие передачу сигналов через TLR4 и CD14, также включают LPS, липид А, MPL и аналоги MPL, а также таксол, паклитаксел, флаво-

липидов и GIPL. Агонисты TLR4 - ОК-432 и ОК-PSA - применяют для лечения рака шейки матки и немелкоклеточной карциномы легкого.

Агонисты TLR7 включают имиквимод, резиквимод и изаторибин (Finberg и др., 2005; Horsmans и др., 2005), имиквимод был одобрен для применения для лечения базально-клеточной карциномы. Другие агонисты TLR7 включают гардиквимод (gardiquimod), локсорибин и бропиримин. Резиквимод также представляет собой агонист TLR8. Агонисты TLR9, такие как CpG, применяли для лечения немелкоклеточной карциномы легкого, неходжкинской лимфомы, почечноклеточной карциномы и колоректального рака.

#### G6. ADEPT и терапия пролекарствами.

Блокирующие VEGFR2 антитела человека к VEGF согласно настоящему изобретению можно применять в сочетании с пролекарствами, в которых блокирующее VEGFR2 антитело человека к VEGF функционально связано с активирующим пролекарство компонентом, таким как активирующий пролекарство фермент, который превращает пролекарство в более активную форму лишь при контакте с анти-телом. Эту технологию, как правило, называют "ADEPT", и она описана, например, в WO 95/13095; WO 97/26918, WO 97/24143 и патентах США №№ 4975278 и 5658568, каждый из которых специально включен в данную заявку посредством ссылки.

Термин "пролекарство" в данной заявке относится к предшественнику или производной форме биологически или фармацевтически активного вещества, которое оказывает пониженное цитотоксическое или иное противоклеточное действие на целевые клетки, включая эндотелиальные клетки сосудов опухоли, по сравнению с родительским лекарственным препаратом, на котором оно основано. Предпочтительно пролекарство или форма предшественника оказывает значительно пониженные или более предпочтительно незначительные, цитотоксические или противоклеточные эффекты по сравнению с "нативной" или родительской формой. "Пролекарства" способны активироваться или превращаться с получением более активной, родительской формы лекарственного препарата.

Техническая способность получения и применения пролекарств находится в рамках компетенции специалиста в данной области техники. Willman и др. (1988) и Stella и Himmelstein (1985) каждый специально включен в данную заявку посредством ссылки с целью дополнительного пополнения описания и идеи, касающейся способов получения и применения различных пролекарств. Типичные конструкции пролекарств, которые можно применять в контексте настоящего изобретения, включают, но не ограничены перечисленными, пролекарства, включающие фосфат (патент США № 4975278), пролекарства, включающие тиофосфат, пролекарства, включающие сульфат, основанные на пептидах пролекарства (патенты США №№ 5660829; 5587161; 5405990; WO 97/07118), модифицированные D-аминокислотами пролекарства, гликозилированные пролекарства (патенты США №№ 5561119; 5646298; 4904768, 5041424), пролекарства, включающие β-лактамы, пролекарства, включающие возможно содержащий заместитель феноксиацетамид (патент США № 4975278), пролекарства, включающие возможно содержащий заместитель фенилацетамид и даже пролекарства, включающие 5-фторцитозин (патент США № 4975278) и 5-фторуридин и т.п., при этом каждый из патентов специально включен в данную заявку посредством ссылки.

Тип терапевтического агента или цитотоксического лекарственного препарата, который можно применять в форме пролекарства, практически неограничен. Более цитотоксические агенты будут предпочтительными для такой формы доставки, например, над доставкой коагулянтов, которые менее предпочтительны для применения в качестве пролекарств. Все что требуется при получении пролекарства - это разработка такой конструкции, чтобы пролекарство было, по существу, неактивным, и "высвобожденный" или активированный лекарственный препарат проявлял существенную или, по меньшей мере, достаточную активность для предполагаемой цели.

Различные усовершенствования исходных пролекарств также известны и предполагаются для применения в соответствии с настоящим изобретением, как описано в WO 95/03830; EP 751144 (антрациклины); WO 97/07097 (циклопропилиндолы) и WO 96/20169. Например, в патенте США № 5621002, специально включенном в данную заявку посредством ссылки, описаны пролекарства с пониженной K<sub>m</sub>, которые можно применять в контексте настоящего изобретения. Терапия пролекарствами, которую осуществляют внутриклеточно, также известна, ее примером является WO 96/03151, специально включенный в данную заявку посредством ссылки, и ее можно осуществить в соответствии с настоящим изобретением.

Для применения в технологии ADEPT, агент, который активирует или превращает пролекарство в более активный лекарственный препарат, функционально связан с блокирующим VEGFR2 антителом человека к VEGF. Блокирующее VEGFR2 антитело человека к VEGF, таким образом, локализует превращающую способность пролекарства внутри ангиогенного участка, предпочтительно внутри сосудистой сети и стромы опухоли, так что активный лекарственный препарат образуется только в таких участках, но не в кровотоке или здоровых тканях.

Ферменты, которые можно присоединить к блокирующим VEGFR2 антителам человека к VEGF, чтобы они активировали пролекарство, включают, но не ограничены перечисленными, щелочную фосфатазу для применения в комбинации с пролекарствами, включающими фосфат (патент США №

4975278); арилсульфатазу для применения в комбинации с пролекарствами, включающими сульфат (патент США № 5270196); пептидазы и протеиназы, такие как протеиназа из *Serratia*, термолизин, субтилизин, карбоксипептидаза (патенты США № 5660829; 5587161; 5405990) и катепсины (включая катепсин В и L), для применения в комбинации с основанными на пептидах пролекарствами; D-аланилкарбоксипептидазы для применения в комбинации с пролекарствами, модифицированными D-аминокислотой; расщепляющие углеводы ферменты, такие как  $\beta$ -галактозидаза и нейраминидаза для применения в комбинации с гликозилированными пролекарствами (патент США № 5561119; 5646298);  $\beta$ -лактамазу для применения в комбинации с пролекарствами, включающими  $\beta$ -лактамы; пенициллин-амидазы, такие как пенициллин V амидаза (патент США № 4975278) или пенициллин G амидаза, для применения в комбинации с лекарственными препаратами, модифицированными по атомам азота аминогруппы феноксиацетамидными или фенилацетамидными группами; и дезаминазу цитозина (патенты США №№ 5338678; 5545548) для применения в комбинации с основанными на 5-фторцитозине пролекарствами (патент США № 4975278), при этом каждый из указанных патентов специально включен в данную заявку посредством ссылки.

Антитела с ферментативной активностью, также называемые каталитическими антителами или "абзимами", также можно использовать для превращения пролекарств в активные лекарственные препараты. Абзимы, основанные на блокирующих VEGFR2 антителах человека к VEGF, таким образом, образуют другой аспект настоящего изобретения. Технической способностью получения таких абзимов также обладает рядовой специалист в данной области техники, например, как описано в Massey (1987), специально включенном в данную заявку посредством ссылки с целью пополнения идеи абзимов. Каталитические антитела, способные катализировать распад пролекарства в положении карбамата, такого как арилкарбамат с азотистым ипритом, дополнительно предполагаются, как описано в EP 745673, специально включенном в данную заявку посредством ссылки.

#### G7. Офтальмологические комбинации.

Блокирующие VEGFR2 антитела человека к VEGF согласно настоящему изобретению можно применять в комбинации с другими способами лечения для лечения офтальмологических заболеваний и ангиогенных офтальмологических заболеваний, включая диабетическую ретинопатию, дистрофию желтого пятна, возрастную дистрофию желтого пятна, неоваскулярную глаукому и другие офтальмологические заболевания, описанные выше. Указанные антитела можно комбинировать с любыми другими способами, как правило, используемыми при лечении офтальмологических заболеваний, включая хирургическое вмешательство.

Что касается комбинаций с другими терапевтическими агентами, блокирующие VEGFR2 антитела человека к VEGF можно вводить перед, после или, по существу, в одно и то же время с другим терапевтическим агентом. По существу, одновременного введения можно достигнуть в составе одной композиции или в составе двух различных композиций.

Что касается хороидальной неоваскуляризации, такой, которая связана с дистрофией желтого пятна, возрастной дистрофией желтого пятна (AMD) и другими офтальмологическими показаниями, некоторые предпочтительные комбинации согласно настоящему изобретению представляют собой такие, в которых применяется второй агент, который блокирует, ингибирует, уменьшает, снижает экспрессию или антагонизирует SPARC (секретируемый белок, кислый и богатый цистеином) (Nozaki и др., 2006; U.S. 2006/0135423). Так как антитела согласно настоящему изобретению уже блокируют активацию VEGFR2, но не активацию VEGFR1, их комбинация с одним или более агентами, которые блокируют SPARC, будет обеспечивать особенно эффективный способ дополнительного уменьшения индуцированного VEGF ангиогенеза в глазу.

Ингибиторы или антагонисты SPARC включают, например, такие, которые имеют такой же молекулярный тип, который был успешно разработан против VEGF. Типичные ингибиторы SPARC, таким образом, включают ингибиторные антитела против SPARC и их антигенсвязывающие фрагменты (например, Sweetwune и др., 2004); антисмысловые стратегии, такие как аптамеры РНК и РНК/ДНК аптамеры, замалчивающие РНК (малые интерферирующие РНК (миРНК) или интерферирующие РНК (иРНК)), которые замалчивают или интерферируют с экспрессией SPARC; рибозимы; и другие белковые, пептидные и низкомолекулярные ингибиторы. Многие такие ингибиторы SPARC, включая поликлональные и моноклональные антитела и миРНК, доступны для приобретения, например, от Sigma/Aldrich, Santa Cruz Biotechnology, Inc., R&D systems. Любой один или более ингибиторов SPARC, таким образом, можно применять в соответствии с настоящим изобретением, чтобы дополнительно блокировать, ингибировать, уменьшить, снизить экспрессию или антагонизировать уровни или активность SPARC, либо на уровнях ДНК, РНК, и/либо на уровне белка.

#### H. Диагностика и визуализация.

Настоящее изобретение дополнительно обеспечивает способы диагностики и визуализации *in vitro* и *in vivo*. Такие способы пригодны для применения для получения диагностических, прогностических или визуальных сведений о любом ангиогенном заболевании, примером которого являются артрит, псориаз и солидные опухоли, также включая все ангиогенные заболевания, описанные в данной заявке. Вне



области диагностики и визуализации опухоли эти аспекты настоящего изобретения наиболее предпочтительны для применения в диагностических тестах *in vitro*, предпочтительно в случаях, когда образцы можно получить неинвазивным путем и протестировать в высокопроизводительных тестах, и/или когда желательна клиническая диагностика в сомнительных случаях и для подтверждения.

H1. Способы и наборы для иммунологического детектирования.

В еще дополнительных вариантах реализации настоящее изобретение относится к способам иммунологического детектирования для связывания, очищения, удаления, определения количества или обнаружения VEGF иным типичным способом и для диагностирования ангиогенных заболеваний. Блокирующие VEGFR2 антитела человека к VEGF согласно настоящему изобретению можно использовать для обнаружения VEGF *in vivo* (см. ниже), в выделенных образцах, биопсийных материалах или смывах и/или в гомогенизированных образцах ткани. Такие способы иммунологического детектирования имеют очевидную диагностическую пользу, но также могут иметь применение в неклинических образцах, например, для титрования образцов антигена, и т.п.

Этапы различных полезных способов иммунологического детектирования были описаны в научной литературе, такой как, например, в Nakamura и др. (1986, включен в данную заявку посредством ссылки). Обычно иммуносвязывающие способы включают получение образца, в котором подозревают наличие VEGF, и приведение во взаимодействие указанного образца с блокирующими VEGFR2 антителами человека к VEGF при условиях, эффективных для образования иммунных комплексов. В таких способах, антитело может быть связано с твердой подложкой, например, в виде матрицы в колонке, и образец, в котором подозревают наличие VEGF, будут наносить на иммобилизованное антитело.

Более предпочтительно иммуносвязывающие способы включают способы обнаружения или определения количества VEGF в образце, такие способы требуют детектирования или количественного анализа любых иммунных комплексов, образованных в процессе связывания. При этом получают образец, в котором подозревают наличие VEGF, и приводят указанный образец во взаимодействие с антителом в соответствии с настоящим изобретением, а затем детектируют или определяют количество иммунных комплексов, образованных при определенных условиях.

Анализируемый биологический образец может представлять собой любой образец, в котором подозревают наличие VEGF, как правило, из животного или пациента, у которого подозревают наличие ангиогенного заболевания. Образцы могут представлять собой срез или образец ткани, пробный образец биопсии, смыва или мазка, гомогенизированный экстракт ткани или их отделенные или очищенные формы.

Приведение во взаимодействие выбранного биологического образца с антителом при эффективных условиях и в течение достаточного периода времени, чтобы обеспечить образование иммунных комплексов (первичных иммунных комплексов), как правило, состоит в обычном добавлении композиции антитела к образцу и инкубировании смеси в течение периода времени, достаточного для образования антителами иммунных комплексов, т.е. для связывания, с любым присутствующим VEGF. После этого комбинацию образец-антитело, такую как срез ткани, планшет ELISA, дот-блот или вестерн-блот, как правило, промывают, чтобы удалить любые неспецифично связанные виды антител, позволяя детектировать лишь такие антитела, которые специфично связаны в составе первичных иммунных комплексов.

Детектирование образования иммунного комплекса хорошо известно в данной области техники, и можно его достигнуть, применяя многочисленные подходы. Такие способы, как правило, основаны на детектировании метки или маркера, такого как любая радиоактивная, флуоресцентная, биологическая или ферментативная метка или маркер, известные в данной области техники. Патенты США, касающиеся применения таких меток, включают 3817837; 3850752; 3939350; 3996345; 4277437; 4275149 и 4366241, каждый из которых включен в данную заявку посредством ссылки. Применение ферментов, которые образуют окрашенный продукт при контакте с хромогенным субстратом, как правило, является предпочтительным. Вторичный связывающий лиганд, такой как вторичное антитело или биотин/авидин лиганд-связывающая структура, также можно применять, как известно в данной области техники.

Блокирующие VEGFR2 антитела человека к VEGF, используемые для детектирования, сами могут быть связаны с детектируемой меткой, при этом надо будет просто детектировать эту метку, тем самым позволяя определить количество первичных иммунных комплексов в композиции.

Предпочтительно первичные иммунные комплексы детектируют посредством вторичного связывающего лиганда, который проявляет аффинность связывания к антителам согласно настоящему изобретению. В этих случаях второй связывающий лиганд может быть связан с детектируемой меткой. Второй связывающий лиганд часто представляет собой антитело и, таким образом, может называться "вторичным" антителом. Первичные иммунные комплексы приводят во взаимодействие с меченым вторичным связывающим лигандом или антителом при эффективных условиях и в течение достаточного периода времени, чтобы обеспечить образование вторичных иммунных комплексов. Вторичные иммунные комплексы затем, как правило, промывают, чтобы удалить любые неспецифично связанные меченые вторичные антитела или лиганды, а затем детектировать оставшуюся метку во вторичных иммунных комплексах.

Дополнительные способы включают детектирование первичных иммунных комплексов с помощью

двухэтапного подхода. Второй связывающий лиганд, такой как антитело, которое проявляет аффинность связывания к первому антителу, используют для получения вторичных иммунных комплексов, описанных выше. После промывки вторичные иммунные комплексы приводят во взаимодействие с третьим связывающим лигандом или антителом, которое проявляет аффинность связывания ко второму антителу, снова при эффективных условиях и в течение достаточного периода времени, чтобы обеспечить образование иммунных комплексов (третичных иммунных комплексов). Третий лиганд или антитело связано с детектируемой меткой, позволяя детектирование третичных иммунных комплексов, образованных таким образом. Эта система может обеспечить усиление сигнала при необходимости.

В клинической диагностике или при мониторинге пациентов с ангиогенным заболеванием детектирование VEGF или увеличение уровней VEGF по сравнению с уровнями в соответствующем биологическом образце из нормального субъекта свидетельствует о том, что пациент страдает от ангиогенного заболевания.

Тем не менее, для специалистов в данной области техники очевидно, что такой клинический диагноз, вероятно, не будет поставлен только на основании этого способа в отдельности. Специалисты в данной области техники знакомы с различием между значительной экспрессией биомаркера, которая обеспечивает положительную идентификацию, и низким уровнем или фоновой экспрессией биомаркера. Действительно, уровни фоновой экспрессии часто используют для получения "порога", выше которого окрашивание оценивают как значительное или положительное.

## H2. Визуализация.

Эти аспекты настоящего изобретения являются предпочтительными для применения в способах визуализации опухоли и комбинированных способах лечения и визуализации опухоли. Блокирующие VEGFR2 антитела человека к VEGF, которые связаны с одним или более детектируемыми агентами, предусматриваются для применения для визуализации *per se* или для предварительной визуализации опухоли с получением достоверного изображения перед лечением. Такие композиции и способы также можно применять для визуализации и диагностики любого другого ангиогенного заболевания или патологического состояния, особенно незлокачественных опухолей, атеросклероза и состояний, при которых внутреннее изображение желательно для диагностических или прогностических целей или для разработки схемы лечения.

Антитела для визуализации блокирующего VEGFR2 антитела человека к VEGF, как правило, будут включать блокирующее VEGFR2 антитело человека к VEGF, функционально присоединенное, или конъюгированное, с детектируемой меткой. "Детектируемые метки" представляют собой соединения или элементы, которые можно детектировать вследствие их специфичных функциональных свойств или химических свойств, применение которых позволяет детектировать компонент, к которому они присоединены, и дополнительно перевести в количественное выражение при необходимости. В конъюгатах антител для диагностических протоколов или "способов визуализации" *in vivo*, требуются метки, которые можно детектировать, применяя неинвазивные способы.

Многие подходящие агенты для визуализации известны в данной области техники, также как и способы их присоединения к антителам и связывающим лигандам (см., например, патенты США №№ 5021236 и 4472509, каждый из которых включен в данную заявку посредством ссылки). Некоторые способы присоединения включают применение металл-хелатного комплекса, включающего, например, органический хелатирующий агент, такой как ДТРА, присоединенный к антителу (патент США № 4472509). Моноклональные антитела также можно приводить во взаимодействие с ферментом в присутствии связывающего агента, такого как глутаральдегид или периодат. Конъюгаты с флуоресцеиновыми маркерами получают в присутствии этих связывающих агентов или путем реакции с изотиоцианатом.

Примером детектируемых меток являются парамагнитные ионы. В этом случае подходящие ионы включают хром(III), марганец(II), железо(III), железо(II), кобальт(II), никель(II), медь(II), неодимий(III), самарий(III), иттербий(III), гадолиний(III), ванадий(II), тербий(III), диспрозий(III), гольмий(III) и эрбий(III), при этом гадолиний является особенно предпочтительным.

Ионы, полезные в других контекстах, таких как визуализация с использованием рентгеновских лучей, включают, но не ограничены перечисленными, лантан(III), золото(III), свинец(II) и особенно висмут(III). Флуоресцентные метки включают родамин, флуоресцеин и ренографин. Родамин и флуоресцеин часто связаны через промежуточный изотиоцианат.

В случае радиоактивных изотопов для диагностических применений, подходящие примеры включают <sup>14</sup>углерод, <sup>51</sup>хром, <sup>36</sup>хлор, <sup>57</sup>кобальт, <sup>58</sup>кобальт, <sup>67</sup>медь, <sup>152</sup>Eu, <sup>67</sup>галлий, <sup>3</sup>водород, <sup>123</sup>йод, <sup>125</sup>йод, <sup>131</sup>йод, <sup>111</sup>индий, <sup>59</sup>железо, <sup>32</sup>фосфор, <sup>186</sup>рений, <sup>188</sup>рений, <sup>75</sup>селен, <sup>35</sup>сера, <sup>99m</sup>технеций и <sup>90</sup>иттрий. <sup>125</sup>I часто является предпочтительным для применения в некоторых вариантах реализации, и <sup>99m</sup>технеций и <sup>111</sup>индий также часто предпочтительны вследствие их низкой энергии и пригодности для длительного детектирования.

Радиоактивно меченые антитела к блокирующему VEGFR2 антителу человека к VEGF для применения в настоящем изобретении можно получить согласно хорошо известным способам в данной области техники. Например, промежуточные функциональные группы, которые часто применяют для связывания радиоизотопных металлических ионов с антителами, представляют собой диэтиленetriамиинпентауксусную кислоту (ДТРА) и этилендиаминтетрауксусную кислоту (EDTA).

Моноклональные антитела также можно йодировать путем взаимодействия с йодидом натрия или калия и химического окисляющего агента, такого как гипохлорит натрия, или ферментативного окисляющего агента, такого как лактопероксидаза. Антитела согласно настоящему изобретению можно пометить технецием-<sup>99m</sup> посредством лигандного обмена, например, путем восстановления пертехната оловянным раствором, хелатирования восстановленного технеция на колонке с сефадексом и нанесения антитела на эту колонку; или с помощью методик непосредственного мечения, например, путем инкубирования пертехната с восстанавливающим агентом, таким как  $\text{SnCl}_2$ , буферным раствором, таким как раствор фталатов натрия-калия и антителом.

Любой из описанных типов детектируемо меченых блокирующих VEGFR2 антител человека к VEGF можно применять в аспектах визуализации или комбинированной визуализации и лечения согласно настоящему изобретению. Они в равной мере подходят для применения в диагностике *in vitro*. Дозировки для вариантов реализации с визуализацией *in vivo*, как правило, будут меньше, чем для терапии, но также зависят от возраста и массы пациента. Однократной дозы должно быть достаточно.

Способы диагностики или визуализации *in vivo*, как правило, включают введение пациенту диагностически эффективного количества блокирующего VEGFR2 антитела человека к VEGF, которое конъюгировано с маркером, который детектируется неинвазивными способами. Конъюгаты антитело-маркер дают достаточное время, чтобы он локализовался и связался с VEGF внутри опухоли. Пациента затем подвергают воздействию детектирующего прибора, чтобы идентифицировать детектируемый маркер, таким образом получая изображения опухоли.

### НЗ. Диагностические наборы.

В еще дополнительных вариантах реализации настоящее изобретение обеспечивает диагностические наборы, включая как наборы для иммунологического детектирования, так и для визуализации, для применения в способах иммунологического детектирования и визуализации, описанных выше. Соответственно, блокирующие VEGFR2 антитела человека к VEGF предусмотрены в составе набора, как правило, включенного в подходящий контейнер.

Для иммунологического детектирования антитела могут быть связаны с твердой подложкой, такой как лунка микротитрационного планшета, хотя растворы или порошки антител для восстановления влагосодержания являются предпочтительными. Наборы для иммунологического детектирования предпочтительно включают, по меньшей мере, первый реагент для иммунологического детектирования. Реагенты для иммунологического детектирования из набора могут принимать любую из множества форм, включая детектируемые метки, которые присоединены или связаны с данным антителом. Также предполагаются детектируемые метки, которые связаны или присоединены к вторичному связывающему лиганду. Типичные вторичные лиганды представляют собой такие вторичные антитела, которые проявляют аффинность связывания с первым антителом.

Дополнительные подходящие реагенты для иммунологического детектирования для применения в настоящих наборах включают двухкомпонентный реагент, который включает вторичное антитело, которое проявляет аффинность связывания с первым антителом, наряду с третьим антителом, которое проявляет аффинность связывания со вторым антителом, при этом третье антитело связано с детектируемой меткой. Выше отмечено, что целый ряд типичных меток известны в данной области техники и все такие метки можно использовать в настоящем изобретении. Эти наборы могут включать конъюгаты антитело-метка либо в полностью конъюгированной форме, в виде промежуточных продуктов, либо в виде отдельных молекул для конъюгирования пользователем набора.

