

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **041176**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.09.21

(51) Int. Cl. **C07K 16/36** (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(21) Номер заявки
201100923

(22) Дата подачи заявки
2009.12.09

(54) **АНТИТЕЛА ЧЕЛОВЕКА ПРОТИВ ТКАНЕВОГО ФАКТОРА**

(31) **РА 2008 01744; 61/201,335**

(56) **WO-A1-03029295**
WO-A1-9840408

(32) **2008.12.09**

(33) **DK; US**

(43) **2011.12.30**

(86) **PCT/EP2009/066755**

(87) **WO 2010/066803 2010.06.17**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ГЕНМАБ А/С (DK)

(72) Изобретатель:
Верплуген Сандра, Сатейн Давид П.
Э., Хут Рене М.А., Паррен Паул,
Ван Де Винкел Ян (NL), Брайнхольт
Вибекке Миллер, Эхрнрот Эва,
Бадсгард Оле (DK), Винк Том, Блекер
Виллем Карел, Хауткамп Миса,
Аудсхорн Маруска, Де Йонг Роб Н.
(NL)

(74) Представитель:
Агуреев А.П., Фелицына С.Б. (RU)

(57) Описаны выделенные моноклональные антитела человека, которые связываются с ТF человека, и соответствующие композиции и молекулы на основе антител. Описаны также фармацевтические композиции и терапевтические и диагностические способы для применения этих антител.

В1

041176

041176
В1

Область техники, к которой относится изобретение

Данное изобретение относится к антителам, направленным на тканевой фактор, в частности тканевой фактор человека, и применениям таких антител, в частности их применению в лечении рака, воспаления и сосудистых заболеваний.

Уровень техники

Тканевой фактор (TF), также называемый тромбопластином, фактором III или CD142, является белком, присутствующим в субэндотелиальной ткани, тромбоцитах и лейкоцитах, необходимым для инициации образования тромбина из зимогена протромбина. Образование тромбина приводит в конечном счете к коагуляции крови. Тканевой фактор позволяет клеткам инициировать каскады коагуляции крови, и он функционирует в качестве высокоаффинного рецептора для фактора коагуляции VII. Полученный комплекс обеспечивает каталитическое событие, которое является ответственным за инициацию протеазных каскадов коагуляции посредством специфического ограниченного протеолиза. В отличие от других кофакторов этих протеазных каскадов, которые циркулируют в виде нефункциональных предшественников, этот фактор является сильнодействующим инициатором, который является полностью функциональным при экспрессии на клеточных поверхностях.

Тканевой фактор является рецептором клеточной поверхности для являющегося сериновой протеазой фактора VIIa (FVIIa). Было обнаружено, что связывание FVIIa с тканевым фактором запускает процессы передачи сигнала в этой клетке, причем указанная функция передачи сигнала играет роль в ангиогенезе. В то время как ангиогенез является нормальным процессом в росте и развитии, а также в заживлении ран, он является также фундаментальной стадией в переходе опухолей из состояния покоя в злокачественное состояние: когда раковые клетки приобретают способность продуцировать белки, которые участвуют в ангиогенезе, так называемые ангиогенные факторы роста, эти белки высвобождаются опухолью в соседние ткани и стимулируют новые кровеносные сосуды к прорастанию из существующих здоровых кровеносных сосудов по направлению к опухоли и в опухоль. Как только новые кровеносные сосуды входят в опухоль, она может быстро увеличивать ее размер и проникать в локальную ткань и органы. Посредством этих новых кровеносных сосудов раковые клетки могут также просачиваться в кровоток и локализоваться в других органах с образованием новых опухолей (метастазов).

Кроме того, TF играет роль в воспалении. Предполагается, что роль TF опосредуется коагуляцией крови (A.J. Chu: "Tissue factor mediates inflammation" in Archives of biochemistry and biophysics, 2005, vol. 440, No. 2, pp. 123-132). Таким образом, ингибирование TF, например, моноклональными анти-TF-антителами, является важным в прерывании цикла коагуляции-воспаления в содействии не только анти-воспалению, но также лечению сосудистых заболеваний.

Экспрессия TF наблюдается во многих типах рака и ассоциирована с более агрессивным заболеванием. Кроме того, TF человека существует также в растворимой альтернативно сплайсированной форме, asHTF. Недавно было обнаружено, что asHTF стимулирует рост опухоли (Hobbs et al., 2007 Thrombosis Res. 120(2) S13-S21).

Связывание антител с TF было раскрыто в предшествующем уровне техники:

WO 98/40408 описывает антитела, которые могут связывать нативный TF человека, либо отдельно, либо присутствуя в комплексе TF:VIIa, эффективно предотвращая связывание фактора X с TF или этим комплексом и уменьшая посредством этого коагуляцию крови. Раскрывается, что эти антитела могут быть использованы для облегчения тромбозов после инвазивной медицинской процедуры, такой как артериальная или сердечная хирургия, или для элиминации коагуляции крови, возникающей из использования медицинской программы. Кроме того, описано, что антитела могут быть использованы в диагностических способах *in vivo*, в том числе в диагностической визуализации *in vivo* нативного TF человека.

WO 04/094475 обеспечивает антитела, способные связываться с тканевым фактором человека, которые не ингибируют опосредованную фактором коагуляцию крови, в сравнении с нормальной плазмой в качестве контроля. Антитела человека не описаны. Предполагается, что это антитело может быть использовано для лечения рака.

WO 03/093422 относится к антителам, которые связываются с более высокой аффинностью с комплексом TF:VIIa, чем с одним TF. Предлагается использование этих антител в качестве антикоагулянта в лечении некоторых заболеваний, таких как сепсис, диссеминированная внутрисосудистая коагуляция, ишемический инсульт, тромбоз, острые коронарные синдромы и коагулопатия, в случае запущенного рака.

WO 01/27079 описывает композиции и способы для ингибирования отклоняющейся от нормы пролиферации клеток, в частности пролиферации эндотелиальных клеток, например в случае рака, аномального развития эмбрионов, нарушения функции иммунных реакций, а также ангиогенеза, связанного с неоваскуляризацией и ростом опухоли. Предлагаются многие активные вещества, в том числе антитела, но какие-либо конкретные антитела не описываются.

WO 03/037361 относится к применению агониста или антагониста TF для лечения, связанного с апоптозом.

WO 03/029295 относится к выделенным антителам человека, которые иммунореагируют с TF человека с ингибированием связывания фактора коагуляции VIIa. Однако эта заявка не раскрывает ни одного

примера антитела, имеющего эти свойства.

Одобрены ряд терапий с использованием моноклональных антител для лечения различных типов опухолей, в том числе бевацицумаба (Avastin®), цетуксимаба (Erbix®), панитумумаба (Vectibix™) и трастуцумаба (Herceptin®).

Сущность изобретения

Хотя был достигнут большой прогресс, остается потребность в улучшенных способах лечения серьезных заболеваний, например улучшенного лечения рака, на основе терапевтических антител.

Целью данного изобретения является обеспечение новых высокоспецифических и эффективных анти-TF-антител человека для медицинского применения. Антитела этого изобретения проявляют TF-связывающие характеристики, которые отличаются от характеристик антител, описанных в данной области. В предпочтительных вариантах осуществления антитела этого изобретения имеют высокую афинность в отношении тканевого фактора человека, опосредуют антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC), ингибируют FVIIa-индуцированное фосфорилирование ERK и высвобождение IL-8, не ингибируют или слабо ингибируют коагуляцию.

Краткое описание фигур

Фиг. 1: Сопоставление последовательностей антител данного изобретения. CDR1, CDR2 и CDR3 в соответствии с IMGT выделены: последовательности антител, выделенные курсивом, представляют район CDR1, неподчеркнутые последовательности представляют район CDR2, последовательности, выделенные жирным шрифтом, представляют район CDR3.

Фиг. 2: Последовательности IgG4 (SEQ ID NO: 113-114).

SEQ ID NO: 113: Аминокислотная последовательность СН-района дикого типа IgG4 человека. Последовательность, выделенная курсивом, представляет район СН1, выделенная последовательность представляет шарнирную область, нормальная последовательность представляет район СН2 и неподчеркнутая последовательность представляет район СН3;

SEQ ID NO: 114: Аминокислотная последовательность не имеющего шарнирной области района СН IgG4 человека.

Фиг. 3: Связывание анти-TF-HuMab с внеклеточным доменом TF.

Фиг. 4: Связывание анти-TF-HuMab с мембраносвязанным TF.

Фиг. 5: Ингибирование связывания FVIIa с TF.

Фиг. 6: Ингибирование FVIIa-индуцированного фосфорилирования ERK.

Фиг. 6a: Ингибирование FVIIa-индуцированного фосфорилирования ERK.

Фиг. 7: Ингибирование FVIIa-индуцированного высвобождения IL-8.

Фиг. 8: Ингибирование генерирования FXa.

Фиг. 9: Ингибирование коагуляции крови.

Фиг. 10: TF-HuMab индуцирует лизис клеток Vx-PC3 посредством ADCC.

Фиг. 11: Отложение компонентов комплемента C3c и C4c на клетках-мишенях.

Фиг. 12: Иммуногистохимический анализ связывания TF-HuMab с клубочками (гломерулами).

Фиг. 13: Иммуногистохимический анализ связывания TF-HuMab с панкреатическими опухолями.

Фиг. 14: In vivo эффективность TF-HuMab в установленном ксенотрансплантате опухоли MDA-MB-231.

Фиг. 15: Время кровотечения, определенное в собакоподобных обезьянах после внутривенных инъекций TF-специфического HuMab 011. Это антитело вводили в день 1 (0 мг/кг), 8 (1 мг/кг), 15 (10 мг/кг) и 22 (100 мг/кг).

Фиг. 16: In vivo эффективность TF-HuMab в профилактическом и установленном ксенотрансплантате опухоли Vx-PC3.

Фиг. 17: Перетасованная конструкция и домены TF.

Фиг. 18: Связывание анти-TF-антител с перетасованными конструкциями TF.

Фиг. 19: Связывание Fab-фрагментов HuMab-TF с внеклеточным доменом TF, ELISA.

Фиг. 20: Связывание Fab-фрагментов HuMab-TF с внеклеточным доменом TF, FACS.

Фиг. 21: Профиль связывания анти-TF-HuMab в зависимости от количества экспрессируемых молекул TF.

Сведения, подтверждающие возможность осуществления изобретения

Определения

Термины "тканевого фактора", "TF", "CD142", "антиген тканевого фактора", "антиген TF" и "антиген CD142" используются здесь взаимозаменяемо и, если нет других указаний, включают в себя любые варианты, изоформы и видовые гомологи тканевого фактора человека, которые природно экспрессируются клетками или экспрессируются на клетках, трансфицированных геном тканевого фактора.

Термин "иммуноглобулин" относится к классу структурно родственных гликопротеинов, состоящих из двух пар полипептидных цепей, одной пары легких (L) низкомолекулярных цепей и одной пары тяжелых (H) цепей, которые могут, все четыре, быть связаны дисульфидными связями. Структура иммуноглобулинов была хорошо охарактеризована. См., например, Fundamental Immunology Ch. 7 (Paul, W.,

ed., 2nd ed. Raven Press, N. Y. (1989)). Вкратце, каждая тяжелая цепь обычно состоит из переменного района тяжелой цепи (сокращаемого здесь как V_H или VH) и константного района тяжелой цепи. Этот константный район тяжелой цепи обычно состоит из трех доменов, C_{H1} , C_{H2} и C_{H3} . Каждая легкая цепь обычно состоит из переменного района легкой цепи (сокращаемого здесь как V_L или VL) и константного района легкой цепи. Этот константный район легкой цепи обычно содержит один домен, C_L . Районы V_H и V_L могут быть дополнительно подразделены на районы гипервариабельности (или гипервариабельные районы, которые могут быть гипервариабельными в последовательности и/или образуют структурно определенные петли), также называемые определяющими комплементарность районами (CDR), перемежающимися с районами, которые являются более консервативными, называемыми каркасными районами (FR). Каждый из V_H и V_L обычно состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (см. также Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196, 901-917 (1987)). Обычно, нумерацией аминокислотных остатков в этом районе является нумерация в соответствии с IMGT, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991) (такие фразы здесь как нумерация остатков переменного домена по Кабату или в соответствии с Кабатом относятся к этой нумерации переменных доменов тяжелой цепи или переменных доменов легкой цепи). С использованием этой системы нумерации, фактическая линейная аминокислотная последовательность пептида может содержать меньше аминокислот или дополнительные аминокислоты, соответствующие укорочению FR или CDR или встраиванию в FR или CDR переменного домена. Например, переменный домен тяжелой цепи может включать в себя единственный аминокислотный инсерт (остаток 52a по Кабату) после остатка 52 CDR2 V_H и инсертированные остатки (например, остатки 82a, 82b и 82c и т.д. по Кабату) после остатка 82 FR тяжелой цепи. Нумерация Кабата остатков может быть определена для конкретного антитела сопоставлением в районах гомологии этой последовательности антитела со "стандартной" нумерованной по Кабату последовательностью.

Термин "антитело" (Ab) в контексте данного изобретения относится к молекуле иммуноглобулина, фрагменту молекулы иммуноглобулина или производному любого из них, которая имеет способность специфически связываться с антигеном при типичных физиологических условиях со временем полужизни значительных периодов времени, таких как по меньшей мере приблизительно 30 мин, по меньшей мере приблизительно 45 мин, по меньшей мере приблизительно один час, по меньшей мере приблизительно 2 ч, по меньшей мере приблизительно 4 ч, по меньшей мере приблизительно 8 ч, по меньшей мере приблизительно 12 ч, приблизительно 24 ч или более, приблизительно 48 ч или более, приблизительно 3, 4, 5, 6, 7 или более дней, и т.д., или любого другого подходящего функционально-определенного периода (такого как время, достаточное для индукции, стимуляции, усиления и/или модуляции физиологической реакции, ассоциированной со связыванием антитела с антигеном, и/или время, достаточное для этого антитела для рекрутинга эффекторной активности). Переменные районы тяжелой и легкой цепей этой молекулы иммуноглобулина содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные районы этих антител (Ab) могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включающими в себя различные клетки иммунной системы (такие как эффекторные клетки) и компоненты системы комплемента, такие как C1q, первый компонент в классическом пути активации комплемента. Анти-TF-антитело может быть также биспецифическим антителом, диателом или подобной молекулой (см., например, PNAS USA 90(14), 6444-8 (1993) в отношении описания диател). Действительно, биспецифические антитела, диатела и т.п., обеспеченные данным изобретением, могут связывать любую подходящую мишень, наряду с частью тканевого фактора или комплексом тканевый фактор-FVIIa. Как указано выше, термин антитело, если нет другого указания, включает в себя фрагменты антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с этим антигеном. Было показано, что антигенсвязывающая функция антитела может выполняться фрагментами полноразмерного антитела. Примеры связывающих фрагментов, включенных в термин "антитело", включают в себя

- (i) Fab или Fab-фрагмент, моновалентный фрагмент, состоящий из доменов V_L , V_H , C_L и C_{H1} , или моновалентное антитело, описанное в WO 2007059782 (Genmab);
- (ii) $F(ab')_2$ -фрагменты, двухвалентные фрагменты, содержащие два Fab-фрагмента, связанные дисульфидным мостиком в шарнирной области;
- (iii) Fd-фрагмент, состоящий по существу из доменов V_H и C_{H1} ;
- (iv) Fv-фрагмент, состоящий по существу из доменов V_L и V_H ,
- (v) dAb-фрагмент (Ward et al., Nature 341, 544-546 (1989)), который состоит по существу из домена V_H , и также называемые состоящими из доменов антителами (Holt et al., Trends Biotechnol. 2003 Nov; 21(11):484-90);
- (vi) верблюдовые или нанотела (Revets et al; Expert Opin Biol Ther. 2005 Jan; 5(1):111-24) и
- (vii) выделенный определяющий комплементарность район (CDR).