Наборы для визуализации будут предпочтительно включать блокирующее VEGFR2 антитело человека к VEGF, которое уже присоединено к детектируемой *in vivo* метке. Тем не менее, указанная метка и средства присоединения могут поставляться отдельно.

Любой набор может дополнительно включать контрольные агенты, такие как подходящим образом разделенные на аликвоты композиции VEGF, либо меченые, либо немеченные, которые можно применять для получения стандартной кривой для детектирующего анализа. Компоненты наборов могут быть расфасованы либо в водных средах, либо в лиофилизированной форме.

Приспособления для хранения из наборов, как правило, будут включать по меньшей мере одну ампулу, пробирку, колбу, бутылку, шприц или другие средства для хранения, в которые можно поместить антитело или антиген и предпочтительно подходящим образом разделить на аликвоты. Если предусмотрен второй или третий связывающий лиганд или дополнительный компонент, набор также, как правило, будет включать второй, третий или еще один дополнительный контейнер, в который может быть помещен указанный лиганд или компонент. Наборы также могут включать другие диагностические реагенты для применения для диагностики любого одного или более ангиогенных заболеваний. Предпочтительно будет применяться второе диагностическое средство, не основанное на связывании VEGF.

Наборы согласно настоящему изобретению также будут обычно включать средства для размещения антитела и контейнеры с любым другим реагентом, удерживаемые в близком положении, для коммерческой продажи. Такие контейнеры могут включать изготовленные литьем под давлением или выдувным формованием пластиковые контейнеры, в которых хранятся желательные ампулы.

| Таблица 1                            |                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|--------------------------------------|-----------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| SEQ ID NO:                           | Описание                                            | Последовательность                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| <b>Клон EJ173-112-С11 (r84 scFv)</b> |                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 1                                    | Домен VH (нт)                                       | <p>CAGGTGCAGCTGGTGCAATCTGGGGCTGAGGT<br/> GAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCT<br/> GCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGCAGCTAT<br/> GCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACA<br/> AGGGCTTGAGTGGATGGGAGGTTTGTATCCTG<br/> AAGATGGTGAAACAATCTACGCACAGAAGTTC<br/> CAGGGCAGAGTCACCATGACCGAGGACACATC<br/> TACAGACACAGCTACATGGAGCTGAGCAGCC<br/> TGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGT<br/> GCAACAGGACGTTCTATGGTTCGGGGAGTCAT<br/> TATACCTTTTAACGGTATGGACGTCTGGGGCC<br/> AAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA</p> <p>См. Фигуру 1</p> |
| 2                                    | Домен VL (нт)                                       | <p>GACATCCGGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTG<br/> TCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACT<br/> TGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTA<br/> AATTGGTATCAGCAGAAACAGGGAAGGCC<br/> TAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTCAA<br/> AGTGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGA</p>                                                                                                                                                                                                                                               |
| SEQ ID NO:                           | Описание                                            | Последовательность                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|                                      |                                                     | <p>TCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTC<br/> TGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCA<br/> ACAGAGTTACAGTACCCCGCTCACTTTCGGCGG<br/> AGGGACCAAGGTGGAGATCAAA</p> <p>См. Фигуру 1</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| 3                                    | Домен VH (AK)                                       | <p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGGTFSSYAIS<br/> WVRQAPGQGLEWMGGFDPEDGETIYAQKFQGRVT<br/> MTEDTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCATGRSMVR<br/> GVIIPFNGMDVWGQGTITVTVSS</p> <p>См. Фигуру 1</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 4                                    | Домен VL (AK)                                       | <p>DIRMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQ<br/> QKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLT<br/> ISSLPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIK</p> <p>См. Фигуру 1</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 5                                    | Гипервариабель-<br>ный участок CDR1<br>тяжелой цепи | SYAIS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 6                                    | Гипервариабель-<br>ный участок CDR2<br>тяжелой цепи | GFDPEDGETIYAQKFQG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 7                                    | Гипервариабель-<br>ный участок CDR3<br>тяжелой цепи | GRSMVRGVIIPFNGMDV                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 8                                    | Гипервариабель-<br>ный участок CDR1<br>легкой цепи  | RASQSISSYLN                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| 9                                    | Гипервариабель-<br>ный участок CDR2<br>легкой цепи  | AASSLQS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| 10                                   | Гипервариабель-<br>ный участок CDR3                 | QQSYSTPLT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |

| SEQ ID NO:             | Описание              | Последовательность               |
|------------------------|-----------------------|----------------------------------|
|                        | легкой цепи           |                                  |
| 11                     | FR1 тяжелой цепи      | QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGGTFS  |
| 12                     | FR2 тяжелой цепи      | WVRQAPGQGLEWMG                   |
| 13                     | FR3 тяжелой цепи      | RVTMTEDTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCAT |
| 14                     | FR4 тяжелой цепи      | WGQGTITVTVSS                     |
| 15                     | FR1 легкой цепи       | DIRMTQSPSSLSASVGDRVITC           |
| 16                     | FR2 легкой цепи       | WYQQKPGKAPKLLIY                  |
| 17                     | FR3 легкой цепи       | GVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC  |
| 18                     | FR4 легкой цепи       | FGGGTKVEIK                       |
| 19                     | Линкер                | KLSGSASAPKLEEGEFSEARV            |
| 20                     | Целый scFv клон (нт)  | См. Фигуру 1                     |
| 21                     | Целый scFv клон (АК)  | См. Фигуру 1                     |
| Полноразмерный IgG r84 |                       |                                  |
| 22                     | Тяжелая цепь IgG (нт) | См. Пример 6                     |
| 23                     | Легкая цепь IgG (нт)  | См. Пример 6                     |
| 24                     | Тяжелая цепь IgG (АК) | См. Пример 6                     |
| 25                     | Легкая цепь IgG (АК)  | См. Пример 6                     |
| 26                     | Домен VH IgG (нт)     | См. Пример 6                     |
| 27                     | Домен VL IgG (нт)     | См. Пример 6                     |

Следующие примеры включены, чтобы продемонстрировать предпочтительные варианты реализации настоящего изобретения. Для специалистов в данной области техники должно быть очевидно, что методики, описанные в следующих примерах, представляют собой методики, которые авторы настоящего изобретения сочли хорошо функционирующими при реализации настоящего изобретения, и, таким образом, они могут рассматриваться как предпочтительные способы реализации настоящего изобретения. Тем не менее, для специалистов в данной области техники в свете настоящего описания должно быть очевидно, что можно внести множество изменений в конкретные описанные варианты реализации и также получить подобный или аналогичный результат, не отклоняясь от сущности и объема настоящего изобретения.

### Примеры

#### Пример 1. Отбор антитела.

VEGF представляет собой ключевой регулятор физиологического ангиогенеза во время эмбриогенеза, роста скелета и репродуктивной функции. Передача сигналов VEGF посредством взаимодействия с тирозинкиназным рецептором VEGFR2 также важна в патологическом ангиогенезе, включая такой, который связан с опухолевым ростом. Учитывая необходимость в терапевтических специфичных антителах человека, которые блокируют ангиогенез, были идентифицированы антитела человека, которые реагируют с эпитопом на VEGF, который специфично и, по существу, блокирует его взаимодействие с VEGFR2 (KDR/Flk-1), по существу, не блокирует его взаимодействие с VEGFR1 (Flt-1).

Одноцепочечные формы антител клонировали в плазмиду pHOG21 (Kipriyanov и др., 1996; 1997) (фиг. 9А и 9В) (по сайтам рестрикции NcoI и Not I), которая включает эпитопы с-тус и 6× гистидиновой метки. Клетки E. coli, XL-1 blue, трансформировали, отбирали на ампициллиновых чашках и экспрессировали scFv при индукции IPTG. Очищенные scFv тестировали с помощью ELISA на избирательную биологическую активность против VEGF. Избирательную биологическую активность дополнительно подтверждали с помощью конкурентных тестов ELISA, применяя антитело мыши 2C3, которое специфично блокирует взаимодействие VEGF и VEGFR2, но не взаимодействие VEGF и VEGFR1 (Brekken и др., 1998; 2000). Также с помощью Bioscore показали связывание scFv антител с иммобилизованным VEGF-A. Также оценивали связывание с VEGF мыши, а также с VEGF человека.

#### А. Секвенирование.

Показаны последовательности нуклеотидов тяжелых и легких цепей одного предпочтительного продуцирующего антитело клона. Антитело обозначено как EJ173/112-C11 (r84/PGN311), и было получено как в scFv-форме (пример 1 и фиг. 1), так и в виде полноразмерного IgG (пример 6). Последовательность нуклеотидов и последовательность аминокислот легких и тяжелых цепей одноцепочечной формы EJ173/112-C11 (r84/PGN311) представлены на фиг. 1 и в табл. 1. Последовательности нуклеотидов и ами-

ноxisлот легких и тяжелых цепей формы полноразмерного IgG r84/PGN311 представлены в примере 6. Гипервариабельный участок и каркасные области легких и тяжелых цепей EJ173/112-C11 (r84/PGN311) представлены в табл. 1.

Пример 2. EJ173/112-C11 (r84/PGN311) связывается с VEGF с высокой аффинностью.

Для подтверждения специфичности антитела с помощью ELISA тестировали связывание scFv-формы EJ173/112-C11 (r84/PGN311) с нанесенным на планшет VEGF-A человека (получен от Dr. Rolf A. Brekken, UT Southwestern Medical Center, Даллас, Техас). Вкратце, 2 мкг/мл VEGF-A наносили на полистироловый планшет. Далее 20 мкг/мл очищенных EJ173/112-C11 (r84/PGN311) scFv добавляли в первую лунку и титровали при 3-кратном разведении. Связанный scFv детектировали с помощью моноклонального антитела мыши против метки с-мус (Invitrogen) и конъюгированного с HRP вторичного антитела кролика против антител мыши.

Результаты ELISA показали, что EJ173/112-C11 (r84/PGN311) scFv (фиг. 2) связан с VEGF и, что важно, имеет повышенный сигнал связывания и, следовательно, повышенную аффинность по сравнению с материнским клоном. Антитело мыши B9 применяли в качестве положительного контроля, и оно представляло собой scFv антитело мыши против VEGF-A человека (получено от Dr. Philip E. Thorpe, UT Southwestern Medical Center, Даллас, Техас).

EJ173/112-C11 (r84/PGN311) проявило дополнительные полезные свойства над материнским клоном. Было показано, что EJ173/112-C11 (r84/PGN311) имеет более высокую стабильность в сыворотке и пониженную склонность к образованию агрегатов в scFv-формате по сравнению с материнским клоном (результаты не представлены).

Перетасовка вариабельной области легкой цепи EJ173/112-C11 (r84/PGN311) с семью различными тяжелыми цепями из других антител против VEGF.

Вариабельную область легкой цепи EJ173/112-C11 (r84/PGN311) комбинировали с семью различными вариабельными областями тяжелых цепей, полученными из других клонов антител к VEGF, отличных от r84/PGN311, для подтверждения важности вариабельной области легкой цепи r84/PGN311 в сохранении свойства связывания с VEGF. Полученные клоны экспрессировали и очищали с помощью гистициновой метки на колонках NiNTA. После очистки определяли концентрацию и проводили ELISA против нанесенных на планшет VEGF-A человека. Добавляли 20 мкг/мл очищенных scFv, и связанный scFv детектировали с помощью моноклонального антитела мыши против метки с-мус (Invitrogen) и HRP-конъюгированного вторичного антитела кролика против антител мыши.

Было показано, что три из семи комбинаций вариабельной области легкой цепи EJ173/112-C11 (r84/PGN311) с вариабельными областями тяжелых цепей, полученными из других клонов антител к VEGF, проявили значительное связывание с VEGF в этом ELISA. Это очень разумное количественное соотношение, которое демонстрирует, что вариабельная область легкой цепи r84/PGN311 важна для сохранения связывания с VEGF, а также что можно легко идентифицировать другие вариабельные области тяжелой цепи, которые можно объединить с этой вариабельной областью легкой цепи для получения антител, которые связываются с VEGF.

Пример 3. EJ173/112-C11 (r84/PGN311) конкурирует с 2C3 мыши.

Чтобы дополнительно продемонстрировать специфичность указанного антитела, связывание EJ173/112-C11 (r84/PGN311) scFv с нанесенным на планшет VEGF-A тестировали с помощью ELISA в присутствии двух концентраций 2C3. Вкратце, 2 мкг/мл VEGF-A наносили на полистироловый планшет. Далее 1 мкг/мл очищенных EJ173/112-C11 (r84/PGN311) scFv, материнского клона или B9 scFv мыши (фиг. 3) добавляли в шесть параллельных лунок, две из которых включали 0,1 мкг и две включали 1 мкг 2C3 IgG мыши, что давало конечную концентрацию 2C3 IgG, равную 1 и 10 мкг/мл соответственно. Оставшийся связанный scFv детектировали с помощью HRP-конъюгированного моноклонального антитела мыши против метки с-мус (Invitrogen).

Связывание EJ173/112-C11 (r84/PGN311) scFv с VEGF снижалось вследствие конкурентного связывания с возрастающими концентрациями 2C3 IgG. Эти результаты, следовательно, показали, что EJ173/112-C11 (r84/PGN311) эффективно конкурирует с антителом 2C3 за связывание с VEGF, указывая на то, что EJ173/112-C11 (r84/PGN311) связывается, по существу, с тем же эпитопом, что и 2C3.

Пример 4. EJ173/112-C11 (r84/PGN311) связывается с VEGF человека и мыши.

Определяли связывание EJ173/112-C11 (r84/PGN311) scFv с VEGF человека и мыши. 1 мкг/мл VEGF мыши (R&D systems 493-MV-005/CF, свободное от носителя VEGF<sub>164</sub> мыши) и VEGF человека наносили на полистироловые иммунопланшеты. Добавляли 10 мкг/мл очищенных scFv и детектировали с помощью моноклонального антитела мыши против метки с-мус (Invitrogen) и HRP-конъюгированного вторичного антитела кролика против антител мыши.

Результаты показали, что EJ173/112-C11 (r84/PGN311) scFv (фиг. 4) связывается как с VEGF мыши, так и с VEGF человека.

Вдобавок, для оценки аффинности связывания scFv-форм r84 и его материнского клона с VEGF мыши применяли Biacore T100. С этой целью 1000 RU рекомбинантного VEGF<sub>164</sub> мыши (493-MV/CF, R&D systems) иммобилизовали на чипе CM5 (Biacore) и серию разведений (100 нМ и 2-кратное разведение) мономерного scFv пропускали через него при скорости потока 50 мкл/мин. Аффинность связыва-

ния, выраженную в виде  $K_D$ , рассчитывали с помощью модели подбора кривой 1:1, применяя программное обеспечение от прибора Biacore T100. Значения  $K_D$  рассчитали равными  $1,0 \times 10^{-8}$  М для EJ173/112-C11 (r84/PGN311) и  $4,0 \times 10^{-8}$  М для материнского клона. r84/PGN311, таким образом, проявило более высокую аффинность связывания с VEGF мыши, чем материнский клон.

Эти результаты указывают на то, что это отобранное антитело (r84/PGN311) подходит для применения как в доклинических испытаниях на мышах, так и для применения у людей.

Ниже в примере 6 подробно описано, что были получены полностью человеческие и мышинные химерные IgG-формы антитела r84. Исследования связывания с помощью ELISA подтвердили, что каждое из этих антител r84 в IgG-формате также связывается как с VEGF мыши, так и с VEGF человека (фиг. 19). Эти результаты показывают другое преимущество отобранного полностью человеческого антитела r84 над антителом 2C3, так как 2C3 не проявляет значительного связывания с VEGF мыши.

Отсутствие значительного связывания 2C3 с VEGF мыши было продемонстрировано в непрямом анализе ELISA. В этом анализе оценивали взаимодействие 2C3 с VEGF человека и мыши, а также с другими членами семейства VEGF.

Непрямые тесты ELISA выполняли, по существу, как описано у Brekken и др., Cancer Research 1998 и 2000. Вкратце, различные факторы роста, т.е. VEGF-A человека (VEGF), VEGF мыши, PlGF, VEGF-B, VEGF-C и VEGF-D, приобрели у R&D systems и покрывали ими лунки планшета ELISA (50 мкл/лунку при 0,5 г/мл в сенсibiliзирующем буфере в течение ночи при 4°C). Лунки блокировали 5% САН (кислотный гидролизат казеина, Sigma, приготовленный на ФБР) в течение 1 ч при 37°C и инкубировали в трех повторностях с антителом 2C3 против VEGF при концентрации 1,0 мкг/мл в течение 2 ч при комнатной температуре. Связывание детектировали с помощью конъюгированного с пероксидазой вторичного антитела (либо IgG против антител человека, либо IgG против антител мыши, разбавленного 1:5000). Лунки проявляли с помощью TMB (колориметрический субстрат для HRP) и считывали коэффициент поглощения при 450 нм. Средние значения коэффициента поглощения были такие, как описано далее: VEGF-A человека (3.07), VEGF мыши (0.09), которое было таким же, что и фоновый сигнал, PlGF (0.1), VEGF-B (0.09), VEGF-C (0.09) и VEGF-D (0.12).

Эти результаты демонстрируют, что 2C3 связывается с VEGF-A человека, но не реагирует с VEGF-A, PlGF, VEGF-B, VEGF-C или VEGF-D мыши. Этот анализ повторяли несколько раз, получая аналогичные результаты.

Дополнительные свидетельства того, что IgG-форма антитела r84/PGN311 связывается с VEGF мыши, тогда как 2C3 и Авастин не связываются с VEGF мыши, были получены в экспериментах, в которых уровни VEGF мыши в сыворотке оценивали у животных, которых лечили r84, 2C3 и Авастином.

Сыворотки из животных-опухоленосителей, которых лечили контрольным IgG (Синагис), Авастином, 2C3 или r84, собирали и анализировали с помощью ELISA на уровень VEGF мыши, применяя набор от R&D systems. Вдобавок, некоторые образцы сывороток из мышей, которым вводили r84, иммунологически обедняли всеми антителами путем инкубирования с гранулами, содержащими белок G.

Результаты представлены на фиг. 24. Уровень VEGF мыши в сыворотке был очень схож с таковым у животных, которых лечили контрольным антителом, Авастином и 2C3. Тем не менее, уровень VEGF мыши в сыворотке был значительно более высоким у животных, которых лечили r84. Отличие уровня VEGF мыши, наблюдаемого у животных, которых лечили контрольным антителом, Авастином и 2C3, от такового, наблюдаемого у животных, которых лечили r84, свидетельствует о том, что контрольное антитело, Авастин и 2C3 не связываются с VEGF мыши, тогда как антитело r84 IgG связывается с VEGF мыши.

Столбик "r84" на фиг. 24 показывает суммарное количество VEGF в сыворотках (т.е. свободный (биологически активный) VEGF и VEGF в комплексе с r84). Полагают, что количество свободного (биологически активного) VEGF является важным параметром, который следует измерять, когда антитела к VEGF применяют терапевтически, а именно для оценки эффективности связывания антитела с VEGF (Loupakis и др., 2007). Столбик "r84 supе" показывает количество свободного VEGF в сыворотках после того, как иммуноглобулин r84 и r84, связанное с VEGF мыши, удаляли путем инкубирования с белком G. На фиг. 24, таким образом, показано, что уровни свободного VEGF мыши в сыворотке животных, которых лечили r84, находятся на пороговых уровнях. Таким образом, результаты на фиг. 24 не только демонстрируют, что r84 хорошо связывается с VEGF мыши, но также демонстрируют, что r84 очень эффективно обедняет уровни свободного (биологически активного) VEGF в сыворотке, что является важным свойством для применения в терапии.

Результаты, обсуждаемые в примере 11Е ниже, в котором использовали сингенную модель опухоли молочной железы на мышах и продемонстрировали, что химерное r84 мыши значительно улучшает выживаемость мышей-опухоленосителей, представляют собой дополнительное подтверждение того, что r84 связывает и блокирует активность VEGF мыши *in vivo*.

Описанные выше результаты показали, что полностью человеческое антитело r84/PGN311 связывается с VEGF как мыши, так и человека, тогда как антитела 2C3 и Авастин не связываются с VEGF мыши. Это является важным преимуществом в аспекте возможности применения r84 для оценки, например,

противоопухолевой активности как в сингенных моделях на мышах, т.е. в которых опухолевые клетки мыши вводят мышам, так и в ксенотрансплантатных моделях, т.е. в которых опухолевые клетки человека вводят мышам.

Вдобавок, способность связывать VEGF как мыши, так и человека, проявляемая r84/PGN311, но не антителами, такими как 2C3 и Авастин, означает, что результаты, проявляемые r84 в ксенотрансплантатных моделях на мышах, более вероятно представляют активность r84 у людей, т.е. результаты, полученные для r84 в доклинических моделях на мышах, вероятно, будут хорошей моделью результатов, которые будут проявляться при введении антитела пациентам. Причиной этого может быть то, что антитела, которые могут связываться только с VEGF человека (например, Авастин и 2C3), будут связываться с VEGF, продуцируемым опухолевыми клетками человека, но не смогут связываться с эндогенным VEGF мыши. Это ситуация, разумеется, не будет похожа на таковую у человека, у которого будут присутствовать VEGF, продуцируемый опухолью, и эндогенный VEGF.

Потенциальным недостатком такой ситуации будет то, что антитело, которое связывается с VEGF человека, но не с VEGF мыши, может хорошо действовать в ксенотрансплантатной модели на мышах, но может не проявлять аналогичного действия в системе человека, где присутствует гораздо больше VEGF. Другими словами, противоопухолевый эффект, наблюдаемый в ксенотрансплантатной системе на мышах с антителом, которое может связываться только с VEGF человека, может выглядеть лучше, чем клиническая реальность. В противоположность этому, при работе с антителом, которое может связываться с VEGF как человека, так и мыши, оно будет связываться со всеми формами VEGF, присутствующими в модельной системе на мышах, и вероятно будет представлять ситуацию, более типичную для таковой при введении указанного антитела людям. Это является важным преимуществом, которое демонстрируют антитела согласно настоящему изобретению.

Пример 5. Аффинность связывания EJ173/112-C11 (r84/PGN311).

Для оценки аффинности связывания различных антител применяли Biotec. Различные scFv-антитела при концентрации 1 мкМ (микромольной) пропускали через чип CM5 с иммобилизованным VEGF (сопряжен с амином). Кривые связывания представлены на фиг. 5, на которой видно, что scFv-форма r84/PGN311 проявляет заметно более высокую аффинность связывания, чем одноцепочечная форма материнского клона (m).

Вдобавок, проводили исходные исследования для вычисления аффинности связывания r84 IgG с VEGF, в которых различные концентрации r84 IgG пропускали через иммобилизованный VEGF-A. В этом отношении аффинность связывания, выраженную в виде  $K_D$ , рассчитывали, применяя модель связывания 1:1, в программном обеспечении Biotec 3000 Evaluation. Значение  $K_D$ , полученное для r84 IgG в этом исходном исследовании, рассчитали как  $6,7 \times 10^{-9}$  М.