Кроме того, хотя два домена Fv-фрагмента, V_L и V_H , кодируются отдельными генами, они могут быть соединены, с использованием рекомбинантных способов, синтетическим линкером, который позволяет приготовить их в виде единой белковой цепи, в которой районы V_L и V_H спариваются с образованием моновалентных молекул (известных как одноцепочечные антитела или одноцепочечный Fv (scFv)),

см., например, Bird et al., Science 242, 423-426 (1988) and Huston et al., PNAS USA 85, 5879-5883 (1988)). Такие одноцепочечные антитела включены в термин антитело, если нет другого указания или другой вариант не указывается ясно контекстом). Хотя такие фрагменты обычно включены в понятие антитела, они, вместе или каждый независимо, являются уникальными признаками данного изобретения, проявляющими различные биологические свойства и применимость. Эти и другие применимые фрагменты антител в контексте данного изобретения обсуждаются здесь дополнительно. Должно быть понятно, что термин антитело, если нет другого указания, включает в себя также поликлональные антитела, моноклональные антитела (mAb), антитело-подобные полипептиды, такие как химерные антитела и гуманизированные антитела, и фрагменты антител, сохраняющие способность специфически связываться с этим антигеном (антигенсвязывающие фрагменты), обеспечиваемые любым известным способом, таким как ферментативное расщепление, пептидный синтез и рекомбинантные способы. Генерированное антитело может иметь любой изотип.

"Анти-TF-антитело" является антителом, описанным выше, которое специфически связывается с антигенным тканевым фактором.

Термин "антитело человека", в данном контексте, включает в себя антитела, имеющие переменные и константные районы, произведенные из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Антитела человека этого изобретения могут включать в себя аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (например, мутации, введенные случайным или сайт-специфическим мутагенезом *in vitro* или во время реаранжировки генов или соматической мутации *in vivo*). Однако термин "антитело человека", в данном контексте, не предназначен для включения антител, в которых CDR-последовательности, произведенные из зародышевой линии другого вида млекопитающего, такого как мышь, были трансплантированы на последовательности каркасной области человека.

В одном предпочтительном варианте осуществления антитело этого изобретения является выделенным. "Выделенное антитело" относится в данном контексте к антителу, которое по существу не содержит других антител, имеющих отличающиеся антигенные специфичности (например, выделенное антитело, которое специфически связывается с тканевым фактором, по существу не содержит антител, которые специфически связывают антигены, другие, чем тканевой фактор). Однако выделенное антитело, которое специфически связывается с эпитопом, изоформой или вариантом тканевого фактора человека, может иметь перекрестную реактивность в отношении других родственных антигенов, например, из других видов (таких как видовые гомологи тканевого фактора). Кроме того, выделенное антитело может быть, по существу, свободным от другого клеточного материала и/или химикалиев. В одном варианте осуществления данного изобретения, два или более "выделенных" моноклональных антител, имеющих различные антигенсвязывающие специфичности, объединены в хорошо определенной композиции.

При использовании здесь в контексте двух или более антител, термин "конкурирует с" или "перекрестно конкурирует с" указывает на то, что эти два или более антител конкурируют за связывание с TF, например, конкурируют за связывание TF в анализе, описанном в примере 6 здесь. Для некоторых пар антител, конкуренция в этом анализе примера 6 наблюдается только при нанесении одного антитела в виде покрытия на планшет и при использовании другого для конкуренции, а не *vice versa*. Термин "конкурирует с" при использовании здесь охватывает также такие комбинации антител.

Термины "моноклональное антитело" или "композиция моноклонального антитела" относятся в данном контексте к препарату молекул антител единого молекулярного состава. Композиция моноклонального антитела проявляет единственную специфичность и афинность связывания в отношении конкретного эпитопа. Таким образом, термин "моноклональное антитело человека" относится к антителам, проявляющим единственную специфичность связывания, которые имеют переменные и константные районы, полученные из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Моноклональные антитела человека могут быть генерированы гибридомой, которая включает в себя В-клетку, полученную из трансгенного или трансхромосомного животного не человека, такого как трансгенная мышь, имеющая геном, содержащий трансген тяжелой цепи и трансген легкой цепи человека, слитые с иммортализованной клеткой.

В применении здесь, термин "связывание" в контексте связывания антитела с заранее определенным антигеном обычно обозначает связывание с афинностью, соответствующей K_D приблизительно 10^{-7} М или менее, такой как приблизительно 10^{-8} М или менее, такой как приблизительно 10^{-9} М или менее, приблизительно 10^{-10} М или менее, или приблизительно 10^{-11} М или даже менее, при определении, например, технологией резонанса поверхностных плазмонов (SPR) в приборе BIAcore 3000 с использованием этого антигена в качестве лиганда и этого антитела в качестве аналита, и это антитело связывает заранее определенный антиген с афинностью, соответствующей K_D , которая является по меньшей мере в десять раз более низкой, например, по меньшей мере в 100 раз более низкой, например, по меньшей мере в 1000 раз более низкой, например, по меньшей мере в 10000 раз более низкой, например, по меньшей мере в 100000 раз более низкой, чем его афинность в отношении неспецифического антигена (например, БСА, казеина), другого, чем заранее определенный антиген или близкородственный антиген. Количество, с которым эта афинность является более низкой, зависит от K_D этого антитела, так что, когда K_D ан-

титела является очень низкой (т.е. это антитело является высокоспецифическим), количество, с которым афинность в отношении этого антигена является более низкой, чем афинность в отношении неспецифического антигена, может быть по меньшей мере 10000-кратной.

Термин " k_d " (s^{-1}) относится в данном контексте к константе скорости диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген. Указанную величину называют также величиной k_{off} .

Термин " k_a " ($M^{-1}\cdot s^{-1}$) относится в данном контексте к константе скорости ассоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген.

Термин " K_D " (M) относится в данном контексте к константе равновесия диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген.

Термин " K_A " (M^{-1}) относится в данном контексте к константе равновесия ассоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген, и ее получают делением k_a на k_d .

Данное изобретение обеспечивает также антитела, содержащие функциональные варианты района V_L , района V_H или одного или нескольких CDR антител этих примеров. Функциональный вариант V_L , V_H или CDR, используемый в контексте анти-TF-антитела, все еще позволяет этому антителу сохранять, по меньшей мере, существенную долю (по меньшей мере приблизительно 50, 60, 70, 80, 90, 95% или более) афинности/авидности и/или специфичности/селективности исходного антитела, и в некоторых случаях такое анти-TF-антитело может быть ассоциировано с более высокой афинностью, селективностью и/или специфичностью, чем исходное антитело.

Такие функциональные варианты обычно сохраняют значительную идентичность последовательности относительно исходного антитела. Процентная идентичность между двумя последовательностями является функцией количества идентичных положений, общих для этих последовательностей (т.е. %-гомология=количество идентичных положений/общее количество положений \times 100), с учетом количества гэпов и длины каждого гэпа, которые должны быть введены для оптимального сопоставления этих двух последовательностей. Сравнение последовательностей и определение процентной идентичности между двумя последовательностями может выполняться с использованием математического алгоритма, как описано в неограничивающих примерах ниже.

Процентная идентичность между двумя нуклеотидными последовательностями может быть определена с использованием программы GAP в пакете программного обеспечения GCG (доступного в <http://www.gcg.com>), с использованием матрикса NWSgapdna.CMP и веса гэпа 40, 50, 60, 70 или 80 и веса длины 1, 2, 3, 4, 5 или 6. Процентная идентичность между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями может быть также определена с использованием алгоритма E. Meyers and W. Miller, Comput. Appl. Biosci 4, 11-17 (1988)), который был включен в программу ALIGN (версию 2.0), с использованием таблицы PAM120 вычета веса, штрафа (пенальти) длины гэпа 12 и штрафа гэпа 4. Кроме того, процентная идентичность между двумя аминокислотными последовательностями может быть определена с использованием алгоритма Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48, 444-453 (1970)), который был включен в программу GAP в пакете программного обеспечения GCG (доступную в <http://www.gcg.com>), использующую либо матрикс Blossum 62, либо матрикс PAM250 и вес гэпа 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4 и вес длины 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

Последовательность вариантов CDR может отличаться от последовательностей CDR исходного антитела наиболее консервативными заменами; например, по меньшей мере приблизительно 35%, приблизительно 50% или более, приблизительно 60% или более, приблизительно 70% или более, приблизительно 75% или более, приблизительно 80% или более, приблизительно 85% или более, приблизительно 90% или более, приблизительно 95% или более (например, приблизительно 65-99%, например, приблизительно 96, 97 или 98%) замен в варианте являются консервативными заменами аминокислотных остатков.

Последовательность вариантов CDR может отличаться от последовательности CDR последовательностей исходного антитела наиболее консервативными заменами; например по меньшей мере 10, например по меньшей мере 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 из этих замен в варианте являются консервативными заменами аминокислотных остатков.

В контексте данного изобретения, консервативные замены могут быть определены заменами в классах аминокислот, отраженных в одной или нескольких из следующих трех таблиц:

Классы аминокислотных остатков для консервативных замен Amino acid residue classes for conservative substitutions

Кислотные остатки	Asp (D) и Glu (E)		
Основные остатки	Lys (S), Arg (R) и His (H)		
Гидрофильные незаряженные остатки	Ser (K), Thr (T), Asn (N) и Leu (L)		
Алифатические незаряженные остатки	Gly (G), (Ala (A), Val (V), Leu (L) и Ile (I)		
Неполярные незаряженные остатки	Cys (C), Met (M) и Pro (P)		
Ароматические остатки	Phe (F), Tyr (Y) и Trp (W)		
Альтернативные классы консервативных замен аминокислотных остатков			
1	A	S	T
2	D	E	
3	N	Q	
4	R	K	
5	I	L	M
6	F	Y	W

Альтернативные физические и функциональные классификации аминокислотных остатков

Содержащие спиртовую группу остатки	S и T
Алифатические остатки	I, L, V и M
Циклоалкенил-ассоциированные остатки	F, H, W и Y
Гидрофобные остатки	A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W и Y
Отрицательно заряженные остатки	D и E
Полярные остатки	C, D, E, H, K, N, Q, R, S и T
Положительно заряженные остатки	H, K и R
Малые остатки	A, C, D, G, N, P, S, T и
Очень малые остатки	A, G и S
Остатки, участвующие в образовании витка	A, C, D, E, G, H, K, N, Q, R, S, P и T
Гибкие остатки	Q, T, K, S, G, P, D, E и R

Группировки более консервативных замен включают в себя: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин и аспарагин-глутамин.

Дополнительные группы аминокислот могут быть также приготовлены с использованием принципов, описанных, например, в Creighton (1984) *Proteins: Structure and Molecular Properties* (2d Ed. 1993), W. H. Freeman and Company.

В одном варианте осуществления этого изобретения консервативность в отношении гидрофобных/гидрофильных свойств и веса/размера остатков также по существу сохраняется в варианте CDR в сравнении с CDR антитела этих примеров (например, класса веса, оценки гидрофобности, или обе из этих последовательностей являются по меньшей мере приблизительно на 50%, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере приблизительно на 70%, по меньшей мере приблизительно на 75%, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 85%, по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 95% или более (например, приблизительно на 65-99%) сохраненными). Например, консервативные замены остатков могут быть также или альтернативно основаны на замене сильных или слабых на основе веса консервативных групп, которые известны в данной области.

Удержание сходных остатков может быть также или альтернативно измерено оценкой сходства, определяемой с использованием программы BLAST (например, BLAST 2.2.8 доступна через NCBI, с использованием стандартных установок BLOSUM62, открытый гэл=11 и удлинённый гэл=1). Подходящие варианты обычно обнаруживают по меньшей мере приблизительно 45%, например, по меньшей мере приблизительно 55%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% или большее (например, приблизительно 70-99%) сходство относительно исходного пептида.

В данном контексте, "изотип" относится к классу иммуноглобулинов (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE или IgM), которые кодируются генами константного района тяжелой цепи.

Термин "эпитоп" означает белковую детерминанту, способную специфически связываться с антителом. Эпитопы обычно состоят из группировок молекул поверхности, таких как аминокислоты или боковые цепи Сахаров, и обычно имеют специфические трехмерные структурные характеристики, а также специфические характеристики зарядов. Конформационные и неконформационные эпитопы различаются тем, что связывание первых, но не последних, теряется в присутствии денатурирующих растворителей. Эпитоп может содержать аминокислотные остатки, непосредственно участвующие в связывании (также называемые иммунодоминантным компонентом эпитопа), и другие аминокислотные остатки, которые не участвуют непосредственно в связывании, такие как аминокислотные остатки, которые эффективно блокированы специфическим антигенсвязывающим пептидом (другими словами, этот аминокислотный остаток находится в пределах футпринта специфически связывающего антиген пептида).

В данном контексте, антитело человека "происходит из" конкретной последовательности зародышевой линии, если это антитело получено из системы, использующей последовательности иммуноглобулина человека, например, иммунизацией трансгенной мыши, несущей гены иммуноглобулина человека, или скринингом библиотеки генов иммуноглобулинов человека, и где последовательность V-домена выбранного антитела человека является по меньшей мере на 90%, например, по меньшей мере на 95%, например по меньшей мере на 96%, например, по меньшей мере на 97%, например, по меньшей мере на 98% или, например, по меньшей мере на 99% идентичной в аминокислотной последовательности V-домена аминокислотной последовательности, кодируемой геном иммуноглобулина зародышевой линии. Обычно, вне CDR3 тяжелой цепи, антитело человека, полученное из конкретной последовательности зародышевой линии человека, будет проявлять не более 20 различий аминокислот, например, не более 10 различий аминокислот, например, не более 9, 8, 7, 6 или 5, например, не более 4, 3, 2 или 1 различий аминокислот от аминокислотной последовательности, кодируемой геном иммуноглобулина зародышевой линии.

В данном контексте термин "ингибирует рост" (например, при ссылке на клетки, такие как опухолевые клетки) включает в себя любое измеримое уменьшение в росте клеток при контактировании с анти-TF-антителом в сравнении с ростом тех же самых клеток без контакта с анти-TF-антителом, например, ингибирование роста клеточной культуры по меньшей мере приблизительно на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 99 или 100%. Такое уменьшение роста клеток может происходить посредством различных механизмов например, фагоцитоза эффекторных клеток, ADCC, CDC и/или апоптоза.

Термин "биспецифическая молекула" предназначен для включения в него любого агента, такого как белок, пептид или белковый или пептидный комплекс, который имеет две различные специфичности связывания. Например, эта молекула может связываться или взаимодействовать с (а) антигеном поверхности клеток и (b) Fc-рецептором на поверхности эффекторной клетки. Термин "биспецифические антитела" предназначен для включения любого анти-TF-антитела, которое является биспецифической молекулой. Термин "биспецифические антитела" включает в себя также диатела. Диатела являются двухвалентными, биспецифическими антителами, в которых домены V_H и V_L экспрессируются на единой полипептидной цепи, но с использованием линкера, который является слишком коротким, чтобы позволить спаривание между этими двумя доменами на одной и той же цепи, заставляя эти домены спариваться с комплементарными доменами другой цепи и создавая два антигенсвязывающих сайта (см., например, Holliger, P. et al., PNAS USA 90, 6444-6448 (1993), Poljak, R.J. et al., Structure 2, 1121-1123 (1994)).

"Антителом, недостаточным в эффекторной функции" или "недостаточным по эффекторной функции антителом" называют антитело, которое имеет значимо уменьшенную способность или отсутствие способности активировать один или несколько эффекторных механизмов, таких как активация компонента или связывание Fc-рецептора. Таким образом, недостаточные по эффекторной функции антитела имеют значимо уменьшенную способность или отсутствие способности опосредовать антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) и/или комплементзависимую цитотоксичность (CDC). Примером такого антитела является IgG4.

Термин "моновалентное антитело" означает в контексте данного изобретения, что молекула антитела способна связывать единственную молекулу антигена и, следовательно, не способна к перекрестному связыванию антигенов.

Термин "стабилизированное IgG4-антитело" относится к IgG4-антителу, которое было модифицировано для уменьшения обмена половин молекул (см. van der Neut Kolfshoten M et al. (2007) Science 14; 317(5844) и ссылки в этой статье, а также Labrijn et al. (2009) Nature Biotechnology, 27, 767-771).

В данном контексте термин "эффекторная клетка" относится к иммунной клетке, которая участвует в эффекторной фазе иммунной реакции, в противоположность фазе распознавания и фазе активации иммунной реакции. Примерные иммунные клетки включают в себя клетку миелоидного или лимфоидного происхождения, например, лимфоциты (такие как В-клетки и Т-клетки, в том числе цитолитические Т-клетки (CTL)), киллерные клетки, природные клетки-киллеры, макрофаги, моноциты, эозинофилы, полиморфонуклеарные клетки, такие как нейтрофилы, гранулоциты, тучные клетки и базофилы. Некоторые эффекторные клетки экспрессируют специфические Fc-рецепторы и несут конкретные иммунные функции. В некоторых вариантах осуществления эффекторная клетка способна индуцировать антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (ADCC), такая как природная клетка-киллер, способ-

ная индуцировать ADCC. Например, моноциты, макрофаги, которые экспрессируют FcR, участвуют в специфическом убивании клеток-мишеней и презентации антигенов другим компонентам иммунной системы или связывании клеток, которые презентуют антигены. В некоторых вариантах осуществления, эффекторная клетка может фагоцитировать антиген-мишень или клетку-мишень. Экспрессия конкретного FcR на эффекторной клетке может регулироваться гуморальными факторами, такими как цитокины. Например, было обнаружено, что экспрессия FcγRI повышающим образом регулируется интерфероном γ (IFN-γ) и/или G-CSF. Эта повышенная экспрессия увеличивает цитотоксическую активность FcγRI-несущих клеток против мишеней. Эффекторная клетка может фагоцитировать или лизировать антиген-мишень или клетку-мишень.