Последующие исследования аффинности с применением Biotec позволили получить результаты аффинностей, представленные в табл. 2. Для этих экспериментов определяли аффинность IgG-форматов EJ173/112-C11 (r84/PGN311) и 2C3 с помощью иммобилизования 100 RU VEGF-A человека на чипе CM5 (Biotec). Серии разведений (100 нМ и 2-кратное разведение) каждого IgG пропускали через покрывную VEGF проточную кювету при скорости потока 50 мкл/мин. Фоновый сигнал проточной кюветы, покрывной БСА, вычитали из кривых связывания. Аффинность связывания, выраженную в виде  $K_D$ , рассчитывали с помощью модели подбора кривой 1:1, применяя программное обеспечение от прибора Biotec T100.

Таблица 2

| $K_D$ (М) | Нанесенный VEGF<br>(100 RU), 25 °C | Нанесенный VEGF<br>(100 RU), 37 °C |
|-----------|------------------------------------|------------------------------------|
| 2C3       | $1.24 \times 10^{-8}$              | $3.13 \times 10^{-7}$              |
| r84       | $3.21 \times 10^{-9}$              | $5.22 \times 10^{-9}$              |

Результаты показывают, что r84 связывается с VEGF с лучшей аффинностью, чем 2C3 при обеих температурах 25 и 37°C. Логично ожидать, что это различие будет обеспечивать лучшие свойства r84 по сравнению с 2C3 во многих клинических ситуациях, связанных с лечением ангиогенных заболеваний, включая рак. Результаты при 37°C особенно интересны, так как этой температуре антитела будут подвергаться при использовании их *in vivo*. Также следует отметить, что в этом эксперименте Авастин проявил приблизительно 10-кратную потерю аффинности при сравнении связывания при 25 и 37°C, тогда как r84 оказалось менее чувствительным к температуре (снижение  $K_D$  даже не 2-кратное).

Пример 6. Превращение scFv-формы r84/PGN311 в IgG-формы.

Полностью человеческую IgG-форму r84 изначально сконструировали, как описано далее. Брали последовательности VH и VL цепей scFv-формы антитела r84/PGN311, представленные на фиг. 1, и вставляли их в векторы экспрессии Lonza pCon IgG1a и каппа, а затем комбинировали, чтобы создать один вектор, включающий целый ген антитела r84. Чтобы получить полноразмерное антитело IgG, указанным вектором затем трансфектировали клетки CHO K1SV.

Как только удалось оптимизировать условия роста, производительность указанной линии клеток



достигала приблизительно 5 мг антитела на 1 л культуры клеток. Хотя этот способ экспрессии был эффективным, не все из очищенных антител были стабильны. После оптимизации буфера агрегация антитела была снижена, позволяя получить 89,5% мономера и 10,5% агрегата.

Используемые оптимизированные условия роста представляли собой Invitrogen CD-CHO при 40 мкМ MSX, pH 6.8-7.0, 5% CO<sub>2</sub>, 37°C. Используемый оптимизированный буфер представлял собой 10 мМ фосфат натрия, 25 мМ ацетат натрия, 50 мМ глицин при pH 5.5.

Чтобы дополнительно увеличить стабильность r84/PGN311, проанализировали последовательность аминокислот. Сравнение последовательности r84 с типичными последовательностями антител человека указывало на то, что последняя аминокислота VL цепи r84 отсутствует в используемой конструкции (т.е. отсутствует последний остаток лизина, K). Этот остаток был введен заново. Последовательность ДНК также изменили (не изменяя транслируемой последовательности аминокислот), чтобы она была более "совместимой" с клетками CHO. В результате получили новую последовательность ДНК и последовательность аминокислот, в которой VL цепь оканчивалась лизином. Последовательности нуклеотидов и аминокислот новых полных тяжелой и легкой цепей антитела IgG представлены ниже.

Тяжелая цепь r84/PGN311 IgG (последовательность нуклеиновых кислот)

CAGGTACAGCTTGTGCAGTCCGGAGCCGAGGTGAAGAAACCCGGAGCATCAGTGAA  
GGTTAGCTGCAAGGCATCTGGTGGGACATTTTCCTCCTATGCCATCTCCTGGGTTTCGG  
CAGGCTCCCGGACAGGGCCTGGAGTGGATGGGGGGGTTTCGATCCCGAAGACGGAGA  
GACCATTACGCACAGAAGTTTCAGGGTCGCGTGACCATGACCGAGGATACCTTCTAC  
CGACACAGCATATATGGAGCTCAGTAGCTTGCGCTCCGAGGACACGGCTGTATATTA  
CTGTGCCACTGGACGGAGCATGGTGC GCGGGGTAATCATCCCTTTCAACGGGATGGA  
TGTATGGGGCCAAGGGACACCGTGACAGTCAAGTCTGCCTCCACCAAGGGCCCATC  
GGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGG  
CTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGC  
CCTGACCAGCGCGTGACACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCC  
CTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGC  
AACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGGTGAGAGGCC  
AGCACAGGGAGGGAGGGTGTCTGCTGGAAGCCAGGCTCAGCGCTCCTGCCTGGACG  
CATCCCGGCTATGCAGCCCCAGTCCAGGGCAGCAAGGCAGGCCCCGTCTGCCTCTTC  
ACCCGGAGGCCTCTGCCCCGCCCCACTCATGCTCAGGGAGAGGGTCTTCTGGCTTTTTC  
CCCAGGCTCTGGGCAGGCACAGGCTAGGTGCCCTAACCCAGGCCCTGCACACAAA  
GGGGCAGGTGCTGGGCTCAGACCTGCCAAGAGCCATATCCGGGAGGACCCTGCCCC  
TGACCTAAGCCCAACCCAAAGGCCAACTCTCCACTCCCTCAGCTCGGACACCTTCT  
CTCCTCCCAGATTCCAGTAACTCCCAATCTTCTCTCTCTGCAGAGCCCAATCTTGTGAC  
AAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCAGGTAAGCCAGCCAGGCCTCGCCCTCCAGC  
TCAAGGCGGGACAGGTGCCCTAGAGTAGCCTGCATCCAGGGACAGGCCCCAGCCGG  
GTGCTGACACGTCCACCTCCATCTCTTCTCAGCACCTGAACCTCCTGGGGGGACCGTC  
AGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGA  
GGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACT  
GGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAG  
TACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCTCCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTG  
AATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGA  
GAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGTGGGACCCGTGGGGTGGCAGGGCCACATGGAC  
AGAGGCCGGCTCGGCCCCACCTCTGCCCTGAGAGTGACCGCTGTACCAACCTCTGTC  
CCTACAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGA  
GCTGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGA  
CATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGACAACCTACAAGACCACGC  
CTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAA  
GAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCA  
CAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAG

(SEQ ID NO:22)

Тяжелая цепь r84/PGN311 IgG (последовательность аминокислот)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGFDPEDGET  
IYAQKFQGRVTMTEDTSTDYAMELSSLRSEDTAVYYCATGRSMVRGVIIPIFNGMDVW  
GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV  
HTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP

PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN  
AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE  
PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF  
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO:24)

Легкая цепь r84/PGN311 IgG (последовательность нуклеиновых кислот)

GACATTCGGATGACTCAGTCTCCCTCCTCTTTGAGCGCTTCTGTGGGCGATAGGGTTA  
CTATCACTTGTGCGAGCCTCTCAATCCATCAGCTCCTACTTGAAGTGGTACCAGCAGAA  
ACCCGGGAAAGCACCCAAGCTGCTTATTTACGCCGCCTCCTCCCTGCAATCCGGAGT  
GCCCTCCCGGTTTCAGCGGCTCCGGCTCTGGAACAGACTTTACCCTGACCATTTCTTCT  
TTGCAGCCTGAGGATTTTGCTACTTACTACTGTGTCAGCAGAGTTACTCCACCCCTTGA  
CATTCCGGTGGTGGAAACGAAAGTAGAAATTAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCT  
TCATCTTCCC GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCT  
GCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCC  
TCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACC  
TACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGT  
CTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAA  
CAGGGGAGAGTGTTAG

(SEQ ID NO:23)

Легкая цепь r84/PGN311 IgG (последовательность аминокислот)

DIRMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR  
FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE  
QLKSGTASVVCLLNFPYREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLS  
KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(SEQ ID NO:25)

Новые последовательности ДНК r84/PGN311, представленные выше, были вставлены в векторы экспрессии Lonza pCon IgG1a и каппа, а затем объединены, чтобы создать один вектор, включающий целую последовательность антитела r84/PGN311. Указанным вектором затем трансфецировали клетки CHO K1SV. Производство антитела повысили до более чем 350 мг на 1 л после небольшой оптимизации культуры клеток. Еще более важно, что антитело было гораздо более стабильно, при этом количество мономера было свыше 99%.

Последовательности нуклеиновых кислот вариативной тяжелой и вариативной легкой цепей IgG-формы r84/PGN311 также представлены ниже.

VH цепь r84/PGN311 IgG (последовательность нуклеиновых кислот)

CAGGTACAGCTTGTGTCAGTCCGGAGCCGAGGTGAAGAAACCCGGAGCATCAGTGAA  
GGTTAGCTGCAAGGCATCTGGTGGGACATTTTCCTCCTATGCCATCTCCTGGGTTCCG  
CAGGCTCCCGGACAGGGCCTGGAGTGGATGGGGGGGTTTCGATCCCGAAGACGGAGA  
GACCATTTACGCACAGAAGTTTCAGGGTTCGCTGACCATGACCGAGGATACTTCTAC  
CGACACAGCATATATGGAGCTCAGTAGCTTGCCTCCGAGGACACGGCTGTATATTA  
CTGTGCCACTGGACGGAGCATGGTGC GCGGGGTAATCATCCCTTTCAACGGGATGGA  
TGTATGGGGCCAAGGGACCAACCGTGACAGTCAGCTCT

(SEQ ID NO:26)

VL цепь r84/PGN311 IgG (последовательность нуклеиновых кислот)

GACATTCGGATGACTCAGTCTCCCTCCTCTTTGAGCGCTTCTGTGGGCGATAGGGTTA  
CTATCACTTGTGCGAGCCTCTCAATCCATCAGCTCCTACTTGAAGTGGTACCAGCAGAA  
ACCCGGGAAAGCACCCAAGCTGCTTATTTACGCCGCCTCCTCCCTGCAATCCGGAGT  
GCCCTCCCGGTTTCAGCGGCTCCGGCTCTGGAACAGACTTTACCCTGACCATTTCTTCT  
TTGCAGCCTGAGGATTTTGCTACTTACTACTGTGTCAGCAGAGTTACTCCACCCCTTGA  
CATTCCGGTGGTGGAAACGAAAGTAGAAATTAAG

(SEQ ID NO:27)

Мышиный химерный вариант антитела r84 также был сконструирован. Это осуществляли, чтобы присоединить полностью человеческую вариативную область к константной области мыши, обеспечивая антитело мыши для применения в некоторых доклинических испытаниях на мышах. Получение химерного антитела мыши осуществляли, как описано выше для полностью человеческих IgG, но присоединяя последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую полностью человеческую вариативную

область, к последовательности нуклеиновых кислот, кодирующей константную область мыши.

Последовательности нуклеотидов и аминокислот новых полных тяжелой и легкой цепей химерного IgG антитела мыши представлены ниже.

Химерная тяжелая цепь R84/PGN 311 (последовательность нуклеиновых кислот)

CAGGTGCAGCTGGTGCAATCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAA  
GGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGCG  
ACAGGCCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGTTTTGATCCTGAAGATGGTG  
AAACAATCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCGAGGACACATCT  
ACAGACACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTA  
TACTGTGCAACAGGACGTTCTATGGTTCGGGGAGTCATTATACCTTTTAACGGTATG  
GACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCACGCGCCGATGCTGCACCG  
ACTGTCTATCCACTGGCCCCCTGTGTGTGGAGATACAACCTGGCTCCTCGGTGACTCTAG  
GATGCCTGGTCAAGGGTTATTTCCCTGAGCCAGTGACCTTGACCTGGAACCTCTGGAT  
CCCTGTCCAGTGGTGTGCACACCTTCCAGCTGTCTGCAGTCTGACCTCTACACCCT  
CAGCAGCTCAGTGACTGTAACCTCGAGCACCTGGCCCAGCCAGTCCATCACCTGCAA  
TGTGGCCCACCCGGCAAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAGAGCCCAGAGGGCCCCA  
CAATCAAGCCCTGTCTCCATGCAATGCCCAGCACCTAACCTCTTGGGTGGACCAT  
CCGTCTTCATCTTCCCTCCAAAGATCAAGGATGTAATCATGATCTCCCTGAGCCCCAT  
AGTCACATGTGTGGTGGTGGATGTGAGCGAGGATGACCCAGATGTCCAGATCAGCTG  
GTTTGTGAACAACGTGGAAGTACACACAGCTCAGACACAAACCCATAGAGAGGATT  
ACAACAGTACTCTCCGGGTGGTCAAGTGCCTCCCCATCCAGCACCAGGACTGGATGA  
GTGGCAAGGAGTTCAAATGCAAGGTCAACAACAAGACCTCCCAGCGCCCATCGAG  
AGAACCATCTCAAAACCCAAAGGGTCAAGTAAAGAGCTCCACAGGTATATGTCTTGCCT  
CCACCAGAAGAAGAGATGACTAAGAAACAGGTCACTCTGACCTGCATGGTCAACAGA  
CTTCATGCCTGAAGACATTTACGTGGAGTGGACCAACAACGGGAAAACAGAGCTAA  
ACTACAAGAACACTGAACCAGTCTTGGACTCTGATGGTTCTTACTTCATGTACAGCA  
AGCTGAGAGTGGAAAAGAAGAACTGGGTGGAAAGAAATAGCTACTCCTGTTCAAGT  
GTCCACGAGGGTCTGCACAATCACACACGACTAAGAGCTTCTCCCGGACTCCGGGT  
AAATGA

(SEQ ID NO: 31)

Химерная тяжелая цепь R84/PGN 311 (последовательность аминокислот)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGFDPEDGET  
IYAQKFQGRVTMTEDTSTDYAMELSSLRSEDTAVYYCATGRSMVRGVIIIPFNGMDVW  
GQGTITVTVSSRADAAPTVYPLAPVCGDITGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWSGSLSSG  
VHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQITCNVAHPASSTKVDKKEPRGPTIKPCPPCK  
CPAPNLLGGPSVFIFFPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQT  
QTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSKKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQV  
YVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFM  
YSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK

(SEQ ID NO: 32)

Химерная легкая цепь R84/PGN 311 (последовательность нуклеиновых кислот)

GATATCAGGATGACGCAGAGTCCAAGCTCTCTGTCTGCCTCTGTGGGGGACAGGGTG  
ACTATTACTTGTGGGCATCACAGAGTATCTCCAGCTACCTTAATTGGTACCAGCAA  
AAGCCCGGCAAAGCCCCCAAATTGCTGATTTACGCAGCCAGCTCCCTTCAGTCTGGC  
GTCCCTAGCCGCTTCTCCGGGAGCGGATCAGGCACAGACTTTACGTTGACAATCAGT  
TCTCTGCAGCCGGAGGATTTTGCCACTTACTACTGTCAACAGAGCTACAGTACGCCT  
CTCACGTTTGGCGGTGGGACAAAGGTGGAAATCAAACGGGCTGATGCTGCACCGAC  
TGTGTCCATCTTCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGAGGTGCCTCAGTCGTG  
TGCTTCTTGAACAACCTTCTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGGAAGATTGATGGC  
AGTGAACGACAAAATGGCGTCCTGAACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAGACAG  
CACCTACAGCATGAGCAGCACCTCACGTTGACCAAGGACGAGTATGAACGACATA  
ACAGCTATACCTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCCATTTGCAAGAGCT  
TCAACAGGAATGAGTGT

(SEQ ID NO: 33)

Химерная легкая цепь R84/PGN 311 (последовательность аминокислот)

DIRMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR  
 FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIKRADAAPTVSIFPPSSE  
 QLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSEKQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTLT  
 KDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC

(SEQ ID NO: 34)

Пример 7. EJ173/112-C11 (r84/PGN311) ингибирует опосредованные VEGFR2 явления.

А. r84/PGN311 ингибирует клеточную передачу сигналов посредством VEGFR2.

Клеточные тесты применяли для подтверждения действия на клетки отобранного антитела. VEGF стимулирует внутриклеточную передачу сигналов через MAPK-киназный путь, который также включает активацию (посредством фосфорилирования) двух белков, названных MAPK1 и MAPK2, 44 и 42 кДа соответственно. Другое название этих белков - Erk1 и Erk2. Антитела, которые ингибируют взаимодействие VEGF с VEGFR2, также могут ингибировать активацию Erk1/2.

Линии клеток bEnd.3 или PAE/KDR (полученные от Dr. Philip Thorpe из UT-Southwestern Medical Center, Даллас, Техас, и Dr. Johannes Waltenberger, Ulm University Medical Center, Ульм, Германия соответственно) экспрессируют VEGFR2 на своей поверхности, что позволяет их стимулировать с помощью VEGF. Указанные линии клеток лишали на 48 ч сыворотки и факторов роста, а затем стимулировали добавлением 10 (V10) и 50 нг/мл (V50) VEGF165 в присутствии или отсутствии кандидатного антитела в IgG-формате при концентрации 4 мкг/мл. Не стимулированные клетки служили отрицательным контролем (NS). После этой стимуляции клетки промывали ледяным ФБР, включающим различные ингибиторы фосфатаз, перед тем как их лизировали. Центрифугированный клеточный экстракт разгоняли в полиакриламидном геле и разделенные белки затем подвергали блоттингу на нитроцеллюлозную мембрану. Блот инкубировали с антителом против фосфорилированного Erk1/2, чтобы отследить ингибирование фосфорилирования Erk1/2 (фиг. 6). Суммарное количество Erk1/2 также детектировали как внутренний контроль его клеточных уровней. IgG клон r84/PGN311 ингибировал фосфорилирование Erk1/2.

VEGF также стимулирует внутриклеточную передачу сигналов через фосфолипазу C $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ), что включает активацию (посредством фосфорилирования) белка размером 155 кДа. Антитела, которые ингибируют взаимодействие VEGF с VEGFR2, могут также ингибировать активацию PLC- $\gamma$ .

Линии клеток микрососудистого эндотелия кожи человека (HDMEC, Lonza, номер в каталоге CC2810) экспрессируют VEGFR2 на своей поверхности, что позволяет им стимулироваться VEGF. HDMEC наносили на планшеты в количестве 250,000 клеток на лунку, применяя 6-луночные планшеты. Клеткам позволяли прикрепиться к планшетам в течение ночи в среде ECM (среда для эндотелиальных клеток) с 5% эмбриональной бычьей сыворотки (FBS). Клетки затем лишали сыворотки на 24 ч и стимулировали добавлением 50 нг/мл VEGF165 (+VEGF) в присутствии указанных антител, Авастина (бевацизумаб, Presta и др., 1997), r84/PGN311, 2C3 (все в IgG-формате) или контрольного IgG антитела (Синагис (пализумаб), антитело человека против PCB, MedImmune). IgG применяли в концентрации 90 мкг/мл. Не стимулированные клетки служили отрицательным контролем (NT). Авастин и r84/PGN311 также добавляли к клеткам в отсутствие VEGF.

После этой стимуляции клетки промывали ледяным ФБР, включающим различные ингибиторы фосфатаз, перед тем, как их лизировали. Центрифугированный клеточный экстракт разгоняли в полиакриламидном геле и разделенные белки затем переносили на нитроцеллюлозную мембрану. Блоты инкубировали с антителом к фосфорилированному Erk1/2 (фиг. 16A, pERK1/2) и антителом к фосфорилированному PLC- $\gamma$  (фиг. 16A, pPLC- $\gamma$ ), чтобы отследить ингибирование фосфорилирования. Суммарные уровни Erk1/2 (фиг. 16A, ERK1/2) и PLC- $\gamma$  (фиг. 16A, PLC- $\gamma$ ) также детектировали в качестве внутреннего контроля клеточных уровней. Экспрессию VEGFR2 на HDMEC детектировали антителом к VEGFR2 (фиг. 16A). На фиг. 16A показано, что IgG антитело r84/PGN311 ингибировало фосфорилирование обоих Erk1/2 и PLC- $\gamma$ .

Применяя методику, аналогичную описанной выше, клетки PAE Fit1, экспрессирующие VEGFR1, обрабатывали и лишали питательной среды аналогичным образом перед тем, как оставить их необработанными или стимулировать добавлением 50 нг/мл VEGF165 в присутствии или отсутствии указанных антител, Авастина или r84/PGN311 (в IgG-формате). Получали блоты и инкубировали с антителом к фосфорилированному VEGFR1 (фиг. 16B, "фосфорилированный VEGFR1"). Суммарный VEGFR1 (фиг. 16B, "суммарный VEGFR1") также детектировали в качестве внутреннего контроля его уровней в клетках. Результаты, представленные на фиг. 16B, показали, что r84/PGN311 не ингибировало фосфорилирование VEGFR1, тогда как положительный контроль, Авастин, ингибировало фосфорилирование VEGFR1. Вместе фиг. 16A и 16B подтверждают, что r84/PGN311 избирательно блокирует путь передачи сигнала через VEGFR2.

В. r84/PGN311 блокирует индуцированную VEGF миграцию экспрессирующих VEGFR2 клеток.

Как и ожидалось, также подтвердили, что r84/PGN311 способно эффективно ингибировать индуцированную VEGF миграцию экспрессирующих VEGFR2 эндотелиальных клеток. Примеры такой активности представлены на фиг. 20A для HDMEC и на фиг. 20B для клеток PAE, экспрессирующих KDR.

Стоит отметить, что в каждом из этих тестов г84 значительно ингибировало индуцированную VEGF миграцию экспрессирующих VEGFR2 клеток и действовало, по меньшей мере, так же, как Авастин.

Сравнительные исследования с применением экспрессирующих VEGFR1 клеток PAE Flt1 показали, что г84 не ингибировало индуцированную VEGF миграцию экспрессирующих VEGFR1 клеток (фиг. 21). В противоположность Авастин значительно ингибировал индуцированную VEGF миграцию экспрессирующих VEGFR1 клеток (фиг. 21).

Пример 8. EJ173/112-C11 (г84/PGN311) связывается с VEGF121.

Определяли связывание EJ173/112-C11 (г84/PGN311) scFv с биологически активной изоформой VEGF-A, VEGF121 (R&D systems HuVEGF121 298-VS-005/CF). 2 мкг/мл свободного от носителя VEGF121 наносили на полистироловые иммунопланшеты. Добавляли 10 мкг/мл очищенного scFv и детектировали моноклональным антителом мыши против метки c-myc (Invitrogen) и HRP-конъюгированным вторичным антителом кролика против антител мыши.

Результаты показали, что EJ173/112-C11 (г84/PGN311) (фиг. 7) было положительным по VEGF121. Контрольное scFv мыши B9 распознавало VEGF121, но на пониженном уровне по сравнению с человеческими вариантами.

Пример 9. EJ173/112-C11 (г84/PGN311) блокирует связывание VEGF с VEGFR2, но не с VEGFR1.

96-луночные планшеты ELISA (BD Falcon, номер в каталоге 353279) покрывали в течение ночи при 4°C растворимыми HuVEGFR1/Fc (R&D systems, номер в каталоге 321-FL-050, CF) или HuVEGFR2 (R&D systems 357-KD-050/CF) при концентрации 1,0 мкг/мл в 50 мкл сенсibilизирующего буфера/лунку. Лунки промывали буфером для промывки (WB) (TBSt (Трис-буферный солевой раствор, 0,1% Tween 20)) и блокировали в течение 1 ч при 37°C в 20% Aquablock (East Coast Biologies, Inc.) в WB. 50 мкл IgG при подходящей концентрации или WB добавляли в лунки, а затем немедленно добавляли VEGF-биотин до конечной концентрации 100 нг/мл. Планшет инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре, промывали 3 раза и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре с 100 мкл/лунку конъюгированного с пероксидазой авидина (JacksonImmuno Research) при разведении 1:7500 в WB. После промывки планшетов 4 раза, сигнал проявляли с помощью TMB, останавливали кислотой и считывали при 450 нм.

Результаты этих тестов представлены на фиг. 8А и 8В. Сигнал VEGF отдельно (VEGF) или VEGF в присутствии указанного антитела нормировали на VEGF отдельно (100%). Показано среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего. N =12 (4 идентичных планшета с каждым вариантом обработки выполняли в трех повторностях). Сигнал, равный менее чем 50%, рассматривали как значительное ингибирование связывания.

На фиг. 8А и 8В показано, что результаты этого контролируемого исследования показали, что г84/PGN311, по существу, блокирует взаимодействие VEGF с VEGFR2, по существу, не блокирует взаимодействие VEGF с VEGFR1. Параллельные исследования с применением г84/PGN311 и Авастина (бевацизумаба) (Presta и др., 1997) подтвердили известные свойства Авастина, как, по существу, блокирующего взаимодействие VEGF с обоими VEGFR2 и VEGFR1. Вдобавок, параллельные исследования с применением г84/PGN311 и исходного антитела 2C3 мыши показали, что разница, по существу, блокирования связывания VEGF с VEGFR2, но, по существу, не блокирования связывания VEGF с VEGFR1, была даже больше для г84, чем для 2C3. Это представляет другое неожиданное преимущество г84 над антителом 2C3.

Пример 10. Связанные с опухолью макрофаги экспрессируют VEGFR2.

А. Модель.

Ортотопические опухоли были получены в "голых" мышах без вилочковой железы (7-9 недель) путем инъекции  $1 \times 10^6$  клеток MiaPaCa-2 в хвост поджелудочной железы. Опухолям позволили прогрессировать в течение одной недели перед началом терапии.

В. Лечение.

Животных лечили контрольным антителом (С44) или антителом мыши 2C3 путем интраперитонеальной инъекции дважды в неделю в течение трех недель. После умерщвления опухоли удаляли и с остатком поджелудочной железы взвешивали и быстро замораживали или фиксировали в метилированном фиксаторе Карнуа для гистохимического и иммуногистохимического анализа.

С. ИГХ.

Антитела, используемые для маркеров макрофагов, включали CD86, CD14 и F4/80. Применяли антитела к VEGFR2 T014 и RAFL-2.

Д. Выделение перитонеальных макрофагов.

Макрофаги из несущих опухоль (ТВ) или ненесущих опухоль (NTВ) животных выделяли с помощью стерильного перитонеального лаважа.

Е. Результаты.

Неожиданно было обнаружено, что связанные с опухолью макрофаги (ТАМ) экспрессируют VEGFR2. Это объясняет то наблюдение, что 2C3 снижало инфильтрацию VEGFR2-положительных ТАМ in vivo. Результаты представлены на фиг. 10А, В и С.

В этом отношении на фиг. 10А изображена колокализация окрашивания T014 (антитело к VEGFR2) и F4/80 (маркер макрофагов) на опухолевых срезах из контрольных животных или животных, которым вводили 2С3. 2С3 уменьшало инфильтрацию макрофагов. Тем не менее, для обеих групп продемонстрировали колокализацию VEGFR2 и маркеров макрофагов. Количество клеток, положительных как по одному из трех различных маркеров макрофагов, так и по VEGFR2, изображено на фиг. 10В. На фиг. 10С, перитонеальные макрофаги из животных-опухоленосителей проявили наличие VEGFR2, что определили, применяя два различных антитела.

Пример 11. r84/PGN311 уменьшает объем опухоли у животных.

Модели на животных использовали, чтобы показать, что введение антитела r84/PGN311 приводит к значительному снижению объемов опухолей.

А. Модель опухоли клеток рака молочной железы MDA-MB-231.

5 миллионов клеток MDA-MB-231 инъецировали в жировое тело молочной железы мышей SCID. Опухоли развивались в течение 26 дней перед началом терапии. В это время животных произвольно распределили по группам для лечения. 100 мкл солевого раствора (контроль, n=5) или 250 мкг IgG Авастина (n=8) или IgG r84/PGN311 (n=9) в 100 мкл буфера вводили путем подкожной инъекции 2 раза в неделю. Результаты представлены на фиг. 11, на которой показан средний объем опухоли  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Мыши, которым вводили Авастин и r84, имели объемы опухолей, значительно меньшие, чем контрольные животные. На фиг. 12 показано отношение масса опухоли/масса тела для отдельных животных в каждой группе. Мыши, которым вводили Авастин и r84, имели отношения масса опухоли/масса тела значительно меньшие, чем контрольные животные. Результаты, представленные на фиг. 11 и 12, показали, что r84 действует, по существу, так же эффективно, как и Авастин.

В. Модель опухоли рабдомиосаркомы A673.

$1,0 \times 10^6$  клеток A-673 (линия клеток рабдомиосаркомы человека - ATCC CRL-1598) инъецировали подкожно мышам 22 nu/nu (NCI). Мышей разделяли на 3 группы (n=8/группу для 2С3 и r84/PGN311, n=6/контрольную группу) и терапию начинали через 5 дней после инъекции опухолевых клеток (TCI). Терапия состояла из интраперитонеальной инъекции 50 мкг указанного IgG два раза в неделю. Отслеживали массу животного и объем опухоли. Контрольным антителом был Синагис (антитело человека против PC9).

Мышам вводили 8 инъекций препарата между днем 5 и днем 29 после TCI. На фиг. 13 показан объем опухоли в каждой группе в день 30 после TCI. Односторонний дисперсионный анализ показал, что группы были статистически различными; более того, 2С3 и r84/PGN311 отличались от контроля по "критерию множественного сравнения Даннета" ( $p < 0,05$ ). Из этих результатов очевидно, что 2С3 и r84 снижали опухолевый рост при умеренной дозе 50 мкг/инъекцию два раза в неделю. r84 проявило активность, которая была, по существу, аналогичной таковой для 2С3. Общее заключение из этого исследования на животных состояло в том, что 2С3 и r84 эффективны для контролирования роста опухолей A673.

С. Модели немелкоклеточной карциномы легкого (NSCLC) человека.

Дополнительные модели на животных *in vivo* использовали, чтобы показать, что введение антитела r84/PGN311 приводит к значительному снижению опухолевого роста.

Способность r84/PGN311 ингибировать опухолевый рост *in vivo* тестировали на четырех различных немелкоклеточных карциномах легкого (NSCLC) человека, H1299 (ATCC CRL-5803), H460 (ATCC HTB-177), H358 (ATCC CRL-5807) и A549 (ATCC CCL-185). Мышам SCID (n=25 на линию клеток) инъецировали подкожно  $2,5 \times 10^6$  клеток и начинали терапию через 1 день после TCI. Терапия состояла из 250 мкг Синагиса или XTL (отрицательный контрольный), IgG Авастина (положительный контрольный) или 500 мкг IgG r84/PGN311, которые доставляли интраперитонеально (i.p.) 2 раза в неделю. Терапию продолжали до момента умерщвления мышей. Мышей H460 умерщвляли через 40 дней, мышей H1299 умерщвляли через 48 дней, мышей A549 умерщвляли через 55 дней, и мышей H358 умерщвляли через 83 дня. Затем измеряли массу опухолей, результаты представлены на фиг. 17А (для H460), 17В (для H1299), 17С (для H358) и 17D (для A549) как средняя масса опухоли  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Отношения массы подвергнутых терапии опухолей к массе контрольных опухолей также представлено на фиг. 17А, 17В, 17С и 17D ("Т/К").

На фиг. 17А, 17В, 17С и 17D показано, что животные, которых лечили Авастином и r84/PGN311, имели массу опухоли, значительно меньшую, чем у контрольных животных. r84/PGN311 действовало лучше, чем Авастин в моделях H460 (фиг. 17А), H1299 (фиг. 17В) и A549 (фиг. 17D). r84/PGN311 действовало, по меньшей мере, так же эффективно, как и Авастин в тесте с H358 (фиг. 17С).

Д. Модель клеток опухоли рака поджелудочной железы Panc1.

Мышам, несущим клетки аденокарциномы поджелудочной железы Panc1, вводили либо IgG r84/PGN311, либо Синагис в качестве отрицательного контроля. Терапию проводили до момента умерщвления мышей. Измерили объемы опухолей и результаты представили на фиг. 22. Можно видеть, что r84/PGN311 заметно уменьшает опухолевый рост Panc1 по сравнению с контролем (фиг. 22).

Е. Модель опухоли молочной железы 4Т1.

Контрольные исследования с применением химерного варианта r84/PGN311 мыши показали, что

антитело г84 способно продлить выживаемость мышей, несущих сингенные опухоли молочной железы 4T1. На фиг. 23 представлено, что лечение химерным г84/PGN311 мыши приводило к более длительному выживанию мышей по сравнению с выживанием животных в контрольной группе.

Пример 12. г84/PGN311 уменьшает плотность микрососудов и инфильтрацию связанных с опухолью макрофагов.

Опухоли брали из мышей, используемых в исследовании модели на животных MDA-MB-231, описанном в примере 11, а также из мышей, которых лечили параллельно в соответствии с той же схемой приема 250 мкг IgG 2C3 в 100 мкл буфера. Делали срезы этих опухолей и окрашивали антителами к эндотелиальным клеткам мыши (MECA-32) и к маркеру макрофагов (Mac-3). Анализировали три опухоли из контрольных животных и по три опухоли из животных, которых лечили г84/PGN311 и 2C3, и исследовали 5 изображений для каждой опухоли. На фиг. 14 и 15 представлены результаты, которые показывают, что опухоли из животных, которым вводили г84 и 2C3, имели значительно сниженное количество кровеносных сосудов в поле зрения при большом увеличении (MECA-32,  $p < 0,0001$ , фиг. 15) и значительно пониженную экспрессию маркера макрофагов (Mac-3,  $p < 0,01$  для 384, фиг. 14). Это свидетельствует о том, что 384 значительно уменьшает плотность микрососудов и инфильтрацию связанных с опухолью макрофагов и что 384 оказывает более выраженный эффект, чем 2C3, на снижение инфильтрации связанных с опухолью макрофагов (фиг. 14).

Пример 13. Влияние г84/PGN311 на клетки, инфильтрирующие опухоли.

А. Полиморфноядерные лейкоциты.

Опухоли брали из мышей, используемых в исследовании модели на животных MDA-MB-231, описанном в примере 11, а также из мышей, которых лечили параллельно в соответствии с той же схемой приема 250 мкг IgG 2C3 в 100 мкл буфера.

Исследование показало, что опухоли из животных, которым вводили г84 и 2C3, имели значительно повышенную инфильтрацию полиморфноядерных лейкоцитов (PMN) по сравнению с контролем. Этот эффект имел статистическую значимость для антител г84 и 2C3. Хотя Авастин (бевацизумаб) также повышал инфильтрацию PMN в опухоли MDA-MB-231 по сравнению с контролем в противоположность г84 и 2C3, это увеличение не было статистически значимым для Авастина.

В. Клетки CD11b+/Gr1+.

Дополнительные исследования на мышах-опухоленосителях MDA-MB-231 показали, что значительно меньше положительных по двум маркерам CD11b/Gr1 клеток инфильтрируют опухоли у животных, которых лечили г84, в противоположность контролю. В сравнительных исследованиях, ни антитело 2C3, ни Авастин не проявили статистически значимого уменьшения инфильтрации CD11b+/Gr1+, хотя некоторое снижение можно было измерить у животных, которых лечили Авастином.

Опухоли брали из мышей, используемых в исследовании модели на животных MDA-MB-231, описанном в примере 11, а также из мышей, которых лечили параллельно в соответствии с той же схемой приема 250 мкг IgG 2C3 в 100 мкл буфера.

Исследование показало, что значительно меньше положительных по двум маркерам CD11b+/Gr1+ клеток инфильтрируют опухоли у животных, которых лечили г84, в противоположность контролю (что оценивали с помощью дисперсионного анализа,  $p < 0,01$ , показано символом \*\* на фиг. 25). Уменьшение количества положительных по обоим маркерам клеток составляло 39%. В сравнительных исследованиях 2C3 не проявило статистически значимого уменьшения инфильтрации CD11b+/Gr1+ (фиг. 25).

Пониженная инфильтрация супрессорных клеток миелоидного происхождения CD11b+/Gr1+ представляет особый интерес, так как клетки, экспрессирующие оба маркера, недавно были связаны с опосредованием рефрактерности опухоли к терапии, направленной против VEGF (Shojaei и др., 2007). Супрессорные клетки миелоидного происхождения (CD11b+/Gr1+) также являются важными участниками прогрессирования опухоли. В микроокружении опухоли эти клетки секретируют иммуносупрессорные медиаторы и вызывают дисфункцию Т-лимфоцитов (Gabrilovich и др., 2001; Serafini и др., 2004).

Так как инфильтрация опухоли клетками CD11b+/Gr1+ менее выражена/значительно ниже у животных, которых лечили г84, это позволяет предположить, что лечение г84 менее подвержено развитию резистентности к лекарственным препаратам или рефрактерности к терапии, направленной против VEGF, чем лечение другими лекарственными препаратами, нацеленными на VEGF.

Способность снижать инфильтрацию клеток CD11b+/Gr1+ в опухоли, таким образом, представляет собой дополнительное полезное свойство, проявляемое антителом г84/PGN311, и представляет собой свойство, которое имеет потенциальную важность для терапевтического применения г84/PGN311. Более того, это свойство не проявляется антителом 2C3, и проявляется лишь на более сниженном уровне Авастином.

Пример 14. г84/PGN311 уменьшает плотность лимфатических сосудов в опухолях.

Мышей, включающих опухоли MDA-MB-231, лечили г84/PGN311 или контрольным антителом и анализировали опухолевые срезы, чтобы показать лимфатические сосуды в опухолях. Результаты представлены на фиг. 18А, 18В и 18С, которые показывают, что плотность лимфатических сосудов в опухолях, которые лечили г84, значительно ниже, чем в контрольных опухолях.

В частности, сначала осуществляли иммунофлуоресцентное окрашивание замороженных опухоле-

вых срезов MDA-MB-231, чтобы идентифицировать лимфатические сосуды с помощью лимфатических маркеров, подопланина и Prox1. Эти результаты описаны на фиг. 18А, на которой показаны подоплантин (зеленый), Prox1 (красный) и совмещенные изображения, идентифицируя, таким образом, лимфатические сосуды в контроле (верхние изображения) и в опухолях, которые лечили r84 (нижние изображения). Также последовательно выполняли окрашивание LYVE-1 опухолевых срезов MDA-MB-231. На фиг. 18В показано, что эти результаты указывают на то, что паттерн лимфатических сосудов на опухолевых срезах MDA-MB-231, окрашенных LYVE-1, аналогичен таковому, наблюдаемому для подопланина и Prox1 (фиг. 18А).

Чтобы определить, была ли плотность лимфатических сосудов в контроле и в опухолях, которые лечили r84, различной, исследовали полную площадь каждого окрашенного LYVE-1 опухолевого среза при небольшом увеличении и процент положительной по LYVE-1 площади определяли для каждого поля, применяя программное обеспечение для визуализации NIS-Elements. Десять полей с наиболее высоким процентом положительной по LYVE-1 площади усредняли, чтобы получить конечное значение для каждой опухоли, и средние значения для групп проверяли на статистическую значимость с помощью непарного t-критерия Стьюдента. На фиг. 18С показано, что процент положительной по LYVE-1 площади контрольных опухолей ( $7,03 \pm 1,013$ ;  $n=6$ ) был значительно больше, чем в опухолях, которых лечили r84 ( $2,23 \pm 0,986$ ;  $n=5$ ), с  $P=0.0042$ . Эти результаты, демонстрирующие, что лечение r84/PGN311 значительно снижает плотность лимфатических сосудов опухолей, таким образом, поддерживают применение антител человека согласно настоящему изобретению для ингибирования лимфангиогенеза.

Пример 15. Длительное введение r84/PGN311 не вызывало токсичность у мышей.

В этих исследованиях использовали не несущих опухоли и несущих опухоли мышей.

$5 \times 10^6$  клеток Рапс1 (линия клеток рака поджелудочной железы человека, ATCC CRL-1469), инъецировали 10 мышам SCID. В день 1 после TCI 5 несущим опухоль и 5 не несущим опухоль мышам инъецировали интраперитонеально 500 мкг Синагиса или IgG r84/PGN311. Терапию осуществляли в виде инъекции 2 раза в неделю и продолжали в течение 12 недель, после чего мышам умерщвляли. После умерщвления брали кровь и анализировали с помощью стандартного химического анализа крови. Печень, почку и щитовидные железы также собирали для гистологической оценки.

Эти анализы показали, что не было явных изменений в гистологии любой ткани, исследованной окрашиванием гематоксилин-эозином (H&E) (это исследование осуществлял слепым способом патоморфолог, который специализируется на гистологии тканей мыши). Более того, химический анализ крови был проанализирован на 22 различных исследуемых веществах, и не было обнаружено значительных изменений между контрольными, наивными (не используемыми в эксперименте) мышами, или животными, которых лечили r84.

Хотя композиции и способы согласно настоящему изобретению были описаны в аспекте предпочтительных вариантов реализации, для специалистов в данной области техники должно быть очевидно, что можно применять различные варианты композиций, способов и этапов или последовательности этапов способов, описанных в данной заявке, не отклоняясь от концепции, сущности и объема настоящего изобретения. А именно, должно быть очевидно, что некоторые агенты, которые как химически, так и физиологически родственны, могут заменить агенты, описанные в данной заявке, тогда как будут достигнуты такие же или аналогичные результаты. Все такие аналогичные замены и модификации, очевидные для специалистов в данной области техники, подразумеваются включенными в сущность, объем и концепцию настоящего изобретения, определенные прилагаемой формулой изобретения.

Список литературы.

Следующие ссылки до тех пор, пока они обеспечивают типичные методические или другие подробности, дополнительные к описанным в данной заявке, специально включены в данную заявку посредством ссылки.



- Abrams and Oldham, "In: Monoclonal Antibody Therapy of Human Cancer", *Foon and Morgan (Eds.), Martinus Nijhoff Publishing, Boston*, 103-120, 1985.
- Aiello, Pierce, Foley, Takagi, Chen, Riddle, Ferrara, King, Smith, "Suppression of retinal neovascularization *in vivo* by inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) using soluble VEGF-receptor chimeric proteins," *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 92:10457-10461, 1995.
- Alderson, McGowan, Baldrige, Probst, "TLR4 Agonists as Immunomodulatory Agents", *J. Endotoxin Res.*, 12(5):313-319, 2006.
- Alon, Hemo, Itin, Pe'er, Stone, Keshet, "Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity," *Nature Med.*, 1:1024-1028, 1995.
- Altschul, Madden, Schaffer, Zhang, Zhang, Miller, Lipman, "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-3402, 1997.
- Anthony, Wheeler, Elcock, Pickett, Thomas, "Short report: identification of a specific pattern of vascular endothelial growth factor mRNA expression in human placenta and cultured placental fibroblasts", *Placenta*, 15:557-61, 1994.
- Apetoh, Ghiringhelli, Tesniere, Obeid, Ortiz, Criollo, Mignot, Maiuri, Ullrich, Saulnier, Yang, Amigorena, Ryffel, Barrat, Saftig, Levi, Lidereau, Nogues, Mira, Chompret, Joulin, Clavel-Chapelon, Bourhis, Andre, Delaloge, Tursz, Kroemer, Zitvogel, "Toll-Like Receptor 4-Dependent Contribution of the Immune System to Anticancer Chemotherapy and Radiotherapy", *Nat. Med.*, 13:1050-1059, 2007.
- Arbabi-Ghahroudi, Desmyter, Wyns, Hamers, Muyldermans, "Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies", *FEBS Lett.*, 414:521-526, 1997.
- Asahara, Murohara, Sullivan, Silver, van der Zee, Li, Witzenbichler, Schatteman, Isner, "Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis," *Science*, 275(5302):964-967, 1997.
- Asano, Yukita, Matsumoto, Kondo, Suzuki, "Inhibition of tumor growth and metastasis by an immunoneutralizing monoclonal antibody to human vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor," *Cancer Res.*, 55:5296-5301, 1995.

- Asano, Yukita, Matsumoto, Hanatani, Suzuki, "An anti-human VEGF monoclonal antibody, MV833, that exhibits potent anti-tumor activity *in vivo*," *Hybridoma*, 17:185-90, 1998.
- Baca, Presta, O'Connor, Wells, "Antibody humanization using monovalent phage display," *J. Biol. Chem.*, 272(16):10678-84, 1997.
- Baldari, Murray, Ghiara, Cesareni, Galeotti, "A Novel Leader Peptide Which Allows Efficient Secretion of a Fragment of Human Interleukin 1 Beta in *Saccharomyces Cerevisiae*", *EMBO J.*, 6:229-234, 1987.
- Barbas, Kang, Lerner and Benkovic, "Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88(18):7978-7982, 1991.
- Baxter and Jain, "Transport of fluid and macromolecules in tumors," *Micro. Res.*, 41:5-23, 1991.
- Beckman, Weiner and Davis, "Antibody Constructs in Cancer Therapy", *Cancer*, 109(2):170-179, 2006.
- Benjamin, Golijanin, Itin, Pode and Keshet, "Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal," *J. Clin. Invest.*, 103(2):159-165, 1999.
- Berman, Mellis, Pollock, Smith, Suh, Heinke, Kowal, Surti, Chess, Cantor, *et al.*, "Content and organization of the human Ig VH locus: definition of three new VH families and linkage to the Ig CH locus," *EMBO J.*, 7(3):727-738, 1988.
- Borgstrom, Hillan, Sriramarao, Ferrara, "Complete inhibition of angiogenesis and growth of microtumors by anti-vascular endothelial growth factor neutralizing antibody: novel concepts of angiostatic therapy from intravital videomicroscopy," *Cancer Res.*, 56(17):4032-1439, 1996.
- Borgstrom Bourdon, Hillan, Sriramarao, Ferrara, "Neutralizing anti-vascular endothelial growth factor antibody completely inhibits angiogenesis and growth of human prostate carcinoma micro tumors *in vivo*," *Prostate*, 35(1):1-10, 1998.
- Borgstrom, Gold, Hillan, Ferrara, "Importance of VEGF for breast cancer angiogenesis *in vivo*: implications from intravital microscopy of combination treatments with an anti-VEGF neutralizing monoclonal antibody and doxorubicin," *Anticancer Research*, 19(5B):4203-11, 1999.
- Bornstein, "Thrombospondins: structure and regulation of expression," *FASEB J.*, 6(14):3290-3299, 1992.
- Brekken, Huang, King, Thorpe, "Vascular endothelial growth factor as a marker of tumor endothelium," *Cancer Res.*, 58(9):1952-1959, 1998.