Термин "вектор" относится в данном контексте к молекуле нуклеиновой кислоты, способной транспортировать другую нуклеиновую кислоту, с которой он был связан. Одним типом вектора является "плаزمид", которая является кольцевой двухцепочечной петлей, в которую могут быть лигированы дополнительные сегменты ДНК. Другим типом вектора является вирусный вектор, где дополнительные сегменты ДНК могут быть лигированы в вирусный геном. Некоторые векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они введены (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальный сайт инициации репликации, и эписомные векторы млекопитающих). Другие векторы (такие как неэписомные векторы млекопитающих) могут быть интегрированы в геном клетки-хозяина после введения в эту клетку-хозяина, и посредством этого реплицируются вместе с геномом хозяина. Кроме того, некоторые векторы способны управлять экспрессией генов, с которыми они функционально связаны. Такие векторы называют здесь "рекомбинантными экспрессирующими векторами" (или просто "экспрессирующими векторами"). Обычно экспрессирующие векторы, используемые в способах рекомбинантных ДНК, часто имеют форму плазмид. В данном описании "плаزمид" и "вектор" могут использоваться взаимозаменяемо, так как плазмид является наиболее часто используемой формой вектора. Однако данное изобретение включает в себя такие другие формы экспрессирующих векторов, как вирусные векторы (такие как ретровирусы с дефектной репликацией, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), которые выполняют эквивалентные функции.

Термин "рекомбинантная клетка-хозяин" (или просто "клетка-хозяин") относится в данном контексте к клетке, в которую был введен экспрессирующий вектор. Должно быть понятно, что такие термины относятся не только к конкретной рассматриваемой клетке, но также к потомству такой клетки. Поскольку в выживших поколениях могут встречаться определенные модификации вследствие либо мутации, либо влияний окружающей среды, такое потомство может фактически не быть идентичным исходной клетке, но оно все еще находится в объеме термина "клетка-хозяин" в данном контексте. Рекомбинантные клетки-хозяева включают в себя, например, трансфектомы, такие как клетки CHO, клетки HEK293, клетки NS/0 и лимфоциты.

Термин "трансфектома" включает в себя в данном контексте рекомбинантные эукариотические клетки-хозяева, экспрессирующие антитело, такие как клетки CHO, клетки NS/0, клетки HEK293, клетки растений или грибы, в том числе клетки дрожжей.

Термин "трансгенное животное не человек" относится к животному не человеку, имеющему геном, содержащий один или несколько трансгенов или трансхромосом тяжелой и/или легкой цепи человека (либо интегрированных, либо неинтегрированных в природную геномную ДНК этого животного), которое способно к экспрессии полностью человеческих антител. Например, трансгенная мышь может иметь трансген легкой цепи человека и либо трансген тяжелой цепи человека, либо трансхромосому тяжелой цепи человека, так что эта мышь продуцирует анти-ТФ-антитела человека при иммунизации антигеном ТФ и/или клетками, экспрессирующими ТФ. Трансген тяжелой цепи человека может быть интегрирован в хромосомную ДНК этой мыши или трансген тяжелой цепи человека может сохраняться внехромосомно, как в случае трансхромосомной КМ-мыши, описанной в WO02/43478. Такие трансгенные и трансхромосомные мыши (вместе называемые здесь "трансгенными мышами") способны продуцировать множественные изоформы моноклональных антител человека к конкретному антигену (такие как IgG, IgA, IgM, IgD и/или IgE) посредством подвергания рекомбинации V-D-J и переключения изоформы. Трансгенное животное не человек может быть также использовано для получения антител против специфического антигена введением генов, кодирующих такое специфическое антитело, например, функциональным связыванием этих генов с геном, который экспрессируется в молоке этого животного.

"Лечение" относится к введению эффективного количества терапевтически активного соединения данного изобретения с целью облегчения, уменьшения симптомов, задержки или устранения (излечения) симптомов или состояний заболевания.

"Эффективным количеством" называют количество, эффективное при подходящих дозах и в течение необходимых периодов времени, для достижения желаемого терапевтического результата. Терапевтически эффективное количество анти-ТФ-антитела может варьироваться в соответствии с такими факторами, как состояние заболевания, возраст, пол и масса индивидуума, и способностью анти-ТФ-антитела индуцировать желаемую реакцию в этом индивидууме. Терапевтически эффективным количеством является также количество, в котором любые токсические или вредные эффекты этого антитела или части

антитела перевешиваются терапевтически полезными эффектами.

"Антиидиотипическим" (Id) антителом является антитело, которое узнает уникальные детерминанты, обычно ассоциированные с антигенсвязывающим сайтом антитела.

Дополнительные аспекты и варианты этого изобретения

Как описано выше, в первом аспекте, это изобретение относится к антителу человека, которое связывает тканевой фактор человека.

В одном варианте осуществления это антитело связывается с внеклеточным доменом тканевого фактора с кажущейся афинностью (EC_{50}) 3 нМ или менее, такой как 0,50 нМ или менее, например 0,35 нМ или менее, такой как 0,20 нМ или менее, например 0,1 нМ или менее, при определении, как описано в анализе в примере 13.

В другом варианте осуществления это антитело связывается с клетками млекопитающих, экспрессирующими тканевой фактор, такими как клетки A431, трансфицированные конструкцией, кодирующей тканевой фактор, предпочтительно с кажущейся афинностью (EC_{50}) 10 нМ или менее, например 8 нМ или менее, такой как 5 нМ или менее, например 2 нМ или менее, такой как 1 нМ или менее, например, 0,5 нМ или менее, такой как 0,3 нМ или менее, при определении, как описано в анализе в примере 14.

В другом варианте осуществления это антитело способно индуцировать антителозависимую клеточную цитотоксичность в клетках A431, предпочтительно с величиной EC_{50} 2 нМ или менее, например, 1 нМ или менее, такой как 0,7 нМ или менее или 0,3 нМ или менее, такой как 0,2 нМ или менее или 0,1 нМ или менее или 0,05 нМ или менее, при определении, как описано в анализе в примере 20.

В другом варианте осуществления это антитело является эффективным в ингибировании роста установленных опухолей MDA-MB-231 при определении способом, описанным в примере 24, и/или в ингибировании роста установленных опухолей ВхРС3 при определении способом, описанным в примере 26.

В другом варианте осуществления это антитело ингибирует индуцированную тканевым фактором коагуляцию крови, предпочтительно с медианой концентрации ингибирования, меньшей, чем 10 нМ, такой как меньшая, чем 5 нМ, например меньшая, чем 2 нМ, такой как меньшая, чем 1 нМ, при определении, как описано в анализе в примере 19.

В другом варианте осуществления это антитело не ингибирует коагуляцию. В одном варианте осуществления коагуляция ингибируется самое большее на 30%, например на 25%, например на 20%, например на 15%, например на 10% или, например, на 5% в сравнении с природным уровнем.

В следующем варианте осуществления это антитело ингибирует связывание FVIIa с тканевым фактором, предпочтительно с максимальной величиной ингибирования более 80%, такой как более 90%, при определении, как описано в анализе в примере 15.

В следующем варианте осуществления это антитело ингибирует FVIIa-индуцированное высвобождение IL-8 клетками MDA-MB-231, предпочтительно с максимальной величиной ингибирования более 40%, такой как более 50%, например, более 60%, при определении, как описано в анализе в примере 17.

В следующем варианте осуществления это антитело ингибирует превращение FX в FXa комплексом TF/FVIIa, предпочтительно менее, чем на 50%, например, менее, чем на 40%, например, в диапазоне 1-30%, при определении, как описано в анализе в примере 18.

В следующем варианте осуществления это антитело конкурирует за связывание тканевого фактора с антителом, содержащим район VH, содержащий последовательность SEQ ID NO: 9, и район VL, содержащий последовательность SEQ ID NO: 65.

В следующем варианте осуществления связывание антитела этого изобретения с тканевым фактором не включает в себя все три из следующих остатков: W в положении 45, K в положении 46 или Y в положении 94 тканевого фактора. В следующем варианте осуществления, это связывание не включает в себя любой из следующих остатков: W в положении 45, K в положении 46 или Y в положении 94 (эти номера относятся к зрелому TF, эквивалентными положениями в Genbank entry NP_001984 являются 77, 78 и 126).

В другом варианте осуществления это антитело конкурирует за связывание тканевого фактора с антителом, содержащим район VH, содержащий последовательность SEQ ID NO: 37, и район VL, содержащий последовательность SEQ ID NO: 93.

В следующем варианте осуществления это антитело ингибирует FVIIa-индуцированное фосфорилирование ERK, предпочтительно с медианой концентрации ингибирования, меньшей, чем 10 нМ, такой как меньшая, чем 5 нМ, например, меньшая, чем 2 нМ, при определении, как описано в анализе в примере 16.

В следующем варианте осуществления это антитело ингибирует фосфорилирование ERK, предпочтительно с медианой концентрации ингибирования, меньшей, чем 10 нМ, такой как меньшая, чем 5 нМ, например, меньшая, чем 2 нМ, при определении, как описано в анализе в примере 16, и не ингибирует FVII-индуцированное высвобождение IL-8, как описано в анализе в примере 17, более, чем на (самое большее) 10%.

В следующем варианте осуществления это антитело способно индуцировать отложение C3c и C4c, предпочтительно, когда это антитело способно индуцировать отложение C3c и C4c, как определено в

примере 21.

В следующем варианте осуществления Fab-фрагменты этого антитела связываются с внеклеточным доменом тканевого фактора, как описано в примере 28, с величиной EC_{50} ниже 0,1 мкг/мл, такой как ниже 0,05 мкг/мл, например, ниже 0,04 мкг/мл, как измерено при помощи ELISA.

В следующем варианте осуществления Fab-фрагменты этого антитела связываются с внеклеточным доменом тканевого фактора, как описано в примере 28, с величиной EC_{50} выше 1,0 мкг/мл, как измерено при помощи ELISA.

В следующем варианте осуществления Fab-фрагменты этого антитела связываются с внеклеточным доменом тканевого фактора, как описано в примере 28, с величиной EC_{50} ниже 10 мкг/мл, такой как ниже 1 мкг/мл, например, ниже 0,5 мкг/мл или ниже 0,2 мкг/мл.

В следующем варианте осуществления это антитело связывается с тканевым фактором человека, но не с мышинным тканевым фактором и обнаруживает уменьшенное связывание в сравнении со связыванием с TF человека с перетасованной конструкцией 42-84 мм, содержащей последовательность TF человека, за исключением аминокислот 42-84, которые были заменены последовательностью мыши, как описано в примере 27.

В следующем варианте осуществления это антитело связывается с тканевым фактором человека, но не с мышинным тканевым фактором и обнаруживает уменьшенное связывание в сравнении со связыванием TF человека с перетасованной конструкцией 85-122 мм, содержащей последовательность TF человека, за исключением аминокислот 85-122, которые были заменены последовательностью мыши, как описано в примере 27.

В следующем варианте осуществления это антитело связывается с тканевым фактором человека, но не с мышинным тканевым фактором и обнаруживает уменьшенное связывание в сравнении со связыванием TF человека с перетасованной конструкцией 123-137 мм, содержащей последовательность TF человека, за исключением аминокислот 123-137, которые были заменены последовательностью мыши, как описано в примере 27.

В следующем варианте осуществления это антитело связывается с тканевым фактором человека, но не с мышинным тканевым фактором и обнаруживает уменьшенное связывание в сравнении со связыванием TF человека с перетасованной конструкцией 185-225 мм, содержащей последовательность TF человека, за исключением аминокислот 185-225, которые были заменены последовательностью мыши, как описано в примере 27.

В следующем варианте осуществления это антитело связывается с тканевым фактором человека, но не с мышинным тканевым фактором и обнаруживает уменьшенное связывание в сравнении со связыванием TF человека с перетасованной конструкцией 226-250 мм, содержащей последовательность TF человека, за исключением аминокислот 226-250, которые были заменены последовательностью мыши, как описано в примере 27.

В следующем варианте осуществления это антитело обнаруживает уменьшенное связывание в сравнении со связыванием с TF человека с более, чем одной перетасованной конструкцией. В следующем варианте осуществления, это антитело обнаруживает уменьшенное связывание с конструкцией 42-84 мм, а также с конструкцией 85-122 мм.

В следующем варианте осуществления это антитело обнаруживает уменьшенное связывание с конструкцией 123-137 мм, а также с конструкцией 185-225 мм. В следующем варианте осуществления это антитело обнаруживает уменьшенное связывание с конструкцией 123-137 мм, а также с конструкцией 185-225 мм и дополнительно с конструкцией 226-250 мм.

В следующем варианте осуществления это антитело способно индуцировать отложение C3c и C4c, предпочтительно, когда это антитело способно индуцировать отложение C3c и C4c, как определено в примере 21.

В одном варианте осуществления антитела этого изобретения указанное антитело конкурирует за связывание тканевого фактора с антителом, содержащим район VH, содержащий последовательность SEQ ID NO: 9, и район VL, содержащий последовательность SEQ ID NO: 65, и не конкурирует за связывание тканевого фактора с антителом, содержащим район VH, содержащий последовательность SEQ ID NO: 37, и район VL, содержащий последовательность SEQ ID NO: 93.

В следующем варианте осуществления, это антитело содержит район VH CDR3, имеющий

a) последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 28, или

b) вариант любой из этих последовательностей, такой как вариант, имеющий самое большее 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных модификаций, предпочтительно замен, таких как консервативные замены.

В следующем варианте осуществления это антитело содержит район VH CDR3, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, или ее вариант, где этот вариант содержит модификацию в одном или нескольких из положений 2, 3, 6, 9 и 11, предпочтительно где эта модификация является заменой, более предпочтительно, где эта замена выбрана из группы, состоящей из

a) R, замененного K, когда он находится в положении 2,

b) S, замененного A или T, когда он находится в положении 3,

- с) G, замененного T, когда он находится в положении 6,
- d) L, замененного F, когда он находится в положении 9, и
- e) S, замененного Y, когда он находится в положении 11.

В другом варианте осуществления, это антитело содержит:

- a) VH-район, содержащий последовательности CDR1, 2 и 3 SEQ ID NO: 10, 11 и 12, и VL-район, содержащий последовательности CDR1, 2 и 3 SEQ ID NO: 66, 67 и 68,
- b) VH-район, содержащий последовательности CDR1, 2 и 3 SEQ ID NO: 14, 15 и 16, и VL-район, содержащий последовательности CDR1, 2 и 3 SEQ ID NO: 70, 71 и 72,
- c) VH-район, содержащий последовательности CDR1, 2 и 3 SEQ ID NO: 18, 19, 20, и VL-район, содержащий последовательности CDR1, 2 и 3 SEQ ID NO: 74, 75 и 76,
- d) VH-район, содержащий последовательности CDR1, 2 и 3 SEQ ID NO: 22, 23 и 24, и VL-район, содержащий последовательности CDR1, 2 и 3 SEQ ID NO: 78, 79 и 80,
- e) VH-район, содержащий последовательности CDR1, 2 и 3 SEQ ID NO: 26, 27 и 28, и VL-район, содержащий последовательности CDR1, 2 и 3 SEQ ID NO: 82, 83 и 84, или
- f) вариант любого из указанных антител, где указанный вариант предпочтительно имеет самое большее 1, 2 или 3 аминокислотные модификации, более предпочтительно аминокислотные замены, такие как консервативные аминокислотные замены, в указанных последовательностях.

В следующем варианте осуществления это антитело содержит VH, имеющий:

- a) по меньшей мере 80% идентичность, такую как по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98 или 100% идентичность последовательности V_H-района, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9, 13, 17, 21 и 25, или
- b) самое большее 20, например 15, или 10, или 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотных модификаций, более предпочтительно аминокислотных замен, таких как консервативные аминокислотные замены, в сравнении с последовательностью V_H-района, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9, 13, 17, 21, 21 и 25.