- Brekken, Overholser, Stasny, Waltenberger, Minna, Thorpe, "Selective inhibition of VEGFR2 activity by a monoclonal anti-VEGF antibody blocks tumor growth in mice", *Cancer Res.*, 60:5117-24, 2000.
- Brem, "Angiogenesis antagonists: current clinical trials," *Angiogenesis*, 2: 9-20, 1998.
- Brinster, Chen, Trumbauer, Yagle, Palmiter, "Factors Affecting the Efficiency of Introducing Foreign DNA into Mice by Microinjecting Eggs", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82(13):4438-4442, 1985.
- Burke, Carle, Olson, "Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors", *Science*, 236, 806-812, 1987.
- Burke, Lehmann-Bruinsma, Powell, "Vascular endothelial growth factor causes endothelial proliferation after vascular injury," *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 207:348-354, 1995.
- Burrows and Thorpe, "Vascular targeting-a new approach to the therapy of solid tumors," *Pharmacol. Ther.*, 64:155-174, 1994.
- Burrows and Thorpe, "Eradication of large solid tumors in mice with an immunotoxin directed against tumor vasculature," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:8996-9000, 1993.
- Burrows, Watanabe, Thorpe, "A murine model for antibody-directed targeting of vascular endothelial cells in solid tumors," *Cancer Res.*, 52:5954-5962, 1992.
- Carmeliet, Ferreira, Breier, Pollefeyt, Kieckens, Gertsenstein, Fahrig, Vandenhoec, Harpal, Eberhardt, Declercq, Pawling, Moons, Collen, Risau, Nagy, "Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele," *Nature*, 380(6573):435-439, 1996.
- Carillo and Lipton, "The Multiple Sequence Alignment Problem in Biology", *SIAM J. Applied Math.*, 48:1073, 1988.
- Cheng, Huang, Nagane, Ji, Wang, Shih, Arap, Huang, Cavenee, "Suppression of glioblastoma angiogenicity and tumorigenicity by inhibition of endogenous expression of vascular endothelial growth factor," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:8502-8507, 1996.
- Claffey, Brown, del Aguila, Tognazzi, Yeo, Manseau, Dvorak, "Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by melanoma cells increases tumor growth, angiogenesis, and experimental metastasis," *Cancer Res.*, 56:172-181, 1996.
- Clapp, Martial, Guzman, Fentier-Delure, Weiner, "The 16-kilodalton N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis," *Endocrinology*, 133(3):1292-1299, 1993.

- Clauss, Weich, Breier, Knies, Röckl, Waltenberger, Risau, "The vascular endothelial cell growth factor receptor Flt-1 mediates biological activities," *J. Biol. Chem.*, 271(30):17629-17634, 1996.
- Cohen, Gaskins, Nasoff, "Generation of a Monoclonal Antibody Agonist to Toll-Like Receptor 4", *Hybridoma*, 24(1):27-35, 2005.
- Condeelis and Pollard, "Macrophages: Obligate Partners for Tumor Cell Migration, Invasion, and Metastasis", *Cell*, 124:263-266, 2006.
- Connolly, Heuvelman, Nelson, Olander, Eppley, Delfino, Siegel, Leimgruber, Feder, "Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis," *J. Clin. Invest.*, 84:1470-1478, 1989.
- Coughlin, Salhany, Wysocka, Aruga, Kurzawa, Chang, Hunter, Fox, Trinchieri, Lee, "Interleukin-12 and interleukin-18 synergistically induce murine tumor regression which involves inhibition of angiogenesis," *J. Clin. Invest.*, 101(6):1441-1452, 1998.
- Cullen, Gray, Wilson, Hayenga, Lamsa, Rey, Norton, Berka, "Controlled Expression and Secretion of Bovine Chymosin in *Aspergillus Nidulans*", *BioTechnology*, 5:369, 1987.
- D'Amato, Loughnan, Flynn, Folkman, "Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91(9):4082-4085, 1994.
- D'Angelo, Struman, Martial, Weiner, "Activation of mitogen-activated protein kinases by vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in capillary endothelial cells is inhibited by the antiangiogenic factor 16-kDa N- terminal fragment of prolactin," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92(14):6374-6378, 1995.
- Davies and Cohen, "Interactions of protein antigens with antibodies," *Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:7-12, 1996. Davies, Padlan, Sheriff, "Antibody-antigen complexes," *Annu. Rev. Biochem.* 59:439-473, 1990.
- Davies and Riechmann, "Antibody VH domains as small recognition units", *Biotechnology (NY)*, 13:475-479, 1995.
- Davis and Yancopoulos, "The angiopoietins: Yin and Yang in angiogenesis", *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 237:173-85, 1999.
- Detmar, Brown, Claffey, Yeo, Kocher, Jackman, Berse, Dvorak, "Overexpression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and its receptors in psoriasis," *J. Exp. Med.*, 180:1141-1146, 1994.
- Devereux, Haeblerli, Smithies, "A Comprehensive Set of Sequence Analysis Programs for the VAX", *Nucleic Acids Res.*, 12:387, 1984.

- DeVore, Hellerqvist, Wakefield, Wamil, Thurman, Minton, Sundell, Yan, Carter, Wang, York, Zhang, Johnson, "Phase I Study of the Antineovascularization Drug CM101," *Clin. Cancer Res.*, 3(3):365-372, 1997.
- deVries, Escobedo, Ueno, Houck, Ferrara, Williams, "The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor," *Science*, 255(5047):989-991, 1992.
- Dvorak, Nagy, Dvorak, "Structure of solid tumors and their vasculature: implications for therapy with monoclonal antibodies," *Cancer Cells*, 3:77-85, 1991a.
- Dvorak, Sioussat, Brown, Berse, Nagy, Sotrel, Manseau, Vandewater, Senger, "Distribution of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) in tumors - concentration in tumor blood vessels," *J. Exp. Med.*, 174:1275-1278, 1991b.
- Ferrara, "The role of vascular endothelial growth factor in pathological angiogenesis," *Breast Cancer Res. Treat.*, 36:127-137, 1995.
- Ferrara, Clapp, Weiner, "The 16K fragment of prolactin specifically inhibits basal or fibroblast growth factor stimulated growth of capillary endothelial cells," *Endocrinology*, 129(2):896-900, 1991.
- Ferrara, Houck, Jakeman, Winer, Leung, "The vascular endothelial growth factor family of polypeptides," *J. Cell. Biochem.*, 47:211-218, 1991.
- Ferrara, Carver-Moore, Chen, Dowd, Lu, O'Shea, Powell-Braxton, Hillan, Moore, "Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene," *Nature*, 380(6573):439-442, 1996.
- Fidler and Ellis, "The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis [comment]," *Cell*, 79(2):185-188, 1994.
- Fidler, Kumar, Bielenberg, Ellis, "Molecular determinants of angiogenesis in cancer metastasis," *Cancer J. Sci. Am.*, 4 Suppl 1:S58-66, 1998.
- Finberg, Knipe, Kurt-Jones, "Herpes Simplex Virus and Toll-Like Receptors", *Viral Immunol.*, 18(3):457-465, 2005.
- Folkman and Shing, "Angiogenesis," *J. Biol. Chem.*, 267:10931-10934, 1992.
- Folkman, Langer, Linhardt, Haudenschild, Taylor, "Angiogenesis inhibition and tumor regression caused by heparin or a heparin fragment in the presence of cortisone," *Science*, 221:719-725, 1983.
- Fong, Rossant, Gertsenstein, Breitman, "Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium," *Nature*, 376:66-70, 1995.

- Forsythe, Jiang, Iyer, Agani, Leung, Koos, Semenza, "Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1," *Mol. Cell. Biol.*, 16:4604-4613, 1996.
- Fotsis, Zhang, Pepper, Adlercreutz, Montesano, Nawroth, Schweigerer, "The endogenous oestrogen metabolite 2-methoxyoestradiol inhibits angiogenesis and suppresses tumour growth," *Nature*, 368(6468):237-239, 1994.
- Frank, Hubner, Breier, Longaker, Greenhalgh, Werner, "Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured growth factor expression in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing," *J. Biol. Chem.*, 270:12607-12613, 1995.
- Frankel, "Genetically Engineered Toxins", Editor Arthur E. Frankel, Marcel Dekker Inc., New York, NY, 1992.
- Frater-Schroder, Risau, Hallmann, Gautschi, Bohlen, "Tumor necrosis factor type alpha, a potent inhibitor of endothelial cell growth *in vitro*, is angiogenic *in vivo*," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84(15):5277-5281, 1987.
- Frazier, "Thrombospondins," *Curr. Opin. Cell Biol.*, 3(5):792-799, 1991.
- Frische, Meldal, Werdelin, Mouritsen, Jensen, Galli-Stampino, Bock, "Multiple Column Synthesis of a Library of T-Cell Stimulating Tn-Antigenic Glycopeptide Analogues for the Molecular Characterization of T-Cell-Glycan Specificity", *J. Pept. Sci.*, 2(4): 212-22, 1996.
- Gabrilovich, D.I., Velders, M.P., Sotomayor, E.M. & Kast, W.M. (2001). Mechanism of immune dysfunction in cancer mediated by immature Gr-1+ myeloid cells. *J Immunol*, **166**, 5398-406.
- Gagliardi, Hadd, Collins, "Inhibition of angiogenesis by suramin," *Cancer Res.*, 52(18):5073-5075, 1992.
- Gagliardi and Collins, "Inhibition of angiogenesis by antiestrogens," *Cancer Res.*, 53(3):533-535, 1993.
- Gagliardi, Kassack, Kreimeyer, Muller, "Antiangiogenic and antiproliferative activity of suramin analogues," *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 41(2):117-124, 1998.
- Gagnon, Bielenberg, Gechtman, Miao, Takashima, Soker, Klagsbrun, "Identification of a natural soluble neuropilin-1 that binds vascular endothelial growth factor: *In vivo* expression and antitumor activity", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(6):2573-2578, 2000.
- Gerber, Condorelli, Park, Ferrara, "Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes," *J. Biol. Chem.*, 272:23659-23667, 1997.

- Gerber, Vu, Ryan, Kowalski, Werb, Ferrara, "VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation"; *Nature Medicine*, 5(6):623-8, 1999.
- Giovarelli, Cappello, Forni, Salcedo, Moore, LeFleur, Nardelli, Di Carlo, Lollini, Ruben, Ullrich, Garotta, Musiam, "Tumor rejection and immune memory elicited by locally released LEC chemokine are associated with an impressive recruitment of APCs, lymphocytes, and granulocytes", *J. Immunol.*, 164, 3200-3206, 2000.
- Glennie, McBride, Worth, Stevenson, "Preparation and performance of bispecific F(ab' gamma)2 antibody containing thioether-linked Fab' gamma fragments," *J. Immunol.*, 139:2367-2375, 1987.
- Goeddel, "Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA, 1990.
- Good, Polverini, Rastinejad, Beau, Lemons, Frazier, Bouck, "A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87(17):6624-6628, 1990.
- Goswami, Sahai, Wyckoff, Cammer, Cox, Pizley, Stanley, Segall and Condeelis, "Macrophages Promote the Invasion of Breast Carcinoma Cells via a Colony-Stimulating Factor-1/Epidermal Growth Factor Paracrine Loop", *Cancer Res.*, 65(12):5278-5283, 2005.
- Grant, Caballero, Bush, Spoerri, "Fibronectin fragments modulate human retinal capillary cell proliferation and migration," *Diabetes*, 47(8):1335-1340, 1998.
- Guo, Jia, Song, Warren, Donner, "Vascular endothelial cell growth factor promotes tyrosine phosphorylation of mediators of signal transduction that contain SH2 domains," *J. Biol. Chem.*, 270:6729-6733, 1995.
- Hamers-Casterman and Atarhouch, "Naturally Occurring antibodies Devoid of Light Chains", *Nature*, 363(6428):446-448, 1993.
- Hammer, Pursel, Rexroad, Wall, Bolt, Ebert, Palmiter, Brinster, "Production of Transgenic Rabbits, Sheep and Pigs by Microinjection", *Nature*, 315:680-683, 1985.
- Hanahan and Folkman, "Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis," *Cell*, 86(3):353-364, 1996.
- Harada, Mitsuyama, Yoshida, Sakisaka, Taniguchi, Kawaguchi, Ariyoshi, Saiki, Sakamoto, Nagata, Sata, Matsuo, Tanikawa, "Vascular endothelial growth factor in patients with rheumatoid arthritis", *Scandinavian J. Rheumatol.*, 27(5):377-80, 1998.
- Haran, Maretzek, Goldberg, Horowitz, Degani, "Tamoxifen enhances cell death in implanted MCF7 breast cancer by inhibiting endothelium growth," *Cancer Res.*, 54(21):5511-5514, 1994.

- Hasselaar and Sage, "SPARC antagonizes the effect of basic fibroblast growth factor on the migration of bovine aortic endothelial cells," *J. Cell Biochem.*, 49(3):272-283, 1992.
- Harlow and Lane, "Antibodies: a Laboratory Manual", *Cold Spring Harbor Laboratory*, Cold Spring Harbor Laboratory, ISBN 978-087969314-5 :1-726, 1988.
- Hellerqvist, Thurman, Page, Wang, Russell, Montgomery, Sundell, "Antitumor effects of GBS toxin: a polysaccharide exotoxin from group B beta-hemolytic streptococcus," *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 120(1-2):63-70, 1993.
- Henikoff and Henikoff, "Amino acid Substitution Matrices from Protein Blocks", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:10915-10919, 1992.
- Hinnen, Hicks, Fink, "Transformation of Yeast", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75:1929, 1978.
- Hiratsuka, Minowa, Kuno, Noda, Shibuya, "Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(16):9349-9354, 1998.
- Hiscox and Jiang, "Interleukin-12, an emerging anti-tumour cytokine," *In Vivo*, 11(2):125-132, 1997.
- Holash, Maisonpierre, Compton, Boland, Alexander, Zagzag, Yancopoulos, Wiegand, "Vessel Cooption, Regression, and Growth in Tumors Mediated by Angiopoietins and VEGF", *Science*, 284:1994-1998, 1999.
- Holliger and Hudson, "Engineered Antibody Fragments and the Rise of Single Domains", *Nature Biotechnology*, 23(9):1126-1136, 2005.
- Holm, "Dali: a Network Tool for Protein Structure Comparison", *Trends in Biochemical Sciences*, 20:478-480, 1995.
- Holm, "Protein Structure Comparison by Alignment of Distance Matrices", *J. Mol. Biol.*, 233:123-38, 1993.
- Holm, "Touring Protein Fold Space With Dali/FSSP", *Nucleic Acid Res.*, 26:316-9, 1998.
- Hood and Granger, "Protein kinase G mediates vascular endothelial growth factor-induced Raf-1 activation and proliferation in human endothelial cells," *J. Biol. Chem.*, 273(36):23504-23508, 1998.
- Hood, Meininger, Ziche, Granger, "VEGF upregulates ecNOS message, protein, and NO production in human endothelial cells," *Am. J. Physiol.*, 274(3 Pt 2):H1054-1058, 1998.
- Hori, Hu, Yasui, Smither, Gresham, Fan, "Differential effects of angiostatic steroids and dexamethasone on angiogenesis and cytokine levels in rat sponge implants," *Br. J. Pharmacol.*, 118(7):1584-1591, 1996.



- Horsmans, Berg, Desager, Mueller, Schott, Fletcher, Steffy, Bauman, Kerr, Averett, "Isatoribine, an agonist of TLR7, reduces plasma virus concentration in chronic hepatitis C infection," *Hepatology*, 42(3):724-31, 2005. Houben-weyl, *Methods of Organic Chemistry*, ed. E. Wansch, Vol. 15 I and II, Thieme, Stuttgart, 1987.
- Houck, Ferrara, Winer, Cachianes, Li, Leung, "The vascular endothelial growth factor family: Identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA," *Mol. Endocrinol.*, 5(12):1806-1814, 1991.
- Huang, Molema, King, Watkins, Edgington, Thorpe, "Tumor infarction in mice by antibody-directed targeting of tissue factor to tumor vasculature," *Science*, 275:547-550, 1997.
- Hurwitz, Fehrenbacher, Novotny, Cartwright, Hainsworth, Heim, Berlin, Baron, Griffing, Holmgren, Ferrara, Fyfe, Rogers, Ross, Kabbinavar, "Bevacizumab plus Irinotecan, Fluorouracil, and Leucovorin for Metastatic Colorectal Cancer", *N. Engl. J. Med.*, 350:2335-2342, 2004.
- Huse, Sastry, Iverson, Kang, Alting-Mees, Burton, Benkovic and Lerner, "Generation of a Large Combinatorial Library of the Immunoglobulin Repertoire in Phage Lambda, *Science*, 246(4935):1275-1281, 1989.
- Hussain, Kotz, Minasian, Premkumar, Sarosy, Reed, Zhai, Steinberg, Raggio, Oliver, Figg, Kohn, "Phase II Trial of Carboxyamidotriazole in Patients With Relapsed Epithelial Ovarian Cancer", *J. Clin. Oncol.*, 21(23):4356-4363, 2003.
- Ingber, Fujita, Kishimoto, Sudo, Kanamaru, Brem, Folkman, "Angiostatin: Synthetic analogues of fumagillin which inhibit angiogenesis and suppress tumor growth," *Nature*, 48:555-557, 1990.
- Inoue, Itoh, Ueda, Naruko, Kojima, Komatsu, Doi, Ogawa, Tamura, Takaya, Igaki, Yamashita, Chun, Masatsugu, Becker, Nakao, "Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in human coronary atherosclerotic lesions: possible pathophysiological significance of VEGF in progression of atherosclerosis", *Circulation*, 98(20):2108-16, 1998.
- Ito, Fukuda, Murata, Kimura, "Transformation of Intact Yeast Cells Treated with Alkali Cations", *J. Bacteriol.*, 153:163-168, 1983.
- Iwamoto, Nomizu, Yamada, Ito, Tanaka, Sugioka, "Inhibition of angiogenesis, tumour growth and experimental metastasis of human fibrosarcoma cells HT1080 by a multimeric form of the laminin sequence Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg (YIGSR)," *Br. J. Cancer*, 73(5):589-595, 1996.
- Jackson, Volpert, Bouck, Linzer, "Stimulation and inhibition of angiogenesis by placental proliferin and proliferin-related protein," *Science*, 266(5190):1581-1584, 1994.

- Jendraschak and Sage, "Regulation of angiogenesis by SPARC and angiostatin: implications for tumor cell biology," *Semin. Cancer Biol.*, 7(3):139-146, 1996.
- Kabat, Wu, Perry, Gottesman, Foeller, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 647-669, 1991.
- Kamphaus, Colorado, Panka, Hopfer, Ramchandran, Torre, Maeshima, Mier, Sukhatme, and Kalluri, "Canstatin, a Novel Matrix-derived Inhibitor of Angiogenesis and Tumor Growth", *J. Biol. Chem.*, 275(2):1209-1215, 2000.
- Kang, Barbas, Janda, Benkovic and Lerner, "Linkage of Recognition and Replication Functions by Assembling Combinatorial Antibody Fab Libraries Along Phage Surfaces", *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 88(10):4363-4366, 1991.
- Kaufman, Murtha, Davies, "Translational Efficiency of Polycistronic Mrnas and Their Utilization to Express Heterologous Genes in Mammalian Cells", *EMBO J.*, 6:187-195, 1987.
- Kaur, Brat, Devi and Van Meir, "Vasculostatin, a proteolytic fragment of Brain Angiogenesis Inhibitor 1, is an antiangiogenic and antitumorigenic factor", *Oncogene*, 24:3632-3642, 2005.
- Keck, Hauser, Krivi, Sanzo, Warren, Feder, Connolly, "Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF," *Science*, 246:1309-1312, 1989.
- Kendall and Thomas, "Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:10705-10709, 1993.
- Kenyon, Browne, D'Amato, "Effects of thalidomide and related metabolites in a mouse corneal model of neovascularization," *Exp. Eye Res.*, 64(6):971-978, 1997.
- Kerbel, Vitoria-Petit, Okada, Rak, "Establishing a link between oncogenes and tumor angiogenesis," *Mol. Med.*, 4(5):286-295, 1998.
- Keyt, Nguyen, Berleau, Duarte, Park, Chen, Ferrara, "Identification of vascular endothelial growth factor determinants for binding KDR and FLT-1 receptors. Generation of receptor-selective VEGF variants by site-directed mutagenesis," *J. Biol. Chem.*, 271(10):5638-46, 1996.
- Kim, Li, Houck, Winer, Ferrara, "The vascular endothelial growth factor proteins: identification of biologically relevant regions by neutralizing monoclonal antibodies," *Growth Factors*, 7:53-64, 1992.
- Kim, Li, Winer, Armanini, Gillett, Phillips, "Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth *in vivo*," *Nature*, 362:841-844, 1993.

- Kim, Kwak, Ahn, So, Liu, Koh, Koh, "Molecular cloning and characterization of a novel angiopoietin family protein, angiopoietin-3", *FEBS Lett.*, 443(3):353-6, 1999.
- Kipriyanov, Kupriyanova, Little, Moldenhauer, "Rapid detection of recombinant antibody fragments directed against cell-surface antigens by flow cytometry", *J. Immunol. Meth.*, 196:51-62, 1996.
- Kipriyanov, Moldenhauer, Little, "High level production of soluble single chain antibodies in small-scale *Escherichia coli* cultures", *J. Immunol. Meth.*, 200:69-77, 1997.
- Kiss, Fisher, Pesavento, Dai, Valero, Ovecka, Nolan, Phipps, Velappan, Chasteen, Martinez, Waldo, Pavlik, Bradbury, "Antibody binding loop insertions as diversity elements", *Nucleic Acids Research*, 34(19):e132, 2006.
- Kleinman, Weeks, Schnaper, Kibbey, Yamamura, Grant, "The laminins: a family of basement membrane glycoproteins important in cell differentiation and tumor metastases", *Vitam. Horm.*, 47:161-186, 1993.
- Kondo, Asano, Suzuki, "Significance of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor for solid tumor growth, and its inhibition by the antibody," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 194(3):1234-1241, 1993.
- Korpelainen and Alitalo, "Signaling angiogenesis and lymphangiogenesis," *Curr. Opin. Cell Biol.*, 10(2):159-164, 1998.
- Kremer, Breier, Risau, Plate, "Up-regulation of flk-1/vascular endothelial growth factor receptor 2 by its ligand in a cerebral slice culture system," *Cancer Res.*, 57:3852-3859, 1997.
- Kroll and Waltenberger, "The vascular endothelial growth factor receptor KDR activates multiple signal transduction pathways in porcine aortic endothelial cells", *J. Biol. Chem.*, 272:32521-7, 1997.
- Kroll and Waltenberger, "VEGF-A induces expression of eNOS and iNOS in endothelial cells via VEGF receptor-2 (KDR)," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 252(3):743-746, 1998.
- Kurjan and Herskowitz, "Structure of a Yeast Pheromone Gene (MF $\alpha$ ): a Putative  $\alpha$ -Factor Precursor Contains Four Tandem Copies of mature  $\alpha$ -Factor", *Cell*, 30:933-943, 1982.
- Kyte and Doolittle, "A simple method for displaying the hydropathic character of a protein," *J. Mol. Biol.*, 157(1):105-132, 1982.
- Lane, Iruela-Arispe, Sage, "Regulation of gene expression by SPARC during angiogenesis *in vitro*. Changes in fibronectin, thrombospondin-1, and plasminogen activator inhibitor-1," *J. Biol. Chem.*, 267(23):16736-16745, 1992.
- Le Gall, Reusch, Little and Kipriyanov, "Effect of Linker Sequences Between the Antibody Variable Domains on the Formation, Stability and Biological Activity of a Bispecific Tandem Diabody", *Protein Engineering, Design & Selection*, 17(4):357-366, 2004.

- Lee, Clapp, Martial, Weiner, "Inhibition of urokinase activity by the antiangiogenic factor 16K prolactin: activation of plasminogen activator inhibitor 1 expression," *Endocrinology*, 139(9):3696-3703, 1998.
- Lewis and Pollard, "Distinct Role of Macrophages in Different Tumor Microenvironments", *Cancer Res.*, 66(2):605-612, 2006.
- Lin, Sankar, Shan, Dewhirst, Polverini, Quinn, Peters, "Inhibition of tumor growth by targeting tumor endothelium using a soluble vascular endothelial growth factor receptor," *Cell Growth Differ.*, 9:49-58, 1998.
- Lin, Buxton, Acheson, Radziejewski, Maisonpierre, Yancopoulos, Channon, Hale, Dewhirst, George, Peters, "Anti-angiogenic gene therapy targeting the endothelium-specific receptor tyrosine kinase Tie2", *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 95(15):8829-34, 1998.
- Lin, Nguyen, Mendoza, Escandon, Fei, Meng, Modi, "Preclinical pharmacokinetics, interspecies scaling, and tissue distribution of a humanized monoclonal antibody against vascular endothelial growth factor", *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 288(1):371-8, 1999.
- Lin, Nguyen, Russell and Pollard, "Colony-Stimulating Factor 1 Promotes Progression of Mammary Tumors to Malignancy", *J. Exp. Med.*, 193(6):727-739, 2001.
- Lin, Li, Gnatovskiy, Deng, Zhu, Grzesik, Qian, Xue and Pollard, "Macrophages Regulate the Angiogenic Switch in a Mouse Model of Breast Cancer", *Cancer Res.*, 66(23):11238-11246, 2006.
- Lindner and Borden, "Effects of tamoxifen and interferon-beta or the combination on tumor-induced angiogenesis," *Int. J. Cancer*, 71(3):456-461, 1997.
- Lingen, Polverini, Bouck, "Retinoic acid and interferon alpha act synergistically as antiangiogenic and antitumor agents against human head and neck squamous cell carcinoma," *Cancer Res.*, 58(23):5551-5558, 1998.
- Lingen, Polverini, Bouck, "Inhibition of squamous cell carcinoma angiogenesis by direct interaction of retinoic acid with endothelial cells," *Lab. Invest.*, 74(2):476-483, 1996.
- Lin-ke, Hong-Qu, Nagy, Eckelhoefer, Masse, Dvorak, Dvorak, "Vascular targeting of solid and ascites tumours with antibodies to vascular endothelial growth factor," *Eur. J. Cancer*, 32A(14):2467-2473, 1996.
- Loupakis, Falcone, Masi, Fioravanti, Kerbel, Del Tacca, Bocci "Vascular Endothelial Growth Factor Levels in Immunodepleted plasma of Cancer Patients As a Possible Pharmacodynamic Marker for Bevacizumab Activity," *J. Clin. Onc*, 1816-1818, 2007.
- Luckow and Summers, "High Level Expression of Nonfused Foreign Genes with Autographa Californica Nuclear Polyhedrosis Virus Expression Vectors", *Virology*, 170:31-39, 1989.

- Luo, Toyoda, Shibuya, "Differential inhibition of fluid accumulation and tumor growth in two mouse ascites tumors by an antivascular endothelial growth factor/permeability factor neutralizing antibody," *Cancer Res.*, 58(12):2594-2600, 1998a.
- Luo, Yamaguchi, Shinkai, Shitara, Shibuya, "Significant expression of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in mouse ascites tumors," *Cancer Res.*, 58(12):2652-2660, 1998b.
- Majewski, Skopinska, Marczak, Szmurlo, Bollag, Jablonska "Vitamin D3 is a potent inhibitor of tumor cell-induced angiogenesis," *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.*, 1(1):97-101, 1996.
- Malecaze, Clamens, Simorre-Pinatel, Mathis, Chollet, Favard, Bayard, Plouet, "Detection of vascular endothelial growth factor messenger RNA and vascular endothelial growth factor-like activity in proliferative diabetic retinopathy," *Arch. Ophthalmol.*, 112:1476-1482, 1994.
- Maisonpierre, Suri, Jones, Bartunkova, Wiegand, Radziejewski, Compton, McClain, Aldrich, Papadopoulos, Daly, Davis, Sato, Yancopoulos, "Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis," *Science*, 277(5322):55-60, 1997. Manetti, Cappello, Botta, Corelli, Mongelli, Biasoli, Borgia, Ciomei, "Synthesis and binding mode of heterocyclic analogues of suramin inhibiting the human basic fibroblast growth factor," *Bioorg. Med. Chem.*, 6(7):947-958, 1998.
- Massey, "Catalytic Antibodies Catching On", *Nature*, 328:457-458, 1987.
- Mazure, Chen, Yeh, Laderoute, Giaccia, "Oncogenic transformation and hypoxia synergistically act to modulate vascular endothelial growth factor expression," *Cancer Res.*, 56:3436-3440, 1996.
- McNamara, Harmey, Walsh, Redmond, Bouchier-Hayes, "Significance of angiogenesis in cancer therapy [published erratum appears in *Br J Surg.*, Oct;85(10):1449, 1998," *Br. J. Surg.*, 85(8):1044-1055, 1998.
- Merrifield, "Solid Phase Peptide Synthesis 1. Synthesis of a Tetrapeptide", *J. Am. Chem. Assoc.*, 85:2149-2154, 1964.
- Mesiano, Ferrara, Jaffe, "Role of vascular endothelial growth factor in ovarian cancer: inhibition of ascites formation by immunoneutralization," *Am. J. Pathol.*, 153(4):1249-1256, 1998.
- Millauer, Longhi, Plate, Shawver, Risau, Ullrich, Strawn, "Dominant-negative inhibition of Flk-1 suppresses the growth of many tumor types *in vivo*," *Cancer Res.*, 56:1615-1620, 1996.
- Mills, Brooker and Camerini-Otero, "Sequences of human immunoglobulin switch regions: implications for recombination and transcription," *Nucl. Acids Res.*, 18:7305-7316, 1990.
- Moore, Arenberg, Addison, Keane, Streiter, "Tumor angiogenesis is regulated by CXC chemokines," *J. Lab. Clin. Med.*, 132(2):97-103, 1998.

- Mordenti, Thomsen, Licko, Chen, Meng, Ferrara, "Efficacy and concentration-response of murine anti-VEGF monoclonal antibody in tumor-bearing mice and extrapolation to humans", *Toxicologic Pathology*, 27(1):14-21, 1999.
- Morrison, Wims, Kobrin and Oi, "Production of novel immunoglobulin molecules by gene transfection," *Mt. Sinai J. Med.*, 53(3):175, 1986.
- Muller, Li, Christinger, Wells, Cunningham, De Vos, "Vascular Endothelial growth factor: Crystal structure and functional mapping of the kinase domain receptor binding site", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 94:7192-7197, 1997.
- Muller, Chen, Christinger, Li, Cunningham, Lowman, de Vos, "VEGF and the Fab fragment of a humanized neutralizing antibody: crystal structure of the complex at 2.4 Å resolution and mutational analysis of the interface," *Structure*, 6(9):1153-67, 1998.
- Mustonen and Alitalo, "Endothelial receptor tyrosine kinases involved in angiogenesis," *J. Cell Biol.*, 129:895-898, 1995.
- Myers and Miller, "Optical Alignments in Linear Space", *CABIOS*, 4:11-17, 1988.
- Nagashima, Yoshino, Aono, Takai, Sasano, "Inhibitory effects of anti-rheumatic drugs on vascular endothelial growth factor in cultured rheumatoid synovial cells", *Clin. Exp. Immunol.*, 116(2):360-5, 1999.
- Nagler, Feferman, Shoshan, "Reduction in basic fibroblast growth factor mediated angiogenesis *in vivo* by linomide," *Connect Tissue Res.*, 37(1-2):61-68, 1998.
- Nakamura Voller and Bidwell, "Enzyme Immunoassays: Heterogeneous and Homogeneous Systems", *In: Handbook of Experimental Immunology*, Vol. 1: Immunochemistry, D.M. Weir (Ed.), Blackwell Scientific Publications, Oxford 1986, Chapter 27.
- Needleman and Wunsch, "A General Method Applicable to the Search For Similarities in the Amino Acid Sequence of Two Proteins", *J. Mol. Biol.*, 48:443, 1970.
- Neuberger and Milstein, "Somatic hypermutation," *Curr. Opin. Immunol.*, 7:248-254, 1995.
- Neufeld, Cohen, Gengrinovitch, Poltorak, "Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors," *FASEB J.*, 13(1):9-22, 1999.
- Nicaise, Valerio-Lepiniec, Minard, Desmadril, "Affinity transfer by CDR grafting on a nonimmunoglobulin scaffold", *Protein Sci.*, 13: 1882-1891, 2004.
- Niida, Kaku, Amano, Yoshida, Kataoka, Nishikawa, Tanne, Maeda, Nishikawa, Kodama, "Vascular endothelial growth factor can substitute for macrophage colony-stimulating factor in the support of osteoclastic bone resorption", *J. Exp. Med.*, 190(2):293-8, 1999.

- Nozaki, Sakurai, Raisler, Baffi, Witta, Ogura, Brekken, Sage, Ambati, Ambati, "Loss of SPARC-mediated VEGFR-1 suppression after injury reveals a novel antiangiogenic activity of VEGF-A", *J. Clin. Invest.*, 116(2):422-9, 2006.
- Oikawa, Hirotani, Nakamura, Shudo, Hiragun, Iwaguchi, "A highly potent antiangiogenic activity of retinoids," *Cancer Lett.*, 48(2):157-162, 1989.
- Olander, Connolly, DeLarco, "Specific binding of vascular permeability factor to endothelial cells," *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 175:68-76, 1991.
- O'Reilly, Holmgren, Shing, Chen, Rosenthal, Moses, Lane, Cao, Sage, Folkman "Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma," *Cell*, 79:315-328, 1994.
- O'Reilly, Boehm, Shing, Fukai, Vasios, Lane, Flynn, Birkhead, Olsen, Folkman "Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth," *Cell*, 88(2):277-285, 1997.
- Palmiter and Brinster, "Transgenic Mice", *Cell*, 41:343-345, 1985.
- Palmiter, Norstedt, Gelinas, Hammer, Brinster, "Metallothionein-Human GH Fusion Genes Stimulate Growth of Mice", *Science*, 222:809-814, 1983.
- Parmley and Smith, "Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes," *Gene*, 73(2):305-318, 1988.
- Pearson and Lipman, "Improved tools for biological sequence analysis", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:2444-2448, 1988.
- Pearson, "Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA", *Methods in Enzymology*, 183:63-98, 1990.
- Pepper, Ferrara, Orci, Montesano, "Leukemia inhibitory factor (LIF) inhibits angiogenesis *in vitro*," *J. Cell Sci.*, 108(1):73-83, 1995.
- Petersen, Wang, Yalcin-Chin, Li, Peyton, Minna, Harran, Wang, "Autocrine TNF $\alpha$  Signaling Renders Human Cancer Cells Susceptible to Smac-Mimetic-Induced Apoptosis", *Cancer Cell*, 12(5):445-456, 2007.
- Petrova, Nykanen, Normen, Ivanov, Andersson, Haglund, Puolakkainen, Wempe, von Melchner, Gradwohl, Vanharanta, Aaltonen, Saharinen, Gentile, Clarke, Taipale, Oliver, Alitalo, "Transcription factor PROX1 induces colon cancer progression by promoting the transition from benign to highly dysplastic phenotype", *Cancer Cell*, 13(5):407-19, 2008.
- Pike, Yao, Jones, Cherney, Appella, Sakaguchi, Nakhasi, Teruya-Feldstein, Wirth, Gupta and Tosato, "Vasostatin, a Calreticulin Fragment, Inhibits Angiogenesis and Suppresses Tumor Growth", *J. Exp. Med.*, 188(12):2349-2356, 1998.

- Pike, Yao, Setsuda, Jones, Cherney, Appella, Sakaguchi, Nakhasi, Atreya, Teruya-Feldstein, Wirth, Gupta and Tosato, "Calreticulin and Calreticulin Fragments Are Endothelial Cell Inhibitors That Suppress Tumor Growth", *Blood*, 94(7):2461-2468, 1999.
- Plate, Breier, Weich, Mennel, Risau, "Vascular endothelial growth factor and glioma angiogenesis: coordinate induction of VEGF receptors, distribution of VEGF protein and possible *in vivo* regulatory mechanisms," *Int. J. Cancer*, 59:520-529, 1994.
- Potgens, Westphal, DeWaal, Ruiter, "The role of vascular permeability factor and basic fibroblast growth factor in tumor angiogenesis," *In: Growth Factors in Tumor Angiogenesis*, Berlin: Walter de Gruyter & Co. pp. 57-70, 1995.
- Presta, Chen, O'Connor, Chisholm, Meng, Krummen, Winkler, Ferrara, "Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders," *Cancer Res.*, 57:4593-4599, 1997.
- Qiu, Wang, Cai, Wang, Yue, "Small antibody mimetics comprising two complementarity-determining regions and a framework region for tumor targeting", *Nature Biotechnology*, 25(8): 921-929, 2007
- Quinn, Thurman, Sundell, Zhang, Hellerqvist, "CM101, a polysaccharide antitumor agent, does not inhibit wound healing in murine models," *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 121(4):253-256, 1995.
- Raychaudhury and D'Amore, "Endothelial cell regulation by transforming growth factor-beta," *J. Cell Biochem.*, 47(3):224-229, 1991.
- Reff and Heard, "A Review of Modifications to Recombinant Antibodies: Attempt to Increase Efficacy in Oncology Applications", *Critical Reviews in Oncology Hematology*, 40:25-35, 2001.
- Reiter, Ulrich Brinkmann, Lee and Pastan, "Engineering Antibody Fv Fragments for Cancer Detection and Therapy: Disulfide-Stabilized Fv Fragments", *Nature Biotechnology*, 14:1239-1245, 1996.
- Richer and Lo, "Introduction of human DNA into mouse eggs by injection of dissected human chromosome fragments", *Science*, 245:175-177, 1989.
- Ryan, Eppler, Hagler, Bruner, Thomford, Hall, Shopp, O'Neill, "Preclinical safety evaluation of rhuMAbVEGF, an antiangiogenic humanized monoclonal antibody", *Toxicologic Pathology*, 27(1):78-86, 1999.
- Sakamoto, Tanaka, Togho, Ogawa, "Heparin plus cortisone acetate inhibit tumor growth by blocking endothelial cell proliferation," *Canc. J.*, 1:55-58, 1986.
- Saleh, Stacker, Wilks, "Inhibition of growth of C6 glioma cells *in vivo* by expression of antisense vascular endothelial growth factor sequence," *Cancer Res.*, 56:393-401, 1996.



- Sambrook, Fritsch and Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- Sang, "Complex role of matrix metalloproteinases in angiogenesis," *Cell Res.*, 8(3):171-177, 1998.
- Schultz, Tanner, Hofmann, Emini, Condra, Jones, Kieff, Ellis, "Expression and Secretion in Yeast of a 400-Kda Envelope Glycoprotein Derived from Epstein-Barr Virus", *Gene*, 54:113-123, 1987.
- Seed, "an LFA-3 Cdna Encodes a Phospholipid-Linked Membrane Protein Homologous to its Receptor CD2", *Nature*, 329:840, 1987.
- Senger, Galli, Dvorak, Perruzzi, Harvey, Dvorak, "Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid," *Science*, 219:983-985, 1983.
- Senger, Perruzzi, Feder, Dvorak, "A highly conserved vascular permeability factor secreted by a variety of human and rodent tumor cell lines," *Cancer Res.*, 46:5629-5632, 1986.
- Senger, Connolly, Vandewater, Feder, Dvorak, "Purification and NH<sub>2</sub>-terminal amino acid sequence of guinea pig tumor secreted vascular permeability factor," *Cancer Res.*, 50:1774-1778, 1990.
- Serafini, P., De Santo, C., Marigo, I., Cingarlini, S., Dolcetti, L., Gallina, G., Zanovello, P. & Bronte, V. (2004). "Derangement of immune responses by myeloid suppressor cells", *Cancer Immunol Immunother*, **53**, 64-72.
- Shalaby, Rossant, Yamaguchi, Gertsenstein, Wu, Breitman, Schuh, "Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice," *Nature*, 376:62-66, 1995.
- Sheibani and Frazier, "Thrombospondin 1 expression in transformed endothelial cells restores a normal phenotype and suppresses their tumorigenesis," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92(15):6788-6792, 1995.
- Sheu, Yen, Kan, "Inhibition of angiogenesis in vitro and in vivo: comparison of the relative activities of triflavin, an Arg-Gly-Asp-containing peptide and anti- $\alpha(v)\beta_3$  integrin monoclonal antibody," *Biochim. Biophys. Acta*, 1336(3):445-454, 1997.
- Shibuya, "Vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1/Flt-1): a dual regulator for angiogenesis", *Angiogenesis*, 9(4):225-30, 2007.
- Shojaei, Wu, Malik, Zhong, Baldwin, Schanz, Fuh, Gerber, Ferrara, "Tumor refractoriness to anti-VEGF treatment is mediated by CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>+</sup> myeloid cells", *Nature Biotechnology*, 25:911-920, 2007.

- Sideras, Mizuta, Kanamori, Suzuki, Okamoto, Kuze, Ohno, Doi, Fukuhara, Hassan, *et al.*, "Production of sterile transcripts of C gamma genes in an IgM-producing human neoplastic B cell line that switches to IgG-producing cells," *Intl. Immunol.*, 1(6):631-642, 1989.
- Siemeister, Martiny-Baron, Marme, "The pivotal role of VEGF in tumor angiogenesis: molecular facts and therapeutic opportunities," *Cancer Metastasis Rev.*, 17(2):241-248., 1998.
- Sinkar, White, Gordon, "Molecular Biology of Ri-Plasmid a Review", *J. Biosci (Bangalore)*, 11:47-58, 1987.
- Sioussat, Dvorak, Brock, Senger, "Inhibition of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) with antipeptide antibodies," *Arch. Biochem. Biophys.*, 301:15-20, 1993.
- Sipos, Tamargo, Weingart, Brem, "Inhibition of tumor angiogenesis," *Ann. NY Acad. Sci.*, 732:263-272, 1994.
- Smith and Waterman, "Comparison of Biosequences", *Adv. Appl. Math.*, 2:482, 1981.
- Smith, Summers, Fraser, "Production of Human Beta Interferon in Insect Cells Infected With Baculovirus Expression Vector", *Mol. Cell Biol.*, 3:2156-2165, 1983.
- Soff, Sanderowitz, Gately, Verrusio, Weiss, Brem, Kwaan, "Expression of plasminogen activator inhibitor type 1 by human prostate carcinoma cells inhibits primary tumor growth, tumor-associated angiogenesis, and metastasis to lung and liver in an athymic mouse model," *J. Clin. Invest.*, 96(6):2593-2600, 1995.
- Soker, Takashima, Miao, Neufeld, Klagsbrun., "Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform- specific receptor for vascular endothelial growth factor," *Cell*, 92(6):735-745, 1998.
- Springer, Chen, Kraft, Bednarski, Blau, "VEGF gene delivery to muscle: potential role for vasculogenesis in adults," *Mol. Cell*, 2(5):549-558, 1998.
- Stella and Himmelstein, "Prodrugs: A chemical approach to targeted drug delivery ", *Directed Drug Delivery*, Borchardt *et al.*, Eds. Human Press, 1985, pp 247-267.
- Sweetwyne, Brekken, Workman, Bradshaw, Carbon, Siadak, Murri and Sage, "Functional Analysis of the Matricellular Protein SPARC with Novel Monoclonal Antibodies", *J. Histochem. Cytochem.*, 52(6):723-733, 2004.
- Tada, Fukunaga, Wakabayashi, Masumi, Sato, Izumi, Kohno, Kuwano, "Inhibition of tubular morphogenesis in human microvascular endothelial cells by co-culture with chondrocytes and involvement of transforming growth factor beta: a model for avascularity in human cartilage," *Biochim. Biophys. Acta*, 1201(2):135-142, 1994.
- Takano, Gately, Neville, Herblin, Gross, Engelhard, Perricone, Eidsvoog, Brem, "Suramin, an anticancer and angiosuppressive agent, inhibits endothelial cell binding of basic fibroblast

- growth factor, migration, proliferation, and induction of urokinase-type plasminogen activator," *Cancer Res.*, 54(10):2654-2660, 1994.
- Tanaka, Manome, Wen, Kufe, Fine, "Viral vector-mediated transduction of a modified platelet factor 4 cDNA inhibits angiogenesis and tumor growth," *Nat. Med.*, 3(4):437-442, 1997.
- Terman, Dougher-Vermazen, Carrion, Dimitrov, Armellino, Gospodarowicz, Bohlen, "Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor," *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 187:1579-1586, 1992.
- Terman, Khandke, Dougher-Vermazan, Maglione, Lassam, Gospodarowicz, Persico, Bohlen, Eisinger, "VEGF receptor subtypes KDR and FLT1 show different sensitivities to heparin and placenta growth factor," *Growth Factors*, 11(3):187-195, 1994.
- Thomas, "Vascular endothelial growth factor, a potent and selective angiogenic agent," *J. Biol. Chem.*, 271:603-606, 1996.
- Thompson, Higgins, Gibson, "CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice", *Nucleic Acids Res.*, 22:4673-4680, 1994.
- Thorpe, Derbyshire, Andrade, Press, Knowles, King, Watson, Yang, Rao-Bette, "Heparin-Steroid Conjugates: New Angiogenesis Inhibitors with Antitumor Activity in Mice," *Cancer Res.*, 53:3000-3007, 1993.
- Tischer, Mitchell, Hartman, Silva, Gospodarowicz, Fiddes, Abraham, "The human gene for vascular endothelial growth factor," *J. Biol. Chem.*, 266:11947-11954, 1991.
- Tolsma, Volpert, Good, Frazier, Polverini, Bouck, "Peptides derived from two separate domains of the matrix protein thrombospondin-1 have anti-angiogenic activity," *J. Cell Biol.*, 122(2):497-511, 1993.
- Tryggvason, "The laminin family," *Curr. Opin. Cell Biol.*, 5(5):877-882, 1993.
- Valenzuela, Griffiths, Rojas, Aldrich, Jones, Zhou, McClain, Copeland, Gilbert, Jenkins, Huang, Papadopoulos, Maisonpierre, Davis, Yancopoulos, "Angiopoietins 3 and 4: diverging gene counterparts in mice and humans", *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 96(5):1904-9, 1999.
- van den Beucken, Neer, Sablon, Desmet, Celis, Hoogenboom, Hufton, "Building novel binding ligands to B7.1 and B7.2 based on human antibody single variable light chain domains", *J. Mol. Biol.*, 310:591-601, 2001.
- van dijk, Warnaar, van Eendenburg, Thienpont, Braakman, Boot, Fleuren and Bolhuis, "Induction of tumor-cell lysis by bi-specific monoclonal antibodies recognizing renal-cell carcinoma and CD3 antigen," *Int. J. Cancer*, 43:344-349, 1989.
- Varfolomeev, Blankenship, Wayson, Fedorova, Kayagaki, Garg, Zobel, Dynek, Elliott, Wallweber, Flygare, Fairbrother, Deshayes, Dixit, Vucic, "IAP Antagonists Induce

- Autoubiquitination of c-IAPs, NF- $\kappa$ B Activation, and TNF $\alpha$ -Dependent Apoptosis", *Cell*, 131(4):669-681, 2007.
- Vince, Wong, Khan, Feltham, Chau, Ahmed, Benetatos, Chunduru, Condon, McKinlay, Brink, Leverkus, Tergaonkar, Schneider, Callus, Koentgen, Vaux, Silke, "IAP Antagonists Target cIAP1 to Induce TNF $\alpha$ -Dependent Apoptosis", *Cell*, 131(4):682-693, 2007.
- Volpert, Lawler, Bouck, "A human fibrosarcoma inhibits systemic angiogenesis and the growth of experimental metastases via thrombospondin-1," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(11):6343-6348, 1998.
- Vukanovic, Passaniti, Hirata, Traystman, Hartley-Asp, Isaacs, "Antiangiogenic effects of the quinoline-3-carboxamide linomide," *Cancer Res.*, 53(8):1833-1837, 1993.
- Wagner, Milstein, Neuberger, "Codon bias targets mutation," *Nature*, 376:732, 1995.
- Waltenberger, Claesson-Welsh, Siegbahn, Shibuya, Heldin, "Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor," *J. Biol. Chem.*, 269(43):26988-26995, 1994.
- Waltenberger, Mayr, Pentz, Hombach, "Functional upregulation of the vascular endothelial growth factor receptor KDR by hypoxia," *Circulation*, 94:1647-1654, 1996.
- Waltenberger, Mayr, Frank, Hombach, "Suramin is a potent inhibitor of vascular endothelial growth factor. A contribution to the molecular basis of its antiangiogenic action," *J. Mol. Cell Cardiol.*, 28(7):1523-1529, 1996.
- Wamil, Thurman, Sundell, DeVore, Wakefield, Johnson, Wang, Hellerqvist, "Soluble E-selectin in cancer patients as a marker of the therapeutic efficacy of CM101, a tumor-inhibiting anti-neovascularization agent, evaluated in phase I clinical trial," *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 123(3):173-179, 1997.
- Ward, Güssow, Griffiths, Jones, Winter, "Binding Activities of a Repertoire of Single Immunoglobulin Variable Domains Secreted from *Escherichia Coli*", *Nature*, 341(6242):544-546, 1989.
- Wells, "Starving cancer into submission", *Chem. Biol.*, 5(4):R87-88, 1998.
- Whitehurst, Flister, Bagaitkar, Volk, Bivens, Pickett, Castro-Rivera, Brekken, Gerard, Ran, "Anti-VEGF-A therapy reduces lymphatic vessel density and expression of VEGFR-3 in an orthotopic breast tumor model", *Int. J. Cancer*, 121(10):2181-91, 2007.
- Wiesmann, Fuh, Christinger, Eigenbrot, Wells, de Vos, "Crystal structure at 1.7 Å resolution of VEGF in complex with domain 2 of the Flt-1 receptor," *Cell*, 91(5):695-704, 1997.
- Willman *et al.*, "Prodrugs in cancer therapy", *Biochem. Soc. Trans.*, 14:375-382, 1988.
- Winter and Milstein, "Man-made antibodies," *Nature*, 349:293-299, 1991.