В следующем варианте осуществления, это антитело содержит VL, имеющий:

- a) по меньшей мере 80% идентичность, такую как по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98 или 100% идентичность последовательности VL-района, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 65, 69, 73, 77 и 81, или
- b) самое большее 20, например, 15, или 10, или 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотных модификаций, более предпочтительно аминокислотных замен, таких как консервативные аминокислотные замены, в сравнении с последовательностью VL-района, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 65, 69, 73, 77 и 81.

В следующем варианте осуществления, это антитело содержит:

- a) VH-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 9, и VL-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 65,
- b) VH-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 13, и VL-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 69,
- c) VH-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 17, и VL-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 73,
- d) VH-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 21, и VL-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 77,
- e) VH-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 25, и VL-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 81, или
- f) вариант любого из указанных антител, где указанный вариант предпочтительно имеет самое большее 1, 2 или 3 аминокислотные модификации, более предпочтительно аминокислотные замены, такие как консервативные аминокислотные замены, в указанных последовательностях.

В следующем варианте осуществления, это антитело конкурирует за связывание тканевого фактора с антителом, содержащим VH-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 9, и VL-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 65, и конкурирует за связывание тканевого фактора с антителом, содержащим VH-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 37, и VL-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 93.

В следующем варианте осуществления это антитело содержит район VH CDR3, имеющий:

- a) последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 52, или
- b) вариант любой из указанных последовательностей, такой как вариант, имеющий самое большее 1, 2 или 3 аминокислотные модификации, предпочтительно замены, такие как консервативные замены.

В следующем варианте осуществления это антитело содержит:

- a) VH-район, содержащий последовательности CDR1, 2 и 3 SEQ ID NO: 6, 7 и 8, и VL-район, содержащий последовательности CDR1, 2 и 3 SEQ ID NO: 62, 63 и 64,
- b) VH-район, содержащий последовательности CDR1, 2 и 3 SEQ ID NO: 50, 51 и 52, и VL-район, содержащий последовательности CDR1, 2 и 3 SEQ ID NO: 106, 107 и 108, или
- c) вариант любого из указанных антител, где указанный вариант предпочтительно имеет самое

большее 1, 2 или 3 аминокислотные модификации, более предпочтительно аминокислотные замены, такие как консервативные аминокислотные замены в указанных последовательностях.

В следующем варианте осуществления это антитело содержит VH, имеющий:

а) по меньшей мере 80% идентичность, такую как по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98 или 100% идентичность, относительно последовательности VH-района, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5 и 49, или

б) самое большее 20, например 15, или 10, или 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотных модификаций, более предпочтительно аминокислотных замен, таких как консервативные аминокислотные замены, в сравнении с последовательностью VH-района, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5 и 49.

В следующем варианте осуществления это антитело содержит VL, имеющий:

а) по меньшей мере 80% идентичность, такую как по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98 или 100% идентичность, относительно последовательности VL-района, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 61 и 105, или

б) самое большее 20, например 15, или 10, или 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотных модификаций, более предпочтительно аминокислотных замен, таких как консервативные аминокислотные замены, в сравнении с последовательностью VH-района, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 61 и 105.

В следующем варианте осуществления, это антитело содержит:

а) VH-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 5, и VL-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 61,

б) VH-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 49, и VL-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 105, или

с) вариант любого из указанных антител, где указанный вариант предпочтительно имеет самое большее 1, 2 или 3 аминокислотные модификации, более предпочтительно аминокислотные замены, такие как консервативные аминокислотные замены, в указанных последовательностях.

В следующем варианте осуществления, это антитело

не конкурирует за связывание тканевого фактора с антителом, содержащим VH-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 9, и VL-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 65, и

конкурирует за связывание тканевого фактора с антителом, содержащим VH-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 37, и VL-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 93.

В следующем варианте осуществления это антитело содержит район VH CDR3, имеющий:

а) последовательность, представленную в SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 56, или

б) вариант любой из указанных последовательностей, такой как вариант, имеющий самое большее 1, 2 или 3 аминокислотные модификации, предпочтительно замены, такие как консервативные замены.

В следующем варианте осуществления это антитело содержит:

а) VH-район, содержащий последовательности CDR1, 2 и 3 SEQ ID NO: 30, 31 и 32, и VL-район, содержащий последовательности CDR1, 2 и 3 SEQ ID NO: 86, 87 и 88,

б) VH-район, содержащий CDR1, 2 и 3 SEQ ID NO: 34, 35 и 36, и VL-район, содержащий последовательности CDR1, 2 и 3 SEQ ID NO: 90, 91 и 92,

с) VH-район, содержащий последовательности CDR1, 2 и 3 SEQ ID NO: 38, 39 и 40, и VL-район, содержащий последовательности CDR1, 2 и 3 SEQ ID NO: 94, 95 и 96,

д) VH-район, содержащий последовательности CDR1, 2 и 3 SEQ ID NO: 54, 55 и 56, и VL-район, содержащий последовательности CDR1, 2 и 3 SEQ ID NO: 110, 111 и 112, или

е) вариант любого из указанных антител, где указанный вариант предпочтительно имеет самое большее 1, 2 или 3 аминокислотные модификации, более предпочтительно аминокислотные замены, такие как консервативные аминокислотные замены, в указанных последовательностях.

В следующем варианте осуществления это антитело содержит VH, имеющий:

а) по меньшей мере 80% идентичность, такую как по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98 или 100% идентичность, относительно последовательности VH-района, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 29, 33, 37 и 53, или

б) самое большее 20, например 15, или 10, или 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотных модификаций, более предпочтительно аминокислотных замен, таких как консервативные аминокислотные замены, в сравнении с последовательностью VH-района, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 29, 33, 37 и 53.

В следующем варианте осуществления это антитело содержит VL, имеющий:

а) по меньшей мере 80% идентичность, такую как по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98 или 100% идентичность, относительно последовательности VL-района, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 85, 89, 93 и 109, или

б) самое большее 20, например, 15, или 10, или 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотных модификаций, более предпочтительно аминокислотных замен, таких как консервативные аминокислотные замены, в сравнении с последовательностью VH-района, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 85, 89, 93 и 109.

В следующем варианте осуществления, это антитело содержит:

а) VH-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 29, и VL-район, содержащий последова-

тельность SEQ ID NO: 85,

b) VH-район, содержащий последовательность SEQ GO NO: 33, и VL-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 89,

c) VH-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 37, и VL-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 93,

d) VH-район, содержащий последовательности SEQ GO NO: 53, и VL-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 109,

e) вариант любого из указанных антители, где указанный вариант предпочтительно имеет самое большее 1, 2 или 3 аминокислотные модификации, более предпочтительно аминокислотные замены, такие как консервативные аминокислотные замены, в указанных последовательностях.

В следующем варианте осуществления, это антитело содержит антитело, которое конкурирует за связывание тканевого фактора с антителом, содержащим VH-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 41, и VL-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 97.

В следующем варианте осуществления, это антитело содержит район VH CDR3, имеющий:

a) последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 48, или

b) вариант любой из указанных последовательностей, такой как вариант, имеющий самое большее 1, 2 или 3 аминокислотные модификации, предпочтительно замены, такие как консервативные замены.

В следующем варианте осуществления это антитело содержит:

a) VH-район, содержащий последовательности CDR1, 2 и 3 SEQ ID NO: 2, 3 и 4, и VL-район, содержащий последовательности CDR1, 2 и 3 SEQ ID NO: 58, 59 и 60,

b) VH-район, содержащий последовательности CDR1, 2 и 3 SEQ ID NO: 42, 43 и 44, и VL-район, содержащий последовательности CDR1, 2 и 3 SEQ ID NO: 98, 99 и 100,

c) VH-район, содержащий последовательности CDR1, 2 и 3 SEQ ID NO: 46, 47 и 48, и VL-район, содержащий последовательности CDR1, 2 и 3 SEQ ID NO: 102, 103 и 104,

d) вариант любого из указанных антители, где указанный вариант предпочтительно имеет самое большее 1, 2 или 3 аминокислотные модификации, более предпочтительно аминокислотные замены, такие как консервативные аминокислотные замены, в указанных последовательностях.

В следующем варианте осуществления это антитело содержит VH, имеющий:

a) по меньшей мере 80% идентичность, такую как по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% или 100% идентичность, относительно последовательности VH-района, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 41 и 45, или

b) самое большее 20, например 15, или 10, или 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотных модификаций, более предпочтительно аминокислотных замен, таких как консервативные аминокислотные замены, в сравнении с последовательностью VH-района, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 1, 41 и 45.

В следующем варианте осуществления, это антитело содержит VL, имеющий a) по меньшей мере 80% идентичность, такую как по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98 или 100% идентичность, относительно последовательности VL-района, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 57, 97 и 101, или

b) самое большее 20, например, 15, или 10, или 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотных модификаций, более предпочтительно аминокислотных замен, таких как консервативные аминокислотные замены, в сравнении с последовательностью VH-района, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 57, 97 и 101.

В следующем варианте осуществления это антитело содержит:

a) VH-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1, и VL-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 57,

b) VH-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 41, и VL-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 97,

c) VH-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 45, и VL-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 101, или

d) вариант любого из указанных антители, где указанный вариант предпочтительно имеет самое большее 1, 2 или 3 аминокислотные модификации, более предпочтительно аминокислотные замены, такие как консервативные аминокислотные замены, в указанных последовательностях.

Еще в одном варианте осуществления, антитело этого изобретения имеет аффинность в отношении тканевого фактора, которая меньше 5 нМ, например меньше 3,5 нМ, например меньше 2 нМ при определении способом, описанным в примере 22 здесь.

Особенно интересная группа антители этого изобретения имеет связывание с тканевым фактором, которое характеризуется нормальной или высокой avidностью и высокой скоростью диссоциации (k_d). Как продемонстрировано здесь, такие антитела могут проявлять опухолеспецифическое связывание, заключающееся в том, что они связывают раковую ткань, но не связывают или меньше связывают здоровые ткани. Не связывая себя с какой-либо конкретной теорией, авторы изобретения выдвигают гипотезу, что эта группа антители связывается хорошо только с клетками, которые экспрессируют высокие уровни TF, так как это связывание является эффективным только в том случае, если оно является двухвалентным. Примеры этих антители включают в себя антитело 044, 098 и 111, описанные здесь.

Таким образом, в одном варианте осуществления антитело этого изобретения имеет k_d более 10^{-3} c^{-1} при определении способом определения аффинности, описанным в примере 22 здесь, и avidность менее 5 нМ, такую как менее 1 нМ, например, менее 0,2 нМ, при определении способом определения avidности, описанным в примере 22 здесь.

В другом варианте осуществления антитело этого изобретения имеет k_d более 10^{-3} c^{-1} , при определении способом определения аффинности, описанным в примере 22 здесь, и/или k_a более $5 \times 10^4, \text{ Mol}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$, при определении способом определения аффинности, описанным в примере 22 здесь.

В следующем варианте осуществления это антитело не проявляет связывания со здоровой тканью, в частности, не проявляет связывания с клубочками (гломерулами) человека, например, при определении в анализе, описанном в примере 23, но действительно проявляет связывание с панкреатическими опухолями, например, при определении в анализе, описанном в примере 23 здесь.

Еще в одном варианте осуществления это антитело является эффективным в ингибировании роста установленных опухолей Вх-РС3 при определении способом, описанным в примере 26 здесь.

В другом варианте осуществления антитело этого изобретения имеет одно или несколько из следующих свойств: ингибирование опухолевых клеток, ингибирование ангиогенеза опухолей, индукцию апоптоза опухолевых клеток, связывание с альтернативно сплайсированным тканевым фактором.

В следующем варианте осуществления антитело этого изобретения конкурирует за связывание тканевого фактора с антителом, содержащим:

- a) VH-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 9, и VL-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 65,
- b) VH-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1, и VL-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 57,
- c) VH-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 5, и VL-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 61,
- d) VH-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 13, и VL-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 69,
- e) VH-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 17, и VL-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 73,
- f) VH-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 21, и VL-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 77,
- g) VL-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 25, и VL-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 81,
- h) VL-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 29, и VL-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 85,
- i) VH-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 33, и VL-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 89,
- j) VH-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 37, и VL-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 93,
- k) VH-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 41, и VL-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 97,
- l) VH-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 45, и VL-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 101,
- m) VH-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 49, и VL-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 105, или
- n) VH-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 53, и VL-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 109.

В следующем варианте осуществления антитело этого изобретения связывается с одним и тем же эпитопом на тканевом факторе в качестве антитела, имеющего:

- a) VH-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 9, и VL-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 65,
- b) VH-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1, и VL-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 57,
- c) VH-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 5, и VL-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 61,
- d) VH-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 13, и VL-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 69,
- e) VH-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 17, и VL-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 73,
- f) VH-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 21, и VL-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 77,
- g) VH-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 25, и VL-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 81,

- h) VH-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 29, и VL-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 85,
- i) VH-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 33, и VL-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 89,
- j) VH-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 37, и VL-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 93,
- k) VL-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 41, и VL-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 97,
- l) VH-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 45, и VL-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 101,
- m) VH-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 49, и VL-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 105, или
- n) VH-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 53, и VL-район, содержащий последовательность SEQ ID NO: 109.

В следующем варианте осуществления антитело этого изобретения содержит
 переменный район тяжелой цепи, полученный из V_H -последовательности зародышевой линии человека, выбранный из группы, состоящей из IGHV1-18*01, IGHV3-23*01, IGHV3-30*01, IGHV3-33*01, IGHV3-33*03, IGHV1-69*02, IGHV1-69*04 и IGHV5-51*01 и/или

переменный район легкой цепи, полученный из V_L -последовательности зародышевой линии человека, выбранный из группы, состоящей из IGKV3-20*01, IGKV1-13*02, IGKV3-11*01 и IGKV1D-16*01.

В следующем аспекте это изобретение относится к моноклональному анти-TF-антителу, содержащему VH-район, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9, 1, 5, 13, 17, 21, 25, 29, 33, 37, 41, 45, 49 или 53, или варианту любой из указанных последовательностей, такой как вариант, имеющий самое большее 25 аминокислотных модификаций, например 20, например самое большее 15, 14, 13, 12 или 11 аминокислотных модификаций, например 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотных модификаций, таких как делеции или инсерции, предпочтительно замены, такие как консервативные замены.

Вариант последовательности, представленной в SEQ ID NO: 9, 1, 5, 13, 17, 21, 25, 29, 33, 37, 41, 45, 49 или 53, может иметь по меньшей мере 80% идентичность относительно любой из указанных последовательностей, такую как по меньшей мере 85% идентичность или 90% идентичность или 95% идентичность, например, 96% идентичность или 98% идентичность или 99% идентичность.

В одном аспекте этого изобретения выделенное моноклональное анти-TF-антитело содержит V_L -последовательность, представленную в SEQ ID NO: 65, 57, 61, 69, 73, 77, 81, 85, 89, 93, 97, 101 или 105, или вариант любой из указанных последовательностей, такой как вариант, имеющий самое большее 25 аминокислотных модификаций, например, 20, например, самое большее 15, 14, 13, 12 или 11 аминокислотных модификаций, таких как делеции или инсерции, предпочтительно замены, такие как консервативные замены.

Вариант последовательности, представленной в SEQ ID NO: 65, 57, 61, 69, 73, 77, 81, 85, 89, 93, 97, 101 или 105, может иметь по меньшей мере 80% идентичность любой из указанных последовательностей, например, по меньшей мере 85% идентичность или 90% идентичность или 95% идентичность, такую как 96% идентичность или 97% идентичность или 98% идентичность или 99% идентичность.

В другом варианте осуществления это антитело содержит Ж:

a) VL-район, имеющий последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 65, 57, 61, 69, 73, 77, 81, 85, 89, 93, 97, 101 или 105, и VH-район, имеющий последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9, 1, 5, 13, 17, 21, 25, 29, 33, 37, 41, 45, 49 или 53,

b) вариант любых из приведенных выше последовательностей, где указанный вариант имеет предпочтительно только консервативные замены в указанных последовательностях.

В одном предпочтительном варианте осуществления это антитело содержит VL-район, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 65, и VH-район, имеющий последовательность, представленную SEQ ID NO: 9, или вариант любой из этих двух последовательностей, причем эти варианты имеют либо

a) самое большее 25 аминокислотных модификаций, например 20, например самое большее 15, 14, 13, 12 или 11 аминокислотных модификаций, например 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 из аминокислотных модификаций, таких как делеции или инсерции, предпочтительно замены, такие как консервативные замены, либо

b) по меньшей мере 80% идентичность SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 65 соответственно, такую как по меньшей мере 85% идентичность или 90% идентичность или 95% идентичность, например, 96% идентичность или 97% идентичность или 98% идентичность или 99% идентичность.

В другом предпочтительном варианте осуществления, это антитело содержит VL-район, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 57, и VH-район, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, или вариант любой из этих двух последовательностей, причем эти варианты имеют либо

мены, либо

b) по меньшей мере 80% идентичность SEQ ID NO: 49 или SEQ ID NO: 105 соответственно, такую как по меньшей мере 85% идентичность или 90% идентичность или 95% идентичность, например 96% идентичность или 97% идентичность или 98% идентичность или 99% идентичность.

В другом предпочтительном варианте осуществления это антитело содержит VL-район, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 109, и VH-район, имеющий последовательность, представленную в SEQ ID NO: 53, или вариант любой из этих двух последовательностей, причем эти варианты имеют либо

(a) самое большее 25 аминокислотных модификаций, например 20, например, самое большее 15, 14, 13, 12 или 11 аминокислотных модификаций, например 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 из аминокислотных модификаций, таких как делеции или инсерции, предпочтительно замены, такие как консервативные замены, либо

b) по меньшей мере 80% идентичность SEQ ID NO: 53 или SEQ ID NO: 109 соответственно, такую как по меньшей мере 85% идентичность или 90% идентичность или 95% идентичность, например 96% идентичность или 97% идентичность или 98% идентичность или 99% идентичность.

Моноклональные антитела данного изобретения могут быть, например, получены гибридным способом, впервые описанным Kohler et al., *Nature* 256, 495 (1975), или могут быть получены способами рекомбинантных ДНК. Моноклональные антитела могут быть также выделены из фаговых библиотек антител с использованием способов, описанных, например, Clackson et al., *Nature* 352, 624-628 (1991) and Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222, 581-597 (1991). Моноклональные антитела могут быть получены из любого подходящего источника. Так, например, моноклональные антитела могут быть получены из гибридом, приготовленных из В-клеток мышины селезенки, полученных из мышей, иммунизированных представляющим интерес антигеном, например, в форме клеток, экспрессирующих этот антиген на поверхности, или нуклеиновой кислоты, кодирующей представляющий интерес антиген. Моноклональные антитела могут быть также получены из гибридом, полученных из экспрессирующих антитела клеток иммунизированных людей или млекопитающих (не людей), таких как крысы, кролики, собаки, приматы и т.д.

В одном варианте осуществления антитело этого изобретения является антителом человека. Моноклональные антитела человека, направленные против тканевого фактора, могут быть генерированы с использованием трансгенных или трансхромосомных мышей, несущих скорее части иммунной системы человека, чем иммунной системы мыши. Таких трансгенных и трансхромосомных мышей называют здесь НуМАб-мышами и КМ-мышами, соответственно, и вместе их называют здесь "трансгенными мышами".

НуМАб-мышь содержит минилокусы гена иммуноглобулина человека, который кодирует перестроенные последовательности варибельной и константной областей (μ и γ) тяжелой цепи и варибельной и константной цепей (κ) легкой цепи иммуноглобулина человека, вместе с нацеленными мутациями, которые инактивируют эндогенные локусы цепей μ и κ (Lonberg, N. et al., *Nature* 368, 856-859 (1994)). Таким образом, эти мыши обнаруживают уменьшенную экспрессию мышинового IgM или κ и в ответ на иммунизацию, введенные трансгены тяжелой и легкой цепи человека, подвергаются переключению класса и соматической мутации для генерирования IgG человека высокой аффинности, К-моноклональных антител (Lonberg, N. et al. (1994), supra; рассматриваемая в Lonberg, N. *Handbook of Experimental Pharmacology* 113, 49-101 (1994), Lonberg, N. and Huszar, D., *Intern. Rev. Immunol.* Vol. 13 65-93 (1995) и Harding, F. and Lonberg, N. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 764 536-546 (1995)). Получение НуМАб-мышей описано подробно в Taylor, L. et al., *Nucleic Acids Research* 20, 6287-6295 (1992), Chen, J. et al., *International Immunology* 5, 647-656 (1993), Tuailon et al., *J. Immunol.* 152, 2912-2920 (1994), Taylor, L. et al., *International Immunology* 6, 579-591 (1994), Fishwild, D. et al., *Nature Biotechnology* 14, 845-851 (1996). См. также US 5545806, US 5569825, US 5625126, US 5633425, US 5789650, US 5877397, US 5661016, US 5814318, US 5874299, US 5770429, US 5545807, WO 98/24884, WO 94/25585, WO 93/1227, WO 92/22645, WO 92/03918 и WO 01/09187.

Мыши HCo7 имеют JKD-разрушение в их эндогенных генах легкой цепи (каппа) (как описано в Chen et al., *EMBO J.* 12, 821-830 (1993)), разрушение CMD в их эндогенных генах тяжелой цепи (как описано в примере 1 WO 01/14424), трансгена легкой цепи каппа KCo5 человека (как описано в Fishwild et al., *Nature Biotechnology* 14, 845-851 (1996)), и трансгена тяжелой цепи человека HCo7 (как описано в US 5770429).

Мыши HCo12 имеют разрушение JKD в их эндогенных генах легкой цепи (каппа) (как описано в Chen et al., *EMBO J.* 12, 821-830 (1993)), разрушение CMD в их эндогенных генах тяжелой цепи (как описано в примере 1 WO 01/14424), трансгена легкой цепи каппа KCo5 человека (как описано в Fishwild et al., *Nature Biotechnology* 14, 845-851 (1996)), и трансгена тяжелой цепи человека HCo7 (как описано в US 5770429) и трансгена тяжелой цепи человека HCo7 (как описано в примере 2 WO 01/14424).

В мышинной линии КМ, эндогенный ген легкой цепи каппа мыши разрушали гомозиготно, как описано в Chen et al., *EMBO J.* 12, 811-820 (1993) и эндогенный ген тяжелой цепи мыши разрушали гомозиготно, как описано в примере 1 WO 01/09187. Эта мышинная линия несет трансген легкой цепи каппа че-

ловека, KCo5, как описано в Fishwild et al., *Nature Biotechnology* 14, 845-851 (1996). Эта мышьяная линия несет также трансхромосому тяжелой цепи человека, состоящую из фрагмента hCF хромосомы 14 (SC20), как описано в WO 02/43478.

Спленоциты из этих трансгенных мышей могут быть использованы для секреции моноклональных антител человека в соответствии с хорошо известными способами. Моноклональные или поликлональные антитела человека данного изобретения или антитела данного изобретения, происходящие из других видов, могут быть также генерированы трансгенно через генерирование другого млекопитающего (не человека) или растения, которое является трансгенным в отношении представляющих интерес последовательностей тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина, и получения этого антитела из них в восстанавливаемой форме. В связи с трансгенным продуцированием в млекопитающих, антитела могут быть получены в молоке коз, коров или других млекопитающих и извлечены из них. См., например, US 5827690, US 5756687, US 5750172 и US 5741957.

Кроме того, антитела человека данного изобретения или антитела данного изобретения из других видов могут быть генерированы с использованием технологий типа дисплея, включающих в себя, без ограничения, фаговый дисплей, ретровирусный дисплей, рибосомный дисплей, и других способов, использующих способы, хорошо известные в данной области, и полученные молекулы могут быть подвергнуты дополнительному созреванию, такому как созревание афинности, так как подобные способы хорошо известны в данной области (см., например, Hoogenboom et al., *J. Mol. Biol.* 227, 381 (1991) (фаговый дисплей), Vaughan et al., *Nature Biotech* 14, 309 (1996) (фаговый дисплей), Hanes and Pluchthau, *PNAS USA* 94, 4937-4942 (1997) (рибосомный дисплей), Parmley and Smith, *Gene* 73, 305-318 (1988) (фаговый дисплей), Scott *TIBS* 17, 241-245 (1992), Swirla et al., *PNAS USA* 87, 6378-6382 (1990), Russel et al., *Nucl. Acids Research* 21, 1081-1085 (1993), Hogenboom et al., *Immunol. Reviews* 130, 43-68 (1992), Chiswell and McCafferty *TIBTECH* 10, 80-84 (1992), и US 5,733,743). Если технологии дисплея используются для получения антител, которые не являются антителами человека, такие антитела могут быть гуманизированы.

Антитело этого изобретения может быть антителом любого изотипа. Выбор изотипа обычно будет направляться желаемыми эффекторными функциями, такими как индукция ADCC. Примерами изотипов являются IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Могут использоваться константные районы легкой цепи человека, каппа или ламбда. Если желательно, класс анти-TF-антитела данного изобретения может быть переключен известными способами. Например, антитело данного изобретения, которое исходно является IgM, может быть подвергнуто переключению класса на IgG-антитело данного изобретения. Далее, способы переключения класса могут быть использованы для превращения одного подкласса IgG на другой, например, с IgG1 на IgG2. Таким образом, эффекторная функция антител данного изобретения может быть изменена переключением изотипов, например, на IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE или IgM-антитело для различных терапевтических применений. В одном варианте осуществления антитело данного изобретения является Ig1-антителом, например, IgG1,κ.

В одном варианте осуществления антитело этого изобретения является полноразмерным антителом, предпочтительно IgG1-антителом, в частности IgG1,κ-антителом. В другом варианте осуществления антитело этого изобретения является фрагментом антитела или одноцепочечным антителом.

Фрагменты антител могут, например, быть получены фрагментацией с использованием общепринятых способов, и эти фрагменты подвергаются скринингу на применимость таким же образом, как описано здесь для целых антител. Например, F(ab')₂-фрагменты могут быть генерированы обработкой антитела пепсином. Полученный F(ab')₂-фрагмент может быть обработан для уменьшения дисульфидных мостиков с получением Fab'-фрагментов. Fab-фрагменты могут быть получены обработкой IgG-антитела папином; Fab'-фрагменты могут быть получены расщеплением пепсином IgG-антитела. F(ab')-фрагмент может быть также получен связыванием Fab', описанным ниже, через тиоэфирную связь или дисульфидную связь. Fab'-фрагмент является фрагментом антитела, полученным разрезанием дисульфидной связи шарнирной области F(ab')₂. Fab'-фрагмент может быть также получен обработкой F(ab')₂-фрагмента восстанавливающим агентом, таким как дитиотреитол. Фрагменты антител могут быть также генерированы экспрессией нуклеиновых кислот, кодирующих такие фрагменты, в рекомбинантных клетках (см., например, Evans et al., *J. Immunol. Meth.* 184, 123-38 (1995)). Например, химерный ген, кодирующий часть F(ab')₂-фрагмента, мог бы включать в себя ДНК-последовательности, кодирующие домен C_H1 и шарнирную область H-цепи, за которой следует стоп-кодон трансляции для получения такой укороченной молекулы фрагмента антитела.

В одном варианте осуществления, анти-TF-антитело является моновалентным антителом, предпочтительно моновалентным антителом, описанным в WO 2007059782 (Genmab) (включен здесь посредством ссылки), имеющим делецию шарнирной области. Таким образом, в одном варианте осуществления это антитело является моновалентным, где указанное анти-TF-антитело конструируют способом, предусматривающим:

i) обеспечение конструкции нуклеиновой кислоты, кодирующей легкую цепь указанного моновалентного антитела, причем указанная конструкция содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую VL-район выбранного антигенспецифического анти-TF-антитела, и нуклеотидную последова-

тельность, кодирующую константный CL-район Ig, где указанная нуклеотидная последовательность, кодирующая VL-район выбранного антигенспецифического антитела, и указанная нуклеотидная последовательность, кодирующая этот CL-район Ig, функционально связаны вместе, и где, в случае IgG1-подтипа, нуклеотидная последовательность, кодирующая CL-район, была модифицирована таким образом, что этот CL-район не содержит аминокислот, способных образовывать дисульфидные связи или ковалентные связи с другими пептидами, содержащими идентичную аминокислотную последовательность CL-района, в присутствии поликлонального IgG человека или при введении животному или человеку;

ii) обеспечение конструкции нуклеиновой кислоты, кодирующей тяжелую цепь указанного моновалентного антитела, причем указанная конструкция содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую VH-район выбранного антигенспецифического анти-TF-антитела, и нуклеотидную последовательность, кодирующую константный CH-район Ig, где указанная нуклеотидная последовательность, кодирующая этот CH-район, была модифицирована таким образом, что район, соответствующий шарнирной области и, как требуется Ig-подтипом, другие районы этого CH-района, такие как CH3-район, не содержат никаких аминокислотных остатков, которые участвуют в образовании дисульфидных связей или ковалентных или стабильных нековалентных находящихся между тяжелыми цепями связей с другими пептидами, содержащими идентичную аминокислотную последовательность CH-района Ig человека, в присутствии поликлонального IgG человека или при введении животному или человеку, причем указанная нуклеотидная последовательность, кодирующая VH-район выбранного антигенспецифического антитела, и указанная нуклеотидная последовательность, кодирующая CH-район указанного Ig, функционально связаны вместе;

iii) обеспечение системы клеточной экспрессии для получения указанного моновалентного антитела;

iv) обеспечение указанного моновалентного антитела коэкспрессией конструкций нуклеиновых кислот (i) и (ii) в клетках этой системы клеточной экспрессии (iii).

Подобным образом в одном варианте анти-TF-антитело является моновалентным антителом, которое содержит:

(i) переменный район антитела этого изобретения, описанный здесь, или антигенсвязывающую часть указанного района, и

(ii) C_H-район иммуноглобулина или его фрагмента, содержащий C_H2- и C_H3-районы, где этот C_H-район или его фрагмент был модифицирован таким образом, что район, соответствующий шарнирной области, и, если этот иммуноглобулин не является иммуноглобулином подтипа IgG4, другие районы этого C_H-района, такие как C_H3-район, не содержат никаких аминокислотных остатков, которые способны образовывать дисульфидные связи с идентичным C_H-районом или другими ковалентными или стабильными нековалентными находящимися между тяжелыми цепями с идентичным C_H-районом в присутствии поликлонального IgG человека.

В следующем варианте осуществления тяжелая цепь моновалентного анти-TF-антитела была модифицирована таким образом, что вся шарнирная область была делетирована.

В следующем варианте осуществления указанное моновалентное антитело является антителом подтипа IgG4 (см. SEQ ID NO: 114, не содержащий шарнирной области вариант SEQ ID NO: 113), но C_H3-район был модифицирован таким образом, что были произведены одна или несколько следующих аминокислотных замен: Thr (T) в положении 234 был заменен Ala (A); Leu (L) в положении 236 был заменен Ala (A); Leu (L) в положении 236 был заменен Val (V); Phe (F) в положении 273 был заменен Ala (A); Phe (F) в положении 273 был заменен Leu (L); Tyr (Y) в положении 275 был заменен Ala (A).

В другом дополнительном варианте осуществления последовательность указанного моновалентного антитела была модифицирована таким образом, что она не содержит никаких акцепторных сайтов N-связанного гликозилирования.

Анти-TF-антитела этого изобретения включают в себя также одноцепочечные антитела. Одноцепочечные антитела являются пептидами, в которых Fv-районы тяжелой и легкой цепи являются связанными. В одном варианте осуществления данное изобретение обеспечивает одноцепочечный Fv (scFv), где тяжелая и легкая цепи в Fv анти-TF-антитела этого изобретения соединены гибким пептидным линкером (обычно приблизительно 10, 12, 15 или более аминокислотных остатков) в единой пептидной цепи. Способы получения таких антител описаны, например, в US 4,946,778, Pluckthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994), Bird et al., *Science* 242, 423-426 (1988), Huston et al., *PNAS USA* 85, 5879-5883 (1988) и McCafferty et al., *Nature* 348, 552-554 (1990). Это одноцепочечное антитело может быть моновалентным, если используются только единственные V_H и V_L, двухвалентным, если используются два V_H и V_L, или поливалентным, если используются более чем два V_H и V_L.

В одном варианте осуществления анти-TF-антитело этого изобретения является недостаточным в отношении эффекторной функции антителом. Такие антитела являются особенно применимыми при использовании этого антитела в стимуляции иммунной системы через блокирование ингибирующих эффектов TF. Для таких применений может быть выгодным, что это антитело не имеет эффекторных функ-

ций, таких как ADCC, так как они могут привести к нежелательной цитотоксичности.