- Wolff, Guerin, Laterra, Bressler, Indurti, Brem, Goldstein, "Dexamethasone inhibits glioma-induced formation of capillary like structures *in vitro* and angiogenesis *in vivo*," *Klin. Padiatr.*, 209(4):275-277, 1997.
- Wyckoff, Wang, Lin, Wang, Pixley, Stanley, Graf, Pollard, Segall and Condeelis, "A Paracrine Loop Between Tumor Cells and Macrophages is Required for Tumor Cell Migration in Mammary Tumors", *Cancer Res.*, 64:7022-7029, 2004.
- Xie, Chen, Fu, Harter, Young, Sunkara, Novak, Villanueva-Siles, Ratech, "Podoplanin (d2-40): a new immunohistochemical marker for reactive follicular dendritic cells and follicular dendritic cell sarcomas", *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, 1(3):276-84, 2008.
- Yoon, Yoo, Choi, Do, Kang, Lee, Azuma, Kim, "Inhibitory effect of Korean mistletoe (*Viscum album coloratum*) extract on tumour angiogenesis and metastasis of haematogenous and non- haematogenous tumour cells in mice," *Cancer Lett*, 97(1):83-91, 1995.
- Yoshida, Kaneko, Tsukamoto, Han, Ichinose, Kimura, "Suppression of hepatoma growth and angiogenesis by a fumagillin derivative TNP470: possible involvement of nitric oxide synthase," *Cancer Res.*, 58(16):3751-3756, 1998.
- Young, MacKenzie, Narang, Oomen and Baenziger, "Thermal Stabilization of a Single-Chain Fv Antibody Fragment by Introduction of a Disulphide Bond", *FEBS Letters*, 16396(377):135-139, 1995.
- Yamamura, Kibbey, Jun, Kleinman, "Effect of Matrigel and laminin peptide YIGSR on tumor growth and metastasis," *Semin. Cancer Biol.*, 4(4):259-265, 1993.
- Zachary, "Vascular endothelial growth factor: how it transmits its signal," *Exp. Nephrol.*, 6(6):480-487, 1998.
- Zambryski, Herrera-Estreila, DeBlock, Van Montagu, Schell "Genetic Engineering, Principles and Methods", *Hollaender and Setlow (eds.)*, Vol. VI, pp. 253-278, Plenum Press, New York, 1984.
- Zapata, Ridgway, Mordenti, Osaka, Wong, Bennett, Carter, "Engineering Linear F(Ab')<sub>2</sub> Fragments For Efficient Production in *Escherichia Coli* and Enhanced Antiproliferative Activity", *Protein Eng.*, 8(10):1057-1062, 1995.
- Zhang, Gildersleeve, Yang, Xu, Loo, Uryu, Wong, Schultz, "A New Strategy for the Synthesis of Glycoproteins", *Science*, 303(5656): 371-373, 2004.
- Ziche, Donnini, Morbidelli, Parenti, Gasparini, Ledda, "Linomide blocks angiogenesis by breast carcinoma vascular endothelial growth factor transfectants," *Br. J. Cancer*, 77(7):1123-1129, 1998.
- Zou, Anisowicz, Hendrix, Thor, Neveu, Sheng, Rafidi, Seftor, Sager, "Maspin, a serpin with tumor-suppressing activity in human mammary epithelial cells", *Science*, 28:263(5146):526-9, 1994.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Изолированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с VEGF и которое включает по меньшей мере одну переменную область тяжелой цепи (VH), которая включает три гиперпеременных участка (CDR), и по меньшей мере одну переменную область легкой цепи (VL), которая включает три гиперпеременных участка (CDR),  
в котором указанная переменная область легкой цепи включает:
  - (a) CDR1 VL, который имеет последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 8, или последовательность, по существу, гомологичную ей,
  - (b) CDR2 VL, который имеет последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 9, или последовательность, по существу, гомологичную ей, и
  - (c) CDR3 VL, который имеет последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 10, или последовательность, по существу, гомологичную ей,  
и указанная переменная область тяжелой цепи включает:
    - (a) CDR1 VH, который имеет последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 5, или последовательность, по существу, гомологичную ей,
    - (b) CDR2 VH, который имеет последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 6, или последовательность, по существу, гомологичную ей, и
    - (c) CDR3 VH, который имеет последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 7, или по-

следовательность, по существу, гомологичную ей,

при этом указанная, по существу, гомологичная последовательность представляет собой последовательность, включающую 1, 2 или 3 консервативные замены аминокислот по сравнению с данной последовательностью гипервариабельного участка.

2. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, отличающееся тем, что указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит гипервариабельный участок CDR1 вариабельной области легкой цепи (VL), который имеет последовательность SEQ ID NO: 8, VL CDR2, который имеет последовательность SEQ ID NO: 9, VL CDR3, который имеет последовательность SEQ ID NO: 10, гипервариабельный участок CDR1 вариабельной области тяжелой цепи (VH), который имеет последовательность SEQ ID NO: 5, VH CDR2, который имеет последовательность SEQ ID NO: 6, VH CDR3, который имеет последовательность SEQ ID NO: 7.

3. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1 или 2, отличающееся тем, что указанная вариабельная область легкой цепи имеет последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 4, или последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности с указанной последовательностью.

4. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-3, отличающееся тем, что указанная вариабельная область тяжелой цепи имеет последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 3, или последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности с указанной последовательностью.

5. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.3 или 4, отличающееся тем, что указанная вариабельная область легкой цепи имеет последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 4, и указанная вариабельная область тяжелой цепи имеет последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 3.

6. Антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-4, отличающийся тем, что указанный антигенсвязывающий фрагмент имеет последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 21, или последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности с указанной последовательностью.

7. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-6, отличающееся тем, что указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой полностью человеческое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

8. Антитело по любому из пп.1-5 или 7, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой полноразмерное антитело, включающее константную область антителя.

9. Антитело по п.8, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой IgG антитело.

10. Антитело по п.8 или 9, отличающееся тем, что указанное антитело включает тяжелую цепь, которая имеет последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 24, или последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности с указанной последовательностью, и легкую цепь, которая имеет последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 25, или последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности с указанной последовательностью.

11. Антитело по п.10, отличающееся тем, что указанное антитело включает тяжелую цепь, которая имеет последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 24, и легкую цепь, которая имеет последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 25.

12. Антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-7, отличающийся тем, что указанный антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, scFv, Fv, dsFv, ds-scFv, димер TandAb, линейное антитело, миниантитело, диабоди или биспецифичный фрагмент антителя.

13. Антитело по любому из пп.1-5 или 8, отличающееся тем, что указанное антитело проявляет аффинность связывания с VEGF, которая соответствует K<sub>d</sub>, равной менее чем 10 нМ, когда указанное антитело представляет собой IgG.

14. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-13, которое связывается, по меньшей мере, с VEGF человека и VEGF мыши.

15. Иммуноконъюгат, включающий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-14, присоединенное к терапевтическому или диагностическому агенту.

16. Иммуноконъюгат по п.15, отличающийся тем, что указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент присоединены к радиотерапевтическому агенту, химиотерапевтическому агенту, антиангиогенному агенту, индуцирующему апоптоз агенту, антитубулиновому лекарственному препарату, цитостатическому или цитотоксическому агенту, стероиду, цитокину, хемокину или коагулянту.

17. Иммуноконъюгат по п.15, отличающийся тем, что указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент присоединены к

- (a) радиоактивному изотопу мышьяка;
- (b) таксолу, доцетакселу, паклитакселу, цисплатину, гемцитабину, комбретастатину, доксорубицину или адриамицину;
- (c) ризину, гелонину, абрину, дифтерийному токсину *pseudomonas* или коклюшному токсину;
- (d) ингибитору АТФазы типа V;
- (e) IL-2, IL-12, TNF-α, интерферону или LEC или

(f) усеченному тканевому фактору.

18. Фармацевтическая композиция, включающая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из пп.1-14 или иммуноконъюгат по любому из пп.15-17 в эффективном количестве и один или более эксципиентов, носителей, растворителей, буферов или стабилизаторов.

19. Композиция по п.18, где указанная композиция дополнительно включает терапевтический агент, выбранный из группы, включающей радиотерапевтический агент, химиотерапевтический агент, антиангиогенный агент, индуцирующий апоптоз агент, антитубулиновый лекарственный препарат, цитостатический или цитотоксический агент, стероид, цитокин, хемокин или коагулянт.

20. Композиция по п.19, отличающаяся тем, что указанный терапевтический агент является химиотерапевтическим агентом.

21. Композиция по п.20, отличающаяся тем, что указанный терапевтический агент выбран из группы, состоящей из аналогов пиримидина, координационных комплексов платины, камптотецинов, ингибиторов тирозинкиназ и ингибиторов рецепторных тирозинкиназ.

22. Композиция по п.21, отличающаяся тем, что указанный терапевтический агент представляет собой фторурацил, капецитабин, оксалиплатин, цисплатин, карбоплатин, иринотекан, акситиниб, сунитиниб или паклитаксел.

23. Молекула нуклеиновой кислоты, включающая последовательность нуклеотидов, кодирующую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-14.

24. Молекула нуклеиновой кислоты по п.23, отличающаяся тем, что указанная последовательность нуклеотидов кодирует антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое имеет последовательность аминокислот scFv, указанную в SEQ ID NO: 21, или последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности с указанной последовательностью.

25. Молекула нуклеиновой кислоты по п.24, отличающаяся тем, что указанная последовательность нуклеотидов представлена в SEQ ID NO: 20.

26. Молекула нуклеиновой кислоты по п.23, отличающаяся тем, что указанная последовательность нуклеотидов кодирует антитело, включающее тяжелую цепь, которая имеет последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 24, или последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности с указанной последовательностью, и легкую цепь, которая имеет последовательность аминокислот, указанную в SEQ ID NO: 25, или последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности с указанной последовательностью.

27. Молекула нуклеиновой кислоты по п.26, отличающаяся тем, что указанная последовательность нуклеотидов, кодирующая SEQ ID NO: 24, представлена в SEQ ID NO: 22, и отличающаяся тем, что указанная последовательность нуклеотидов, кодирующая SEQ ID NO: 25, представлена в SEQ ID NO: 23.

28. Вектор экспрессии, включающий молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп.23-27.

29. Клетка-хозяин для получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-14, включающая молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп.23-27 или вектор экспрессии по п.28.

30. Вирусная частица, включающая молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп.23-27 или вектор экспрессии по п.28.

31. Набор для лечения заболевания, связанного с ангиогенезом или лимфоангиогенезом, включающий, по меньшей мере, в первом контейнере:

(a) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-14;

(b) иммуноконъюгат по любому из пп.15-17;

(c) фармацевтическую композицию по любому из пп.18-22;

при этом указанный набор также содержит инструкцию по применению компонентов набора.

32. Набор для применения в визуализации или диагностике заболевания, связанного с ангиогенезом или лимфоангиогенезом, включающий, по меньшей мере, в первом контейнере:

(a) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-14;

(b) иммуноконъюгат по любому из пп.15-17;

(c) фармацевтическую композицию по любому из пп.18-22;

при этом указанный набор также содержит инструкцию по применению компонентов набора.

33. Способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-14, включающий:

(a) культивирование клетки-хозяина, которая включает вектор экспрессии по п.28, при условиях, эффективных для экспрессии кодируемого антитела; и

(b) выделение экспрессированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из указанной клетки-хозяина.

34. Способ обнаружения VEGF в образце, включающий приведение во взаимодействие образца, тестируемого на наличие VEGF, с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп.1-14 или иммуноконъюгатом по любому из пп.15-17 при условиях, эффективных для образования комплексов VEGF/антитело или VEGF/антигенсвязывающий фрагмент, причем обнаружение комплексов, полученных таким образом, свидетельствует о наличии VEGF в указанном образце.

35. Способ диагностики заболевания, связанного с ангиогенезом или лимфоангиогенезом, у животного, включающий:

(а) приведение во взаимодействие *in vitro* тестируемого образца, полученного от указанного животного, с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп.1-14 или иммуноконъюгатом по любому из пп.15-17 при условиях, эффективных для обеспечения образования комплексов VEGF/антитело или VEGF/антигенсвязывающий фрагмент;

(b) обнаружение комплексов VEGF/антитело или VEGF/антигенсвязывающий фрагмент, полученных таким образом, и определение количества VEGF в указанном тестируемом образце и

(с) сравнение количества VEGF в указанном тестируемом образце с количеством VEGF в соответствующем контрольном образце, при этом повышенное количество VEGF в указанном тестируемом образце по сравнению с количеством VEGF в указанном контрольном образце свидетельствует о наличии заболевания, связанного с ангиогенезом или лимфоангиогенезом.

36. Способ по п.35, отличающийся тем, что указанное заболевание, связанное с ангиогенезом или лимфоангиогенезом, представляет собой рак, офтальмологическое неоваскулярное заболевание, дистрофию желтого пятна, возрастную дистрофию желтого пятна, артрит, ревматоидный артрит, атеросклероз, диабетическую ретинопатию, гиперплазию щитовидной железы, болезнь Грейвса, гемангиому, неоваскулярную глаукому или псориаз.

37. Способ ингибирования ангиогенеза или лимфоангиогенеза, включающий введение терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-14 или иммуноконъюгата по любому из пп.15-17 животному.

38. Способ по п.37, отличающийся тем, что указанное животное страдает от рака или офтальмологического неоваскулярного заболевания.

39. Способ по п.37 или 38, отличающийся тем, что указанное животное представляет собой человека.

40. Способ лечения заболевания, связанного с ангиогенезом, включающий введение животному, страдающему от указанного заболевания, терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-14 или иммуноконъюгата по любому из пп.15-17.

41. Способ по п.40, отличающийся тем, что указанное заболевание представляет собой офтальмологическое неоваскулярное заболевание, дистрофию желтого пятна, возрастную дистрофию желтого пятна, артрит, ревматоидный артрит, атеросклероз, диабетическую ретинопатию, гиперплазию щитовидной железы, болезнь Грейвса, гемангиому, неоваскулярную глаукому или псориаз.

42. Способ по п.40, отличающийся тем, что указанное заболевание представляет собой рак.

43. Способ по любому из пп.40-42, дополнительно включающий введение второго терапевтического агента, выбранного из группы, включающей радиотерапевтический агент, химиотерапевтический агент, антиангиогенный агент, индуцирующий апоптоз агент, антитубулиновый лекарственный препарат, цитостатический или цитотоксический агент, стероид, цитокин, хемокин или коагулянт, указанному животному.

44. Способ по п.43, отличающийся тем, что указанный второй терапевтический агент определен в любом из пп.20-22.

45. Способ по любому из пп.40-44, отличающийся тем, что указанное животное представляет собой человека.

46. Способ лечения заболевания, связанного с лимфоангиогенезом, включающий введение животному, страдающему от указанного заболевания, терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-14 или иммуноконъюгата по любому из пп.15-17.

47. Способ по п.46, отличающийся тем, что указанное заболевание представляет собой рак.

48. Способ по п.46 или 47, отличающийся тем, что указанное животное представляет собой человека.

49. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-14 в производстве лекарственного средства для лечения заболевания, связанного с ангиогенезом или лимфоангиогенезом.

50. Применение иммуноконъюгата по любому из пп.15-17 в производстве лекарственного средства для лечения заболевания, связанного с ангиогенезом или лимфоангиогенезом.

51. Применение по любому из пп.49, 50, отличающееся тем, что указанное заболевание выбрано из группы, состоящей из рака, офтальмологического неоваскулярного заболевания, дистрофии желтого пятна, возрастной дистрофии желтого пятна, артрита, ревматоидного артрита, атеросклероза, диабетической ретинопатии, гиперплазии щитовидной железы, болезни Грейвса, гемангиомы, неоваскулярной глаукомы и псориаза.

52. Применение по любому из пп.49-51, где лекарственное средство дополнительно включает второй терапевтический агент, выбранный из группы, включающей радиотерапевтический агент, химиотерапевтический агент, антиангиогенный агент, индуцирующий апоптоз агент, антитубулиновый лекарственный препарат, цитостатический или цитотоксический агент, стероид, цитокин, хемокин или коагу-



лянт.

53. Применение по п.52, отличающееся тем, что указанный второй терапевтический агент определен в любом из пп.20-22.

54. Применение по любому из пп.49-52, отличающееся тем, что указанное лечение осуществляют в отношении человека.

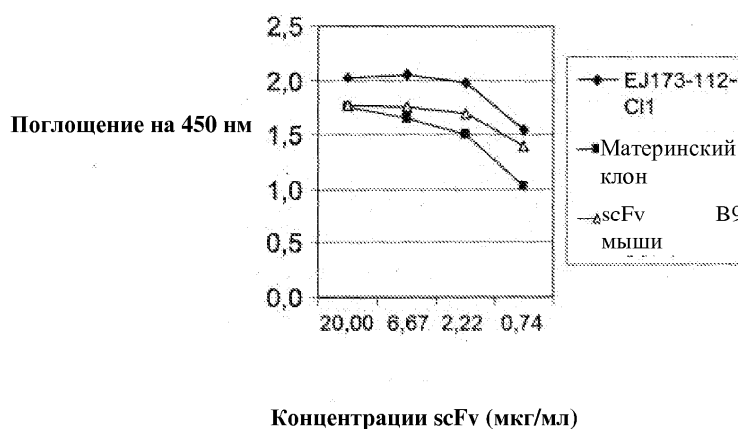
#### Последовательность нуклеотидов

CCATGGCCCAAGGTGCAGCTGGTSCAATCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGG  
 NcoI | ---Начало VH (SEQ ID No.20 Start)  
 CCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGCAGCTATGCTATCAG  
 CTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGTTTGTATCCTGAA  
 GATGGTGAACAATCTACGCACAGAGTTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCGAGGACA  
 CATCTACAGACACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGT  
 GTATTACTGTGCAACAGGACGTTCTATGGTTCGGGGAGTCATTATACCTTTTAACGGT  
 ATGGACGCTCTGGGGCCAAGGGACACGGTCACCGTCTCCTCAAGCTTTCAGGGAGTCT  
 Конеч VH -----|---HindIII---Начало линкера  
 CATCCGCCCCAAACTTGAAGAAGGTGAATTTTCAGAAAGCAGCGGTAGACATCCGGAT  
 Конеч линкера -----MluI-----Начало VL  
 GACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC  
 CGGGCAAGTCAAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAG  
 CCCCTAAGCTCCTGATCTATGTGTCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTT  
 CAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAA  
 GATTTTGAACCTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTACCCCGCTCACTTTCCGGCGAG  
 GGACCAAGGTGGAGATCAAAAGCGGGCCC (SEQ ID No. 30)  
 (SEQ ID No.20 End) Конеч ----| NcoI  
 VL

#### Последовательность аминокислот

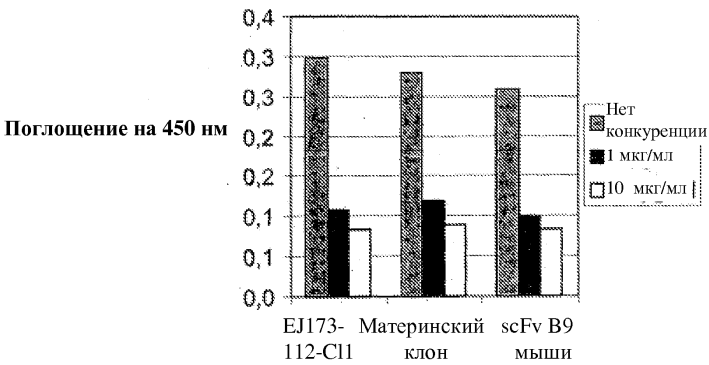
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGCTFSSYAIEWVRQAPGQGLEWMGGFDPEDCET  
 | ---Начало VH (SEQ ID No 21 Start)  
 IYAQKFGGRVTMTEDTSTDTAYMELSSLSBEDTAVYYCATGRSMVRGVIIIPFNGMDVW  
 GQGTITVTVSSKLSGASAPKLEGEFSEARVDIRMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQ  
 Конеч VH -----|---Линкер-----Линкер-----|---Начало VL  
 SISSYLHWYQQKPKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAT  
 YVCQQSYSTFLTFGGGTKEIK  
 (SEQ ID No 21 End) Конеч VL--|