В одном варианте осуществления, недостаточное в отношении эффекторной функции анти-TF-антитело является стабилизированным IgG4-антителом. Примерами подходящих стабилизированных IgG4-антител являются антитела, в которых аргинин в положении 409 в константном районе тяжелой цепи IgG4 человека, который указан в EU-индексе, как в Kabat et al., заменен лизином, треонином, метионином или лейцином, предпочтительно лизином (как описано в WO 2006033386 (Kirin)), и/или в которых шарнирная область содержит последовательность Cys-Pro-Pro-Cys.

В следующем варианте осуществления это стабилизированное анти-TF-антитело IgG4 является IgG4-антителом, содержащим тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная тяжелая цепь содержит константный район IgG4 человека, имеющий остаток, выбранный из группы, состоящей из Lys, Ala, Thr, Met и Leu, в положении, соответствующем 409, и/или остаток, выбранный из группы, состоящей из Ala, Val, Gly, Ile и Leu, в положении, соответствующем 405, и где указанное антитело необязательно содержит одну или несколько замен, делеций и/или инсерций, но не содержит последовательности Cys-Pro-Pro-Cys в шарнирной области. Предпочтительно указанное антитело содержит остаток Lys или Ala в положении, соответствующем 409, или СНЗ-район этого антитела был заменен СНЗ-районом IgG1 человека или IgG3 человека.

Еще в одном дополнительном варианте осуществления стабилизированное анти-TF-антитело IgG4 является IgG4-антителом, содержащим тяжелую цепь и легкую цепь, где указанная тяжелая цепь содержит константный район IgG4 человека, имеющий остаток, выбранный из группы, состоящей из Lys, Ala, Thr, Met и Leu, в положении, соответствующем 409, и/или остаток, выбранный из группы, состоящей из Ala, Val, Gly, Ile и Leu, в положении, соответствующем 405, и где указанное антитело необязательно содержит одну или несколько замен, делеций и/или инсерций и где указанное антитело содержит последовательность Cys-Pro-Pro-Cys в шарнирной области. Предпочтительно указанное антитело содержит остаток Lys или Ala в положении, соответствующем 409, или СНЗ-район этого антитела был заменен СНЗ-районом IgG1 человека, IgG2 человека или IgG3 человека.

В следующем варианте осуществления недостаточное в отношении эффекторных функций анти-TF-антитело является антителом He-IgG4-типа, например IgG1, IgG2 или IgG3, которое было мутировано таким образом, что способность опосредовать эффекторные функции, такие как ADCC, была уменьшена или элиминирована. Такие мутации были, например, описаны в Dall'Acqua WF et al., *J Immunol.* 177(2): 1129-1138 (2006) и Hezareh M, *J Virol.*; 75(24): 12161-12168 (2001).

В следующем варианте осуществления, антитело этого изобретения конъюгировано с другой частью, такой как цитотоксическая частица, радиоизотоп или лекарственное средство. Такие антитела могут быть получены химической конъюгацией другой частицы с N-концевой стороной или C-концевой стороной анти-TF-антитела или его фрагмента (например, N-цепи, L-цепи анти-TF-антитела или его анти-TF-специфического/селективного фрагмента) (см., например, *Antibody Engineering Handbook*, edited by Osamu Kanemitsu, published by Chijin Shokan (1994)). Такие конъюгированные производные антител могут быть также генерированы конъюгацией внутренних остатков или сахаров в случае необходимости.

Обычно описанные здесь анти-TF-антитела могут быть модифицированы включением любого подходящего количества таких модифицированных аминокислот и/или ассоциацией с такими конъюгированными заместителями. Пригодность в этом контексте обычно определяется способностью по меньшей мере по существу сохранять TF-селективность и/или TF-специфичность, ассоциированную с неderivативированным исходным анти-TF-антителом. Включение одной или нескольких аминокислот может быть выгодным, например, в увеличении полужизни полипептида в сыворотке, уменьшении антигенности полипептида или увеличении стабильности полипептида при хранении. Аминокислоты модифицируют, например, котрансляционно или посттрансляционно во время рекомбинантного получения (например, N-связанного гликозилирования в мотивах N-X-S/T во время экспрессии в клетках млекопитающих), или модифицируют синтетическим способом. Неограничивающие примеры модифицированной аминокислоты включают в себя гликозилированную аминокислоту, сульфатированную аминокислоту, пренилированную аминокислоту (например, фарнезилированную, геранилгеранилированную) аминокислоту, ацетилированную аминокислоту, ацилированную аминокислоту, ПЭГилированную аминокислоту, биотинилированную аминокислоту, карбоксилированную аминокислоту, фосфорилированную аминокислоту и т.п. Ссылки, достаточные для ориентирования квалифицированного специалиста в модификации аминокислот, обеспечены в изобилии в литературе. Примерные протоколы можно найти в Walker (1998) *Protein Protocols On Cd-Rom*, Humana Press, Towata, NJ. Модифицированная аминокислота может быть, например, выбрана из гликозилированной аминокислоты, ПЭГилированной аминокислоты, фарнезилированной аминокислоты, ацетилированной аминокислоты, биотинилированной аминокислоты, аминокислоты, конъюгированной с липидной частью молекулы, или аминокислоты, конъюгированной с органическим derivативированным агентом.

Анти-TF-антитела могут быть также химически модифицированы ковалентной конъюгацией с полимером, например, для увеличения их полужизни в кровотоке. Примерные полимеры и способы присоединения их к пептидам иллюстрированы, например, в US 4766106, US 4179337, US 4495285 и US 4609546. Дополнительные иллюстративные полимеры включают в себя полиоксиэтилированные полио-

лы и полиэтиленгликоль (PEG) (например, PEG с молекулярной массой приблизительно 1000 - приблизительно 40000, такой как приблизительно 2000 - приблизительно 20000, например приблизительно 3000-12000 г/моль).

В одном варианте осуществления данное изобретение обеспечивает анти-TF-антитело, которое конъюгировано со второй молекулой, которая выбрана из радионуклида, фермента, субстрата фермента, кофактора, флуоресцентного маркера, хемилюминесцентного маркера, пептидной метки или магнитной частицы. В одном варианте осуществления анти-TF-антитело может быть конъюгировано с одним или несколькими фрагментами антител, нуклеиновыми кислотами (олигонуклеотидами), нуклеазами, гормонами, иммуномодуляторами, хелаторами, соединениями бора, фотоактивными агентами, красителями и т.п. Эти и другие подходящие агенты могут быть связаны непосредственно или опосредованно с анти-TF-антителом данного изобретения. Одним примером опосредованного связывания второго агента является связывание спейсерной частицей. Эти спейсеры могут быть, в свою очередь, нерастворимыми и растворимыми (см., например, Diener et al., *Science* 231, 148 (1986)) и могут быть выбраны для облегчения высвобождения лекарственного средства из анти-TF-антитела в сайте-мишени и/или при конкретных условиях. Дополнительные примеры агентов, которые могут быть связаны с анти-TF-антителом, включают в себя лектины и флуоресцентные пептиды.

В одном варианте осуществления обеспечены анти-TF-антитела, содержащие одну или несколько радиоактивно меченых аминокислот. Радиоактивно меченое анти-TF-антитело может быть использовано как для диагностических, так и для терапевтических целей (конъюгация с радиоактивно мечеными молекулами является другим возможным признаком). Неограничивающие примеры меток для полипептидов включают в себя, но не ограничиваются ими, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc и ^{125}I , ^{131}I и ^{186}Re . Способы получения радиоактивно меченых аминокислот и родственных пептидных производных известны в данной области (см., например, Junghans et al., in *Cancer Chemotherapy and Biotherapy* 655-686 (2d edition, Chafner and Longo, eds., Lippincott Raven (1996)) и US 4681581, US 4735210, US 5101827, US 5102990 (US RE 35,500), US 5648471 и US 5697902. Например, радиоактивный изотоп может быть конъюгирован по способу с хлорамином T.

В одном варианте осуществления анти-TF-антитело этого изобретения содержит конъюгированную нуклеиновую кислоту или ассоциированную с нуклеиновой кислотой молекулу. В одном таком аспекте данного изобретения эта конъюгированная нуклеиновая кислота является цитотоксической рибонуклеазой. В одном варианте осуществления эта конъюгированная нуклеиновая кислота является антисмысловой нуклеиновой кислотой (например, нацеленной на S10010 антисмысловой молекулой, которая может быть также независимым компонентом в комбинированной композиции или комбинированном способе введения данного изобретения - см., например, Zhang et al., *J Biol Chem.* 279(3), 2053-62 (2004)). В одном варианте осуществления эта конъюгированная нуклеиновая кислота является ингибиторной РНК-молекулой (например, молекулой siRNA). В одном варианте осуществления эта конъюгированная нуклеиновая кислота является иммуностимуляторной нуклеиновой кислотой (например, иммуностимуляторной CpG-мотив-содержащей ДНК-молекулой). В одном варианте осуществления эта конъюгированная нуклеиновая кислота является экспрессионной кассетой, кодирующей экспрессию гена супрессора опухоли, противораковой вакциной, противораковым цитокином или апоптотическим агентом. Такие производные могут также содержать конъюгацию нуклеиновой кислоты, кодирующей экспрессию одного или нескольких цитотоксических белков, таких как токсины растений и бактериальные токсины.

В одном варианте осуществления анти-TF-антитело конъюгировано с функциональной молекулой нуклеиновой кислоты. Функциональные молекулы нуклеиновых кислот включают в себя антисмысловые молекулы, интерферирующие молекулы нуклеиновой кислоты (например, молекулы siRNA), аптамеры, рибозимы, образующие триплекс молекулы и наружные направляющие последовательности. Эти функциональные молекул нуклеиновых кислот могут действовать в качестве эффекторов, ингибиторов, модуляторов и стимуляторов специфической активности, обладаемой молекулой-мишенью, или функциональные молекулы нуклеиновых кислот могут обладать активностью *de novo*, независимой от каких-либо других молекул.

В другом варианте осуществления анти-TF-антитело этого изобретения конъюгировано с аптамером.

В другом варианте осуществления данное изобретение обеспечивает анти-TF-антитело, которое конъюгировано с рибозимом.

Для конъюгации анти-TF-антитела с конъюгированной молекулой (конъюгированными молекулами), такими как описаны выше, может быть использован любой способ, известный в данной области, в том числе способы, описанные Hunter et al., *Nature* 144, 945 (1962), David et al., *Biochemistry* 13, 1014 (1974), Pain et al., *J. Immunol. Meth.* 40, 219 (1981) и Nygren, *J. Histochem. and Cytochem.* 30, 407 (1982). Многочисленные типы цитотоксических соединений могут быть присоединены к белкам с использованием реакционноспособной группы на этом цитотоксическом соединении, или с использованием сшивающего агента. Обычная реакционноспособной группой, которая будет образовывать стабильную ковалентную связь *in vivo* с амином, является изотиоцианат (Means et al., *Chemical modifications of proteins* (Holden-Day, San Francisco 1971) pp. 105-110). Эта группа преимущественно взаимодействует с ϵ -

аминной группой лизина. Малеимид является обычно используемой реакционноспособной группой для образования стабильной *in vivo* ковалентной связи с сульфгидрильной группой на цистеине (Ji., *Methods Enzymol* 91, 580-609 (1983)). Моноклональные антитела обычно не способны образовывать ковалентные связи с ионами радиоактивных металлов, но они могут быть присоединены к антителу непосредственно с использованием хелатообразующих агентов, которые ковалентно связаны с этими антителами. Хелатообразующие агенты могут быть присоединены через аминные (Meares et al., *Anal. Biochem.* 142, 68-78 (1984)) и сульфгидрильные группы (Koyama, *Chem. Abstr.* 120, 217262t (1994)) аминокислотных остатков, а также через углеводные группы (Rodwell et al., *PNAS USA* 83, 2632-2636 (1986), Quadri et al., *Nucl. Med. Biol.* 20, 559-570 (1993)). Поскольку эти хелатообразующие агенты содержат два типа функциональных групп, один для связывания ионов металлов и другой для присоединения хелата к антителу, их обычно называют бифункциональными хелатообразующими агентами (Sundberg et al., *Nature* 250, 587-588 (1974)).

В одном варианте осуществления данное изобретение обеспечивает анти-TF-антитело, такое как анти-TF-антитело человека, конъюгированное с терапевтической частицей, такой как цитотоксин, химиотерапевтическое лекарственное средство, иммунодепрессант или радиоизотоп. Такие конъюгаты называют здесь "иммуноконъюгатами". Иммуноконъюгаты, которые включают в себя один или несколько цитотоксинов, называют "иммунотоксинами".

Цитотоксин или цитотоксический агент включает в себя любой агент, который является вредным для клеток (например, убивает клетки). В отношении описания этих классов лекарственных средств, которые хорошо известны в данной области, и их механизмов действия см. Goodman et al., *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis Of Therapeutics*, 8th Ed., Macmillan Publishing Co., 1990. Дополнительные способы, относящиеся к приготовлению иммунотоксинами антител, обеспечены, например, в Vitetta, *Immunol. Today* 14, 252 (1993) и US 5194594.

Подходящие терапевтические агенты для образования иммуноконъюгатов данного изобретения включают в себя таксол, цитохалазин В, грамицидин D, этидийбромид, эметин, митомицин, этопозид, тенопозид, винкристин, винбластин, колхицин, доксорубин, даунорубин, дигидроксиантрациндон, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол и пуромидин, антиметаболиты (такие как метотрексат, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, цитарабин, флударабин, 5-фторурацил, декарбазин, гидроксимочевина, аспарагиназа, гемцитабин, кладрибин), алкилирующие агенты (такие как мехлорэтамин, тиозпа, хлорамбуцил, мелфалан, кармустин (BSNU), ломустин (CCNU), циклофосфамид, бусульфан, дибромоманнит, стрептозотозин, дакарбазин (DTIC), прокарбазин, митомицин С, цисплатин и другие производные платины, такие как карбоплатин), антибиотики (такие как дактиномицин (ранее актиномицин), блеомицин, даунорубин (ранее дауномицин), доксорубин, идарубин, митрамицин, митомицин, митоксантрон, пликамимин, антрамицин (AMC)), дифтерийный токсин и родственные молекулы (такие как А-цепь дифтерийного токсина и ее активные фрагменты, и гибридные молекулы), рициновый токсин (такой как рицин А или дегликозилированный токсин цепи А рицина), холерный токсин, Shiga-подобный токсин (SLT-I, SLT-II, SLT-IV), LT-токсин, СЗ-токсин, Shiga-токсин, коклюшный токсин, столбнячный токсин, Bowman-Birk ингибитор протеаз, экзотоксин *Pseudomonas*, алорин, сапорин, модекцин, желанин, А-цепь абрина, А-цепь модекцина, альфа-сарцин, белки *Aleurites fordii*, белки диантина, белки *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII и PAP-S), ингибитор *Momordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор *Saponaria officinalis*, желонин, митгеллин, рестриктоцин, феномициновые и эномициновые токсины. Другие подходящие конъюгированные молекулы включают в себя рибонуклеазу (РНКазу), ДНКазу I, стафилококковый энтеротоксин-А, антивирусный белок фитолакки американской, дифтерийный токсин и эндотоксин *Pseudomonas endotoxin*. См., например, Pastan et al., *Cell* 47, 641 (1986) и Goldenberg, *Calif. A Cancer Journal for Clinicians* 44, 43 (1994). Терапевтические агенты, которые могут вводиться в комбинации с анти-TF-антителом данного изобретения, описанные в другом месте здесь, могут быть также кандидатами на терапевтические частицы, применимые для конъюгации с анти-TF-антителом данного изобретения.

В одном варианте осуществления анти-TF-антитело данного изобретения присоединено к линкеру-хелатору, например тиуксетану, который позволяет конъюгирование этого антитела с радиоактивным изотопом.

В следующем аспекте это изобретение относится к биспецифической молекуле, содержащей анти-TF-антитело этого изобретения, описанное здесь выше, и вторую связывающую специфичность, например связывающую специфичность в отношении эффекторной клетки человека, Fc-рецептора человека или T-клеточного рецептора, или связывающую специфичность в отношении другого эпитопа TF.

Биспецифические молекулы данного изобретения могут дополнительно включать в себя третью связывающую специфичность, в дополнение к анти-TF-связывающей специфичности и связывающей специфичности в отношении эффекторной клетки человека, Fc-рецептора человека или T-клеточного рецептора.

Примерные молекулы биспецифического антитела этого изобретения содержат:

(i) два антитела, одно со специфичностью в отношении TF и другое со специфичностью в отношении второй мишени, которые конъюгированы вместе,

(ii) единственное антитело, которое имеет одну цепь, специфическую в отношении TF, и вторую цепь, специфическую в отношении второй молекулы, и

(iii) одноцепочечное антитело, которое имеет специфичность в отношении TF и второй молекулы.

Обычно эта вторая мишень/вторая молекула является молекулой, другой, чем TF. В одном варианте осуществления эта вторая молекула является раковым антигеном/опухолеассоциированным антигеном, таким как карциноэмбриональный антиген (CEA), простата-специфический антиген (PSA), RAGE (почечный антиген), α -фетопротеин, CAMEL (CTL-узнаваемый антиген на меланоме), CT-антигены (такие как MAGE-B5, -B6, -C2, -C3 и D; Mage-12; CT10; NY-ESO-1, SSX-2, GAGE, BAGE, MAGE и SAGE), антигены муцина (например, MUC1, муцин-CA125, и т.д.), ганглиозидные антигены, тирозиназа, gp75, С-мус, Marti, MelanA, MUM-1, MUM-2, MUM-3, HLA-B7 и Ep-CAM. В одном варианте осуществления эта вторая молекула является ассоциированным с раком интегрином, таким как интегрин $\alpha 5\beta 3$. В одном варианте осуществления эта вторая молекула является ангиогенным фактором или другим ассоциированным с раком фактором роста, таким как эндотелиальный фактор роста сосудов (VEGF), фактор роста фибробластов (FGF), эпидермальный фактор роста (EGF), рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), ангиогенин и его рецепторы, в частности рецепторы, ассоциированные с прогрессированием рака (например, один из рецепторов HER1-HER4, c-met или RON). Другие ассоциированные с прогрессированием рака беки, обсуждаемые здесь, могут быть также подходящими вторыми молекулами.

В одном варианте осуществления биспецифическое антитело данного изобретения является диателом. Биспецифические антитела включают в себя также сшитые или "гетероконъюгатные" антитела. Например, одно из антител в гетероконъюгате может быть связано с авидином, а другое с биотином. Такие антитела были, например, предложены для нацеливания клеток иммунной системы на нежелательные клетки (см., например, US 4676980). Гетероконъюгатные антитела могут быть произведены с использованием любых подходящих сшивающих способов.

В следующем аспекте, это изобретение относится к экспрессирующему вектору, кодирующему антитело этого изобретения.

В одном варианте осуществления экспрессирующий вектор этого изобретения содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую одну или несколько аминокислотных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-112.

В другом конкретном варианте осуществления экспрессирующий вектор этого изобретения содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую одну или несколько аминокислотных последовательностей VH, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9, 1, 5, 13, 17, 21, 25, 29, 33, 37, 41, 45, 49 и 53.

В одном конкретном варианте осуществления экспрессирующий вектор этого изобретения содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую одну или несколько аминокислотных последовательностей VH CDR3, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52 и 56.

В другом конкретном варианте осуществления экспрессирующий вектор этого изобретения содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую одну или несколько аминокислотных последовательностей VL, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 65, 57, 61, 69, 73, 77, 81, 85, 89, 93, 97, 101 и 105.

В другом варианте осуществления экспрессирующий вектор этого изобретения содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую одну или несколько аминокислотных последовательностей VL CDR3, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 60, 64, 68, 72, 76, 80, 84, 88, 92, 96, 100, 104 и 108.

В одном конкретном варианте осуществления экспрессирующий вектор этого изобретения содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую варианты одной или нескольких приведенных выше аминокислотных последовательностей, причем указанные варианты имеют самое большее 25 аминокислотных модификаций, например 20, например, самое большее 15, 14, 13, 12 или 11 аминокислотных модификаций, например, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 из аминокислотных модификаций, таких как делеции или инсерции, предпочтительно замены, такие как консервативные замены, или по меньшей мере 80% идентичность любой из указанных последовательностей, такую как по меньшей мере 85% идентичность или 90% идентичность или 95% идентичность, например, 96% идентичность или 97% идентичность или 98% идентичность или 99% идентичность любой из вышеупомянутых аминокислотных последовательностей.

В следующем варианте осуществления этот экспрессирующий вектор содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую константный район легкой цепи, тяжелой цепи или как легкой, так и тяжелой цепей антитела, например антитела человека.

Такие экспрессирующие векторы могут быть использованы для рекомбинантного получения антител этого изобретения.

Экспрессирующий вектор в контексте данного изобретения может быть любым подходящим вектором, в том числе хромосомным, нехромосомным и содержащим синтетическую нуклеиновую кислоту

векторами (последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую подходящий набор регуляторных элементов экспрессии). Примеры таких векторов включают в себя производные SV40, бактериальные плазмиды, фаговые ДНК, бакуловирус, плазмиды дрожжей, векторы, полученные из комбинацией плазмид и фаговых ДНК, и векторы вирусных нуклеиновых кислот (РНК или ДНК). В одном варианте осуществления, кодирующая анти-TF-антитело нуклеиновая кислота содержится в голом ДНК- или РНК-векторе, включающем в себя, например, линейный элемент экспрессии (как описано, например, Sykes and Johnston, *Nat Biotech* 12, 355-59 (1997)), компактный состоящий из нуклеиновой кислоты вектор (описанный, например, в US 6077835 и/или WO 00/70087), плазмидный вектор, такой как pBR322, pUC 19/18 или pUC 118/119, "midge"-вектор нуклеиновой кислоты минимального размера (описанный, например, Schakowski et al., *Mol Ther* 3, 793-800 (2001)), или преципитированная конструкция вектора нуклеиновой кислоты, такая как CaP04-преципитированная конструкция (например, описанная в WO 00/46147, Benvenisty and Reshef, *PNAS USA* 83, 9551-55 (1986), Wigler et al., *Cell* 14, 725 (1978), и Corago and Pearson, *Somatic Cell Genetics* 2, 603 (1981)). Такие состоящие из нуклеиновых кислот векторы и их применение хорошо известны в данной области (см., например, US 5589466 и US 5973972).

В одном варианте осуществления, этот вектор подходит для экспрессии анти-TF-антитела в бактериальной клетке. Примеры таких векторов включают в себя экспрессирующие векторы, такие как BlueScript (Stratagene), pIN-векторы (Van Heeke & Schuster, *J Biol Chem* 264, 5503-5509 (1989), pET-векторы (Novagen, Madison WI) и т.п.).

Экспрессирующий вектор может быть также или альтернативно вектором, подходящим для экспрессии в дрожжевой системе. Может быть использован любой вектор, подходящий для экспрессии в дрожжевой системе. Подходящие векторы включают в себя, например, векторы, содержащие конститутивные или индуцируемые промоторы, такие как альфа-фактор, алкогольоксидаза и PGH (обзор: F. Ausubel et al., ed. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley InterScience New York (1987) и Grant et al., *Methods in Enzymol* 153, 516-544 (1987)).

Нуклеиновая кислота и/или вектор может также содержать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую последовательность секреции/локализации, которая может нацеливать на полипептид, такой как возникающая полипептидная цепь, на периплазматическое пространство или в среду культуры клетки. Такие последовательности известны в данной области и включают в себя пептиды лидера секреции или сигнальной последовательности, нацеливающие на органеллу последовательности (например, последовательности ядерной локализации, сигналы удерживания в ER, митохондриальные последовательности транспорта, хлоропластные последовательности транспорта), последовательности мембранной локализации/якорные последовательности (например, последовательности остановки транспорта, якорные GPI-последовательности), и т.п.

В экспрессирующем векторе этого изобретения кодирующие анти-TF-антитело нуклеиновые кислоты могут содержать любой подходящий промотор, энхансер и другие облегчающие экспрессию элементы или быть ассоциированы с любым подходящим промотором, энхансером и другими облегчающими экспрессию элементами. Примеры таких элементов включают в себя сильные промоторы экспрессии (например, промотор/энхансер CMV IE человека, а также промоторы RSV, SV40, SL3-3, MMTV и HIV LTR), эффективные последовательности поли (A) терминации, сайт инициации репликации для плазмидного продукта в *E. coli*, ген устойчивости к антибиотику в качестве селективируемого маркера и/или удобный сайт клонирования (например, полилинкер). Нуклеиновые кислоты могут также содержать индуцируемый промотор в противоположность конститутивному промотору, такому как CMV IE (квалифицированному в данной области специалисту будет понятно, что такие термины являются фактически дескрипторами степени экспрессии гена при определенных условиях).

В одном варианте осуществления кодирующий анти-TF-антитело экспрессирующий вектор может быть помещен в клетку-хозяина или в животное-хозяина и/или доставлен в клетку-хозяина или животное-хозяина посредством вирусного вектора.

Еще в одном дополнительном аспекте это изобретение относится к рекомбинантной эукариотической или прокариотической клетке-хозяину, такой как трансфектома, которая продуцирует антитело этого изобретения, определенное здесь, или к биспецифической молекуле этого изобретения, определенной здесь. Примеры клеток-хозяев включают в себя клетки дрожжей, бактериальные клетки и клетки млекопитающих, такие как клетки CHO или НЕК. Например, в одном варианте осуществления данное изобретение обеспечивает клетку, содержащую нуклеиновую кислоту, стабильно интегрированную в клеточный геном, которая содержит последовательность, кодирующую экспрессию анти-TF-антитела данного изобретения. В другом варианте осуществления данное изобретение обеспечивает клетку, содержащую неинтегрированную нуклеиновую кислоту, такую как плазида, космида, фагида или линейный элемент экспрессии, который содержит последовательность, кодирующую анти-TF-антитело этого изобретения.

В следующем аспекте это изобретение относится к гибридоме, которая продуцирует антитело этого изобретения, определенное здесь. Еще в одном аспекте это изобретение относится к трансгенному животному (не человеку), содержащему нуклеиновые кислоты, кодирующие тяжелую цепь человека и легкую цепь человека, где это животное или растение продуцирует антитело этого изобретения. Генериро-

вание таких гибридом и трансгенных животных было описано выше.

В следующем аспекте это изобретение относится к способу получения анти-TF-антитела этого изобретения, предусматривающему стадии:

- а) культивирование гибридомы или клетки-хозяина этого изобретения, как описано здесь выше, и
- б) очистки антитела этого изобретения из культуральных сред.

В дополнительном основном аспекте это изобретение относится к анти-TF-антителу, определенному здесь, или биспецифической молекуле, определенной здесь, для применения в качестве лекарственного средства.

Еще в одном аспекте это изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей анти-TF-антитело, определенное здесь, или биспецифическую молекулу, определенную здесь, и фармацевтически приемлемый носитель.

Эта фармацевтическая композиция может быть приготовлена с фармацевтически приемлемыми носителями или разбавителями, а также любыми известными адьювантами и эксципиентами в соответствии с общепринятыми способами, такими как способы, описанные в Remington The Science and Practice of Pharmacy, 19th Edition, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995.

Эти фармацевтически приемлемые носители или разбавители, а также любые другие известные адьюванты и эксципиенты должны быть подходящими для выбранного соединения данного изобретения и выбранного режима введения. Пригодность для носителей и других компонентов фармацевтических композиций определяется на основе отсутствия значительного отрицательного действия на желаемые биологические свойства выбранного соединения или фармацевтической композиции данного изобретения (например, менее, чем существенного действия (10% или менее относительного ингибирования, 5% или менее относительного ингибирования, и т.д.)

Фармацевтическая композиция данного изобретения может также включать в себя разбавители, наполнители, соли, буферы, детергенты (например, неионогенный детергент, такой как Твин-20 или Твин-40), стабилизаторы (например, сахара или не содержащие белка аминокислоты), консерванты, фиксаторы тканей, солюбилизаторы и/или другие материалы, подходящие для включения в фармацевтическую композицию.

Сообщалось, что в раковых клетках, таких как колоректальные раковые клетки человека, экспрессия TF находится под контролем 2 главных неопластических перерождающих событий, запускающих прогрессирование заболевания (активации онкогена K-ras и инактивации супрессора опухоли p53, способом, зависимым от МЕК/митоген-активируемой протеинкиназы (МАРК) и фосфатидилинозит-3-киназы (PI3K) (Yu et al. (2005) Blood 105: 1734.

Раковые клетки, сверхэкспрессирующие TF, могут быть особенно хорошими мишенями для анти-TF-антитела этого изобретения, так как может быть связано больше антител на клетку. Таким образом, в одном варианте осуществления раковый пациент, подлежащий лечению анти-TF-антителом этого изобретения, является пациентом, например, имеющим панкреатический рак, рак легких или колоректальный рак, который был диагностирован как имеющий одну или несколько мутаций в K-Ras и/или одну или несколько мутаций в p53 в их опухолевых клетках.

В альтернативном варианте осуществления пациент, который должен лечиться анти-TF-антителами этого изобретения, является пациентом, например, имеющим панкреатический рак, рак легких или колоректальный рак, который не имеет мутации в K-Ras. Без связывания себя какой-либо конкретной теорией авторы этого изобретения считают возможным, что некоторые опухолевые клетки, имеющие активацию K-Ras, являются менее чувствительными к лечению анти-TF-антителом, так как действия анти-TF-антител на механизмы внутриклеточной передачи сигналов могут быть менее эффективными в клетках, в которых K-Ras является активированным.

Фактические уровни доз активных ингредиентов в фармацевтических композициях данного изобретения могут варьироваться таким образом, чтобы получить количество активного ингредиента, которое является эффективным для достижения желаемой терапевтической реакции для конкретного пациента, конкретной композиции и схемы введения, без проявления токсичности для этого пациента. Выбранный уровень дозы будет зависеть от различных фармакокинетических факторов, включающих в себя активность конкретных используемых композиций данного изобретения, или его амида, способа введения, времени введения, скорости экскреции конкретного используемого соединения, продолжительности лечения, других лекарственных средств, соединений и/или материалов, используемых в комбинации с конкретными используемыми композициями, возраста, пола, массы, состояния, общего здоровья и предшествующей истории болезни подлежащего лечению пациента, и подобных факторов, хорошо известных в области медицины.

Эта фармацевтическая композиция может вводиться с использованием любого подходящего способа и режима. Подходящие способы введения соединения данного изобретения *in vivo* и *in vitro* хорошо известны в данной области и могут быть выбраны специалистом с обычной квалификацией в данной области.

В одном варианте осуществления фармацевтическую композицию данного изобретения вводят парентерально.

Фразы "парентеральное введение" и "вводимые парентерально", используемые здесь, означают способы, другие, чем энтеральное (тонкокишечное) и местное введение, обычно посредством инъекции, и включают в себя эпидермальную, внутривенную, внутримышечную, интраартериальную, внутриоболочечную, интракапсулярную, интраорбитальную, интракардиальную, интрадермальную, интраперитонеальную, внутрисухожильную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, интракраниальную, интраторакальную, эпидуральную и интратермальную инъекцию и инфузию.

В одном варианте осуществления эту фармацевтическую композицию вводят внутривенной или подкожной инъекцией или инфузией.

Фармацевтически приемлемые носители включают в себя любые и все подходящие растворители, диспергирующие среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, агенты изотоничности, антиоксиданты и задерживающие абсорбцию агенты и т.п., которые являются физиологически совместимыми с соединением данного изобретения.

Примеры подходящих водных и неводных носителей, которые могут использоваться в фармацевтических композициях данного изобретения, включают в себя воду, солевой раствор, забуференный фосфатом солевой раствор, этанол, декстрозу, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т.п.) и их подходящие смеси, растительные масла, такие как оливковое масло, кукурузное масло, арахисовое масло, хлопковое масло и кунжутное масло, коллоидные растворы карбоксиметилцеллюлозы, трагакантовую камедь и инъецируемые органические эфиры, такие как этилолеат, и/или различные буферы. Другие носители хорошо известны в фармацевтических областях.

Фармацевтически приемлемые носители включают в себя стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для незапланированного приготовления стерильных инъекционных растворов или дисперсии. Применение таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ известно в данной области. За исключением случаев, когда любая обычная среда или агент несовместимы с этим активным соединением, рассматривается их использование в фармацевтических композициях данного изобретения.

Требуемая текучесть может поддерживаться, например, применением материалов покрытия, таких как лецитин, посредством поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсий и применением поверхностно-активных веществ.

Фармацевтические композиции данного изобретения могут также содержать фармацевтически приемлемые антиоксиданты, например, (1) водорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, цистеина гидрохлорид, натрия бисульфат, натрия метабисульфит, натрия сульфит и т.п.; (2) растворимые в масле антиоксиданты, такие как аскорбилпальмитат, бутилированный гидроксианизол (ВНА), бутилированный гидрокситолуол (ВНТ), лецитин, пропилгаллат, альфа-токоферол и т.п.; и (3) металл-хелатирующие агенты, такие как лимонная кислота, этилендиаминтретауксусная кислота (ЭДТА), сорбит, винная кислота, фосфорная кислота и т.п.