Фиг. 1

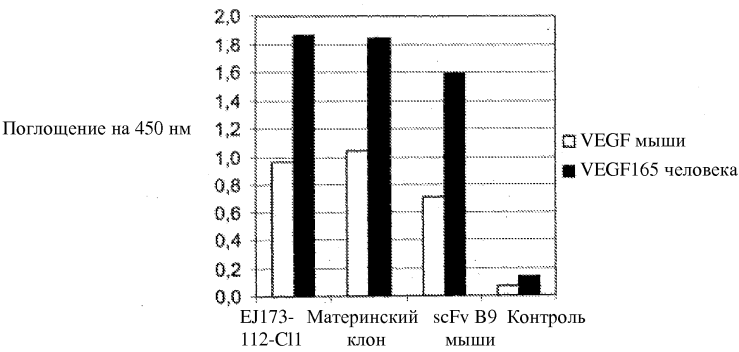


Фиг. 2

Конкурентный анализ с антителом 2C3

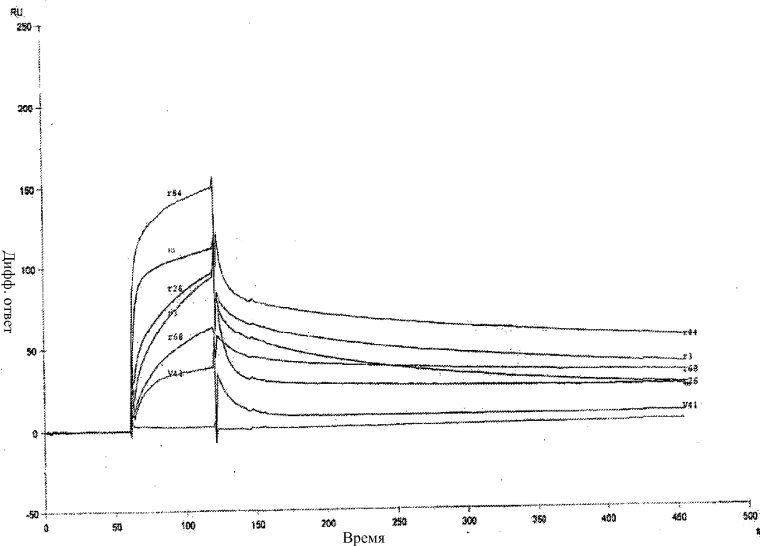


Фиг. 3

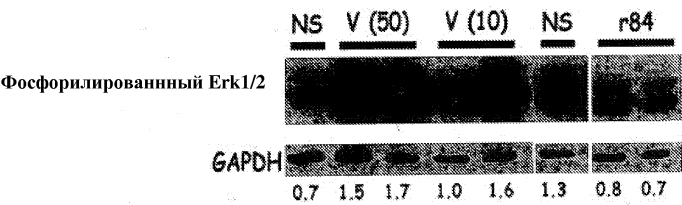


scFv против VEGF мыши по сравнению с VEGF человека

Фиг. 4

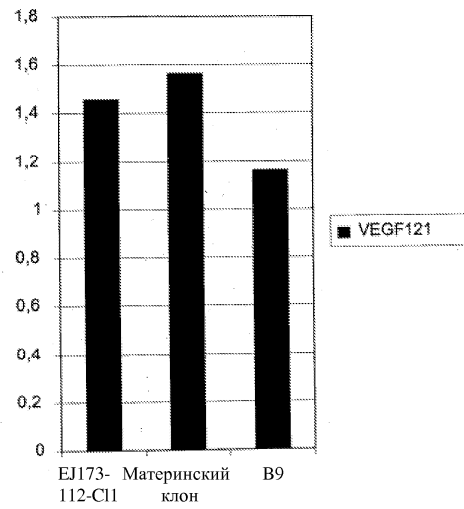


Фиг. 5



Фиг. 6

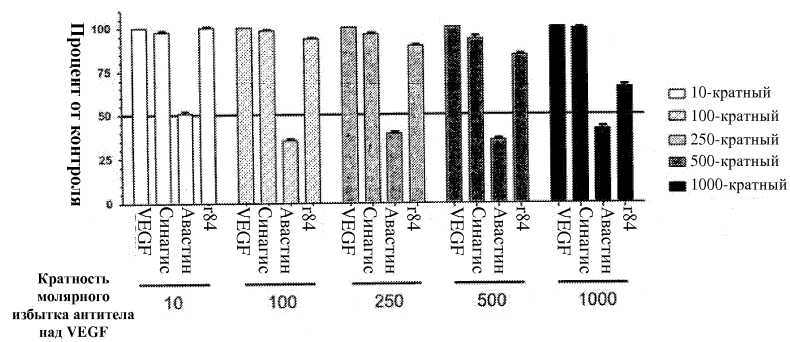
Поглощение  
на 450 нм



scFv против изоформы 121 VEGF

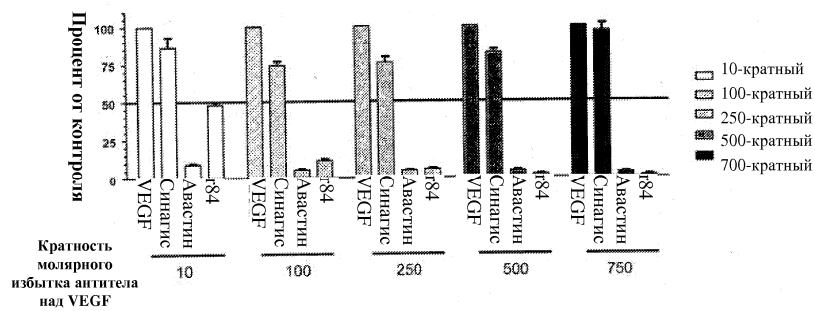
Фиг. 7

r84 не блокирует связывание VEGF с VEGFR1

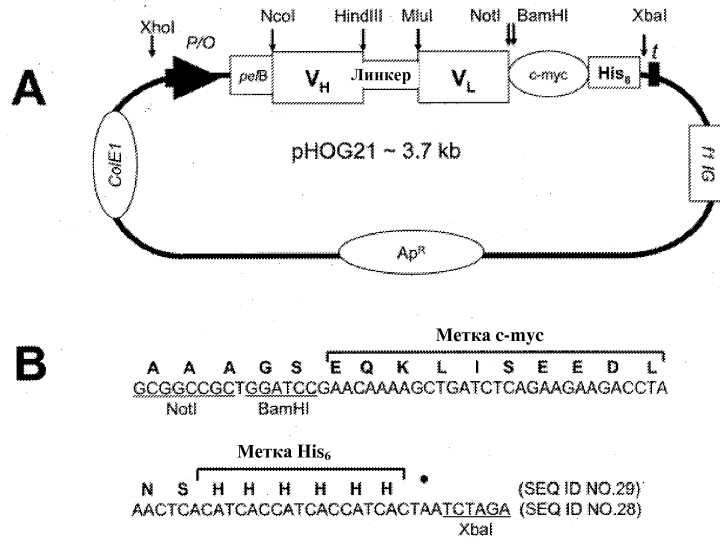


Фиг. 8A

Кратность молярного избытка антитела над VEGF

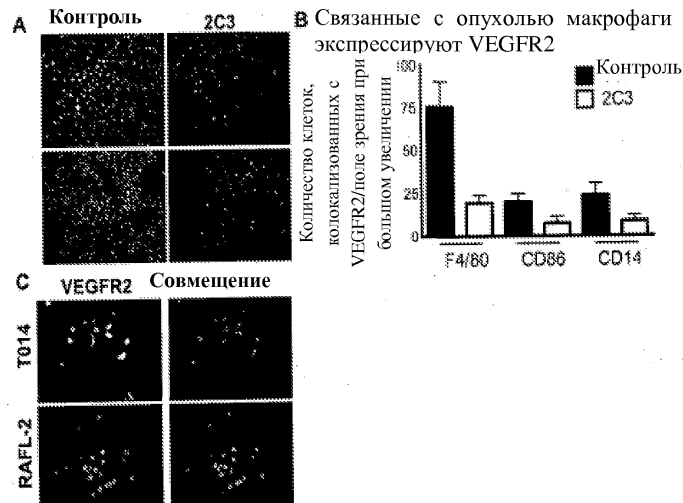


Фиг. 8B



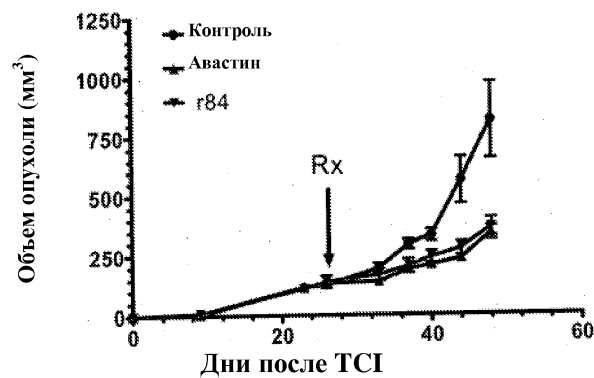
Фиг. 9

### Макрофаги экспрессируют VEGFR2



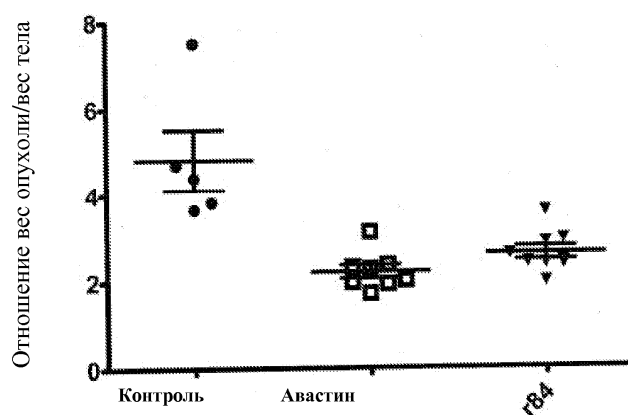
Фиг. 10

### Ингибирование роста MDA-MB-231



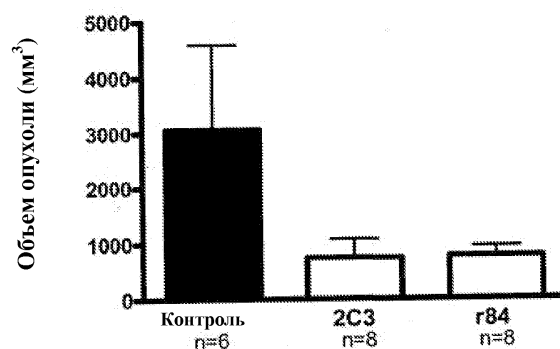
Фиг. 11

## Ингибирование MDA-231



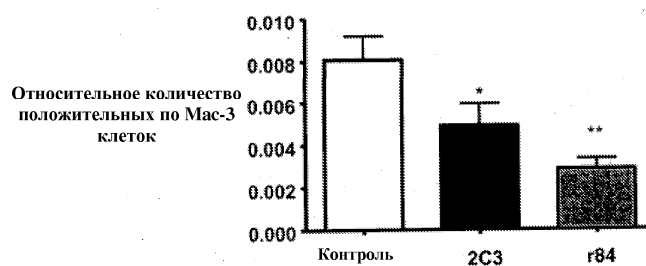
Фиг. 12

## 4 Mc A673 подкожно



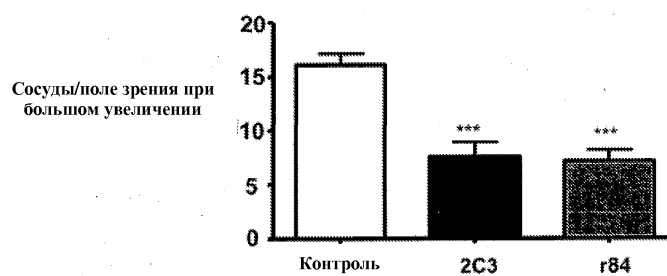
Фиг. 13

## r84 уменьшает инфильтрацию макрофагов в опухоли MDA-MB-231

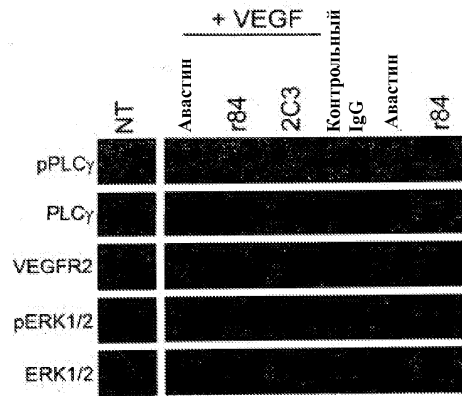


Фиг. 14

## r84 уменьшает плотность микрососудов в опухолях MDA-MB-231



Фиг. 15



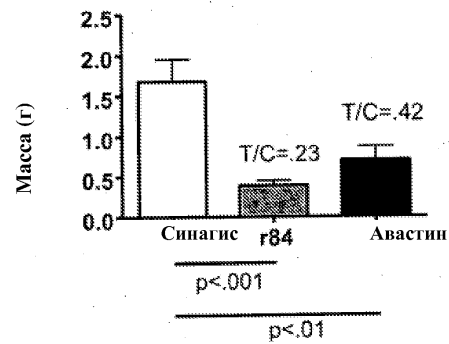
Фиг. 16А

|          |         |   |   |   |   |
|----------|---------|---|---|---|---|
| 50 нг/мл | VEGF    | - | + | + | + |
|          | r84     | - | - | - | + |
|          | Авастин | - | - | + | - |



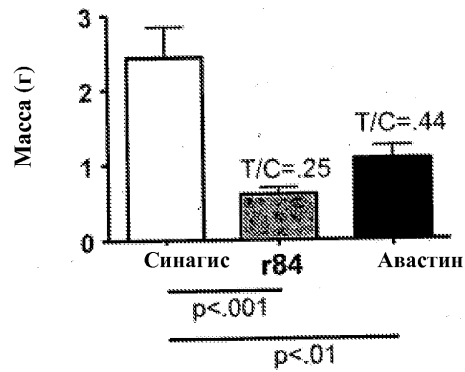
Фиг. 16В

Масса опухолей H460

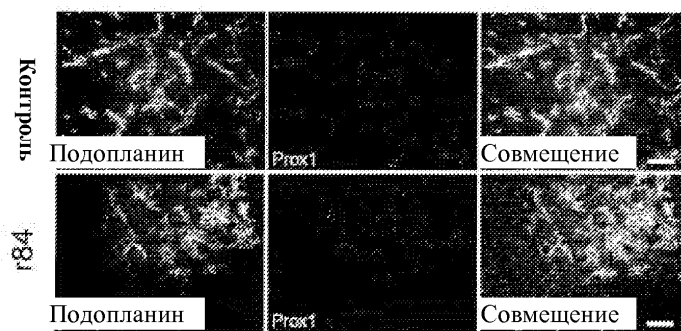
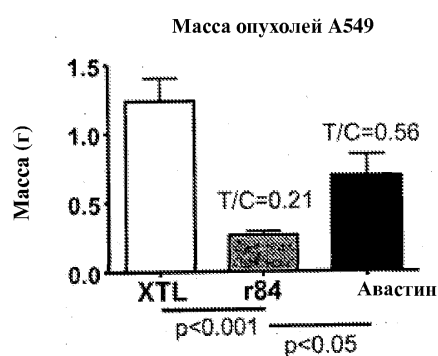
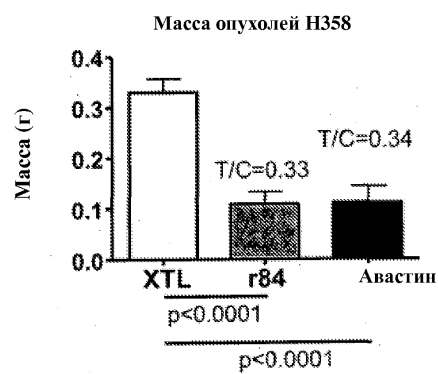


Фиг. 17А

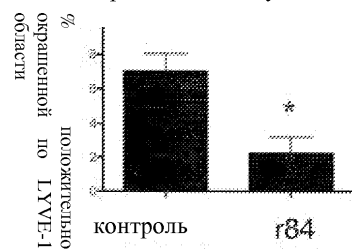
Масса опухолей H1299



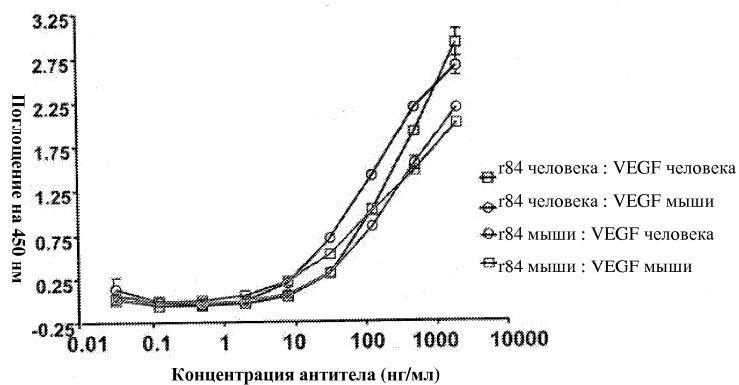
Фиг. 17В



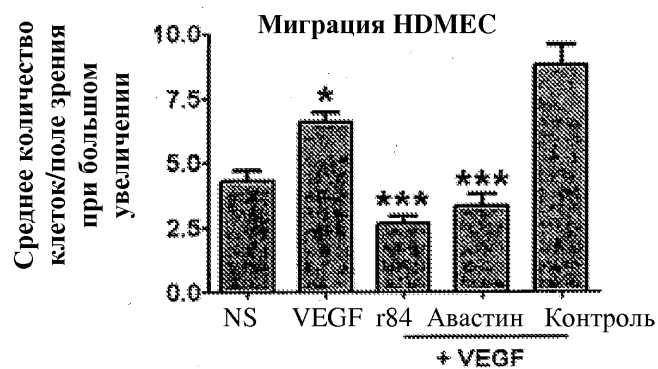
Плотность лимфатических сосудов в опухолях MDA-MB-231



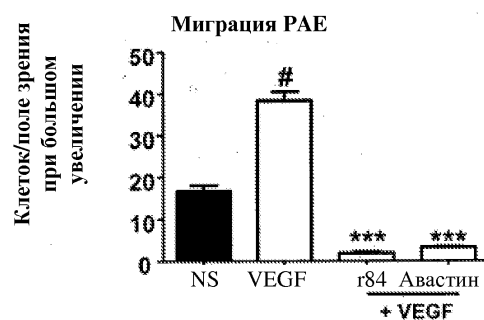
Фиг. 18С



Фиг. 19

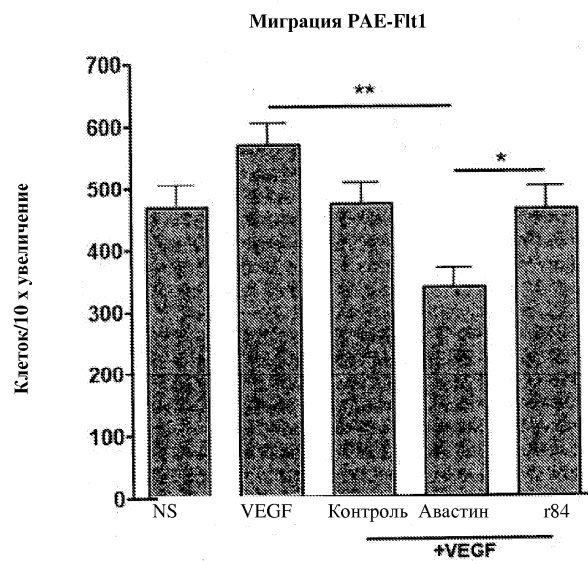


Фиг. 20А

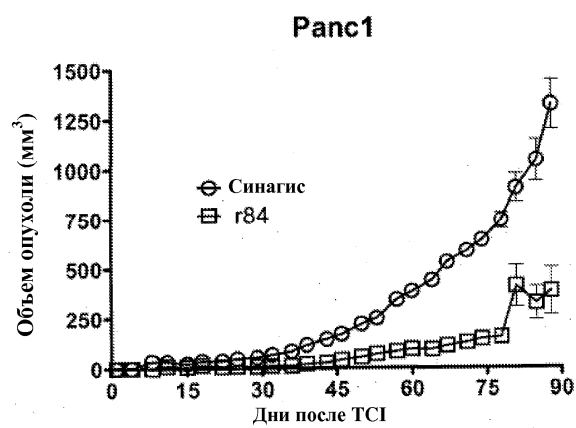


Фиг. 20В

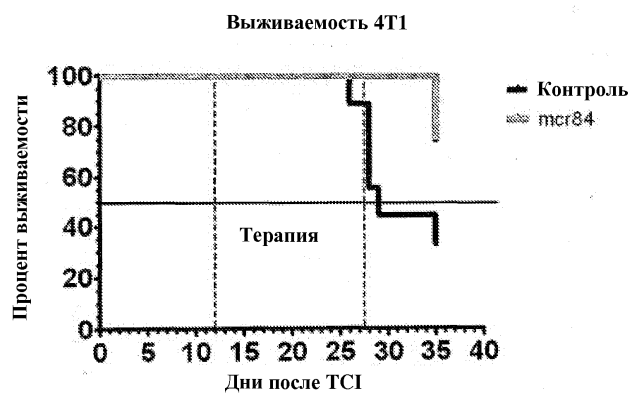




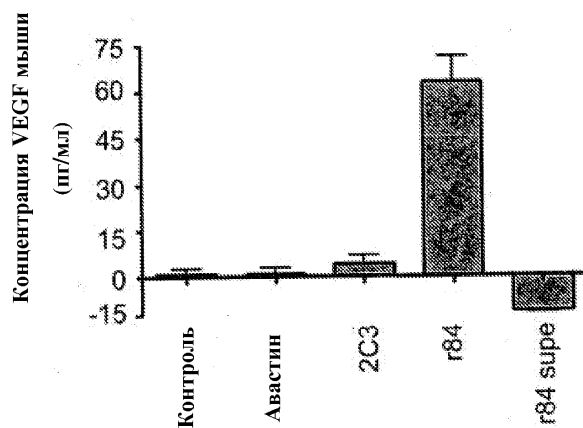
Фиг. 21



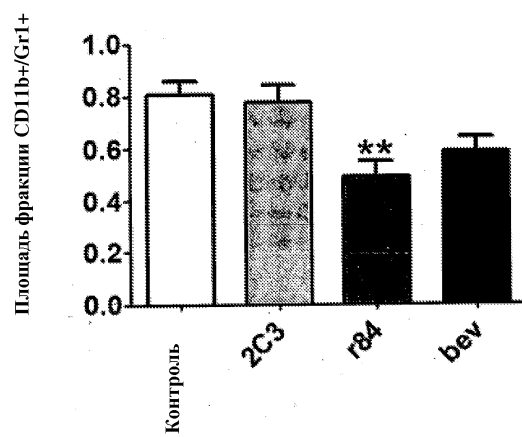
Фиг. 22



Фиг. 23



Фиг. 24



Фиг. 25