Фармацевтические композиции данного изобретения могут также содержать агенты изотоничности, такие как сахара, полиспирты, такие как маннит, сорбит, глицерин, или хлорид натрия, в этих композициях.

Фармацевтические композиции данного изобретения могут также содержать один или несколько адьювантов, подходящих для выбранного способа введения, таких как консерванты, увлажняющие агенты, эмульгирующие агенты, диспергирующие агенты, консерванты или буферы, которые могут увеличивать срок хранения или эффективность этой фармацевтической композиции. Соединения данного изобретения могут быть приготовлены с носителями, которые будут защищать это соединение против быстрого высвобождения, например формы контролируемого высвобождения, включающие в себя имплантаты, трансдермальные пластыри и микроинкапсулированные системы доставки. Такие носители могут включать в себя желатин, глицерилмоностеарат, глицерилдистеарат, биodeградируемые, биосовместимые полимеры, такие как этилен-винилацетат, полиангидриды, полигликолевую кислоту, коллаген, полиортоэфиры и полимолочную кислоту, одну или с воском, или другие материалы, хорошо известные в данной области. Способы приготовления таких готовых форм обычно известны квалифицированным в данной области специалистам. См., например, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

В одном варианте осуществления соединения данного изобретения могут быть приготовлены для гарантии правильного распределения *in vivo*. Фармацевтически приемлемые носители для парентерального введения включают в себя стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для незапланированного приготовления стерильных инъекционных растворов или дисперсии. Применение таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ известно в данной области. За исключением случаев, когда любая обычная среда или агент несовместимы с этим активным соединением, рассматривается их использование в фармацевтических композициях данного изобретения. Дополнительные активные соединения могут быть также включены в эти композиции.

Фармацевтические композиции для инъекции должны быть обычно стерильными и стабильными в условиях приготовления и хранения. Эта композиция может быть приготовлена в виде раствора, микро-

эмульсии, липосомы или другой упорядоченной структуры, подходящей для высокой концентрации лекарственного средства. Этот носитель может быть водным или неводным растворителем или дисперсионной средой, содержащей, например, воду, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т.п.), и их подходящие смеси, растительные масла, такие как оливковое масло, и инъеклируемые органические эфиры, такие как этилолеат. Требуемая текучесть может поддерживаться, например, применением материалов покрытия, таких как лецитин, посредством поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и применением поверхностно-активных веществ. Во многих случаях будет предпочтительным включение изотонических агентов, например сахаров, полиспиртов, таких как глицерин, маннит, сорби, или хлорид натрия, в этой композиции. Пролонгированная абсорбция инъеклируемых композиций может быть вызвана включением в эту композицию агента, который задерживает абсорбцию, например, моностеаратных солей, и желатина. Стерильные инъеклируемые растворы могут быть приготовлены включением активного соединения в требуемое количество в подходящем растворителе с одним ингредиентом или комбинацией ингредиентов, например, перечисленных выше, если необходимо, с последующей стерилизацией микрофильтрованием. Обычно дисперсии готовят включением активного соединения в стерильный носитель, который содержит базовую дисперсионную среду и требуемые другие ингредиенты, например, из ингредиентов, перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных инъеклируемых растворов примерами способов приготовления являются вакуумная сушка (лиофилизация), которая дает порошок этого активного ингредиента плюс любой дополнительный активный ингредиент из его предварительно стерильно отфильтрованного раствора.

Стерильные инъеклируемые растворы могут быть приготовлены включением активного соединения в требуемом количестве в подходящем растворителе с одним ингредиентом или комбинацией ингредиентов, например, перечисленных выше, если необходимо, с последующей стерилизацией микрофильтрованием. Обычно дисперсии готовят включением активного соединения в стерильный носитель, который содержит базовую дисперсионную среду и требуемые другие ингредиенты, например, из ингредиентов, перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных инъеклируемых растворов, примерами способов приготовления являются вакуумная сушка (лиофилизация), которая дает порошок этого активного ингредиента плюс любой дополнительный активный ингредиент из его предварительно стерильно отфильтрованного раствора.

Фармацевтическая композиция данного изобретения может содержать одно соединение данного изобретения или комбинацию соединений данного изобретения.

Как описано выше, в другом аспекте это изобретение относится к антителу этого изобретения, определенному здесь, или биспецифической молекуле этого изобретения, определенной здесь, для применения в качестве лекарственного средства.

Анти-TF-антитела этого изобретения могут быть использованы для ряда целей. В частности, антитела этого изобретения могут быть использованы для лечения различных форм рака. В одном аспекте моноклональные анти-TF-антитела этого изобретения используют для лечения различных типов солидного рака, таких как опухоли центральной нервной системы, рак головы и шеи, рак легких (такой как немелкоклеточный рак легких), рак молочной железы, эзофагеальный рак, рак желудка, печени и билиарный рак, рак поджелудочной железы, колоректальный рак, рак мочевого пузыря, рак почки, рак предстательной железы, эндометриальный рак, рак яичника, злокачественная меланома, саркома (мягких тканей ег. костей и мышц), опухоли неизвестного первичного происхождения (т.е. неизвестных первичных причин), лейкоз, рак костного мозга (такой как множественная миелома), острый лимфобластный лейкоз, хронический лимфобластный лейкоз и неходжкинская лимфома, рак кожи, глиома, рак головного мозга, матки и прямой кишки. Кроме того, аутоиммунное воспаление, такое как миопатии или рассеянный склероз, может быть мишенью моноклональных анти-TF-антител данного изобретения.

Моноклональные анти-TF-антитела данного изобретения могут быть также применимы для лечения гемостаза.

Связанные с раком гемостатические нарушения могут также быть мишенью данного изобретения.

Кроме того, заболевания с воспалением, такие как миопатии, ревматоидный артрит, остеоартрит, анкилозирующий спондилит, подагра, спондилартропатии, анкилозирующий спондилит, синдром Рейтера, псориатическая артропатия, энтеропатический спондилит, ювенильная артропатия, реактивная артропатия, инфекционный или постинфекционный артрит, туберкулезный артрит, вирусный артрит, грибковый артрит, сифилитический артрит, гломерулонефрит, почечное заболевание конечной стадии, муковисцидоз, хроническое обструктивное заболевание легких (COPD), астма, аллергическая астма, бронхит, острый бронхит, хронический бронхит, идиопатический пневмофиброз или рассеянный склероз могут быть мишенью моноклональных анти-TF-антител данного изобретения.

Моноклональные анти-TF-антитела данного изобретения могут быть также применимы для лечения гемостаза.

Ассоциированные с раком гемостатические нарушения могут быть также мишенью для данного изобретения.

Сосудистые заболевания, такие как васкулярный рестеноз, миокардиальное васкулярное заболева-

ние, церебральное васкулярное заболевание, ретинопатия и дегенерация желтого пятна, в том числе, но не только, влажная AMD, могут лечиться моноклональными анти-TF-антителами.

Моноклональные анти-TF-антитела данного изобретения могут быть также применимы для лечения пациентов с сердечно-сосудистым риском, таким как атеросклероз, гипертензия, диабет, дислипидемия и острый коронарный синдром, в том числе, но не только, острый инфаркт миокарда, инсульт.

Моноклональные анти-TF-антитела данного изобретения могут быть также применимы для ингибирования тромбоза, такого как DVT (тромбоз глубоких вен), ренальная эмболия, легочная эмболия, артериальный тромбоз, или для лечения тромбоза, встречающегося после артериального хирургического, периферического сосудистого шунтирования или шунтирования коронарной артерии, артериовенозного шунтирования, удаления имплантата, например, стента или катетера.

Моноклональные анти-TF-антитела данного изобретения могут быть также применимы для ингибирования почечного ишемического реперфузионного повреждения.

Моноклональные анти-TF-антитела данного изобретения могут быть также применимы для лечения гиперлипотеинемии, гиперпаратиреоза.

Моноклональные анти-TF-антитела данного изобретения могут быть также применимы для лечения васкулита, ANCA-положительного васкулита, болезни Бехчета.

Моноклональные анти-TF-антитела данного изобретения могут быть также применимы для блокирования индуцированной травмой респираторной недостаточности, такой как острый респираторный дистресс-синдром, острое легочное повреждение.

Моноклональные анти-TF-антитела данного изобретения могут быть также применимы для лечения различных тромбоэмболических нарушений, таких как нарушения, возникающие из ангиопластики, инфаркта миокарда, нестабильной стенокардии и стенозов коронарной артерии.

Моноклональные анти-TF-антитела данного изобретения могут быть также применимы в профилактическом плане для лечения TF-опосредованных осложнений, таких как сепсис или пневмония.

Моноклональные анти-TF-антитела данного изобретения могут быть также применимы в качестве профилактического лечения пациентов с атеросклеротическими сосудами при риске развития тромбоза.

Моноклональные анти-TF-антитела данного изобретения могут быть также применимы для лечения реакции трансплантат против хозяина.

Моноклональные анти-TF-антитела данного изобретения могут быть также применимы для увеличения приживления бета-клеток в трансплантации островковых клеток для предотвращения сердечной вазопатии (CAV), для предотвращения острого отторжения трансплантата.

Моноклональные анти-TF-антитела данного изобретения могут быть также применимы для лечения заболеваний, в которых присутствуют циркулирующие обнажающие тканевой фактор микрочастицы, таких как, но не ограничивающихся ими, сосудистый тромбоз, диабет типа II, AMI, легочная артериальная гипертензия.

Подобным образом это изобретение относится к способу ингибирования роста и/или пролиферации опухолевой клетки, экспрессирующей TF, предусматривающему введение индивидууму, нуждающемуся в этом, антитела или биспецифической молекулы этого изобретения. В одном варианте осуществления указанная опухолевая клетка участвует в раке, таком как рак предстательной железы, рак легкого (такой как немелкоклеточный рак легкого), рак молочной железы, колоректальный рак (такой как метастатический колоректальный рак), панкреатический рак, рак яичника, кожная меланома, лейкоэмический рак костного мозга, хронический лимфобластный лейкоз и неходжкинская лимфома, рак кожи, рак предстательной железы, глиома, рак головного мозга, почек, матки, мочевого пузыря и прямой кишки.

Это изобретение относится также к применению моноклонального антитела, которое связывается с TF человека, для приготовления лекарственного средства для лечения рака, такого как один из вышеупомянутых конкретных типов рака.

В одном варианте осуществления выбор пациентов, подлежащих лечению анти-TF-антителом, основан на уровне тканевого фактора (TF) в их моче и/или крови. В одном конкретном варианте осуществления пациент, подлежащий лечению, имеет относительно высокий уровень TF в моче и/или крови. Например, конкретный пациент, подлежащий лечению, может иметь уровень TF в моче, больший, чем 20 нг/мл, такой как больший, чем 40 нг/мл, например больший, чем 100 нг/мл, такой как больший, чем 200 нг/мл. Альтернативно или дополнительно уровень TF в сыворотке этих пациентов может быть большим, чем 100 пг/мл, таким как большим, чем 200 пг/мл. Он может быть определен при помощи ELISA.

В следующем варианте осуществления способов лечения данного изобретения эффективность лечения подвергается мониторингу во время этой терапии, например, в определенных временных точках. В одном варианте осуществления, эта эффективность может подвергаться мониторингу измерением уровня TF в моче или крови, например, при помощи ELISA. В другом варианте осуществления, эта эффективность может определяться визуализацией зоны заболевания, например, выполнением одного или нескольких PET-СТ-сканирований, например, с использованием меченого анти-TF-антитела, такого как меченое анти-TF-антитело данного изобретения. Кроме того, меченые анти-TF-антитела, такие как меченые анти-TF-антитела этого изобретения, могли бы использоваться для детектирования TF-продуцирующих опухолей, например, с использованием PET-СТ-сканирования.

Схемы введения доз в вышеуказанных способах лечения корректируются для обеспечения оптимальной желаемой реакции (например, терапевтической реакции). Например, могут вводиться единственный болюс, несколько разделенных доз на протяжении времени, или доза может пропорционально уменьшаться или увеличиваться, в соответствии с необходимостью терапевтической ситуации. Парентеральные композиции могут быть приготовлены в лекарственной унифицированной (стандартной) форме для облегчения введения и однородности дозы. Лекарственная стандартная форма обозначает в данном контексте физически дискретные единицы, подходящие в качестве унифицированных (стандартных) доз для субъектов, подлежащих лечению; каждая единица содержит заранее определенное количество активного соединения, рассчитанное для получения желаемого терапевтического эффекта, в ассоциации с требуемым фармацевтическим носителем. Указание в отношении лекарственных стандартных форм данного изобретения диктуются (и непосредственно зависят от них) (а) уникальных характеристик активного соединения и конкретного терапевтического эффекта, который должен быть достигнут, и (б) недостатков, имеющихся в области компаундирования такого активного соединения, для лечения в отношении чувствительности в индивидуумах.

Эффективные дозы и схемы введения этих доз для анти-TF-антител зависят от заболевания или состояния, подлежащего лечению, и могут быть определены лицами, квалифицированными в данной области. Примерный, неограничивающий диапазон для терапевтически эффективного количества соединения данного изобретения является диапазоном приблизительно 0,1-100 мг/кг, таким как приблизительно 0,1-50 мг/кг, например, приблизительно 0,1-20 мг/кг, таким как приблизительно 0,1-10 мг/кг, например, приблизительно 0,5, приблизительно таким как 0,3, приблизительно 1 или приблизительно 3 мг/кг.

Врач или ветеринар, имеющие обычную квалификацию в данной области, могут легко определить и прописать требуемое эффективное количество фармацевтической композиции. Например, врач или ветеринар мог бы начать с доз анти-TF-антитела, используемых в фармацевтической композиции, при уровнях, более низких, чем уровни, требуемые для достижения желаемого терапевтического эффекта, и постепенно увеличивать дозу, пока не будет достигнут желаемый эффект. Обычно, подходящая суточная доза композиции данного изобретения будет количеством этого соединения, которое является самой низкой дозой, эффективной для получения терапевтического эффекта. Такая эффективная доза будет обычно зависеть от вышеописанных факторов. Введение может быть внутривенным, внутримышечным, внутрибрюшинным или подкожным и вводимым, например, проксимально относительно участка мишени. Если желательно, эта эффективная суточная доза может вводиться в виде двух, трех, четырех, пяти, шести или более субдоз, вводимых отдельно при подходящих интервалах на протяжении дня, необязательно в стандартных лекарственных формах. Хотя соединение данного изобретения может вводиться отдельно, предпочтительно вводить это соединение в виде фармацевтической композиции, описанной выше.

В одном варианте осуществления, анти-TF-антитела могут вводиться инфузией в недельной дозе от 10 до 500 мг/м², например, от 200 до 400 мг/м². Такое введение может повторяться, например, 1-8 раз, например, 3-5 раз. Это введение может выполняться непрерывной инфузией на протяжении периода 2-24 ч, например, 2-12 ч.

В одном варианте осуществления, анти-TF-антитела могут вводиться медленной непрерывной инфузией на протяжении длительного периода, такого как более 24 ч, для уменьшения токсичных побочных действий.

В одном варианте осуществления, анти-TF-антитела могут вводиться в недельной дозе от 250 до 2000 мг, такой как, например, 300 мг, 500 мг, 700 мг, 1000 мг, 1500 мг или 2000 мг, до 8 раз, например, от 4 до 6 раз. Это введение может выполняться непрерывной инфузией на протяжении периода от 2 до 24 ч, например, от 2 до 12 ч. Такая схема может повторяться один или несколько раз, в случае необходимости, например, спустя 6 месяцев или 12 месяцев. Эта доза может быть определена или скорректирована измерением количества соединения данного изобретения в крови после введения, например, взятием биологической пробы и использованием антиидиотипических антител, которые нацелены на антигенсвязывающий район анти-TF-антител данного изобретения.

В одном варианте осуществления, анти-TF-антитела могут вводиться посредством поддерживающей терапии, например, один раз в неделю в течение периода 6 или более месяцев.

В одном варианте осуществления, анти-TF-антитела могут вводиться посредством схемы, включающей в себя одну инфузию анти-TF-антитела данного изобретения, с последующей инфузией анти-TF-антител данного изобретения, конъюгированного с радиоизотопом. Эта схема введения может быть повторена, например, спустя 7-9 дней.

В качестве неограничивающих примеров, лечение в соответствии с данным изобретением может быть обеспечено в виде суточной дозы соединения данного изобретения в количестве приблизительно 0,1-100 мг/кг, таком как 0,5, 0,9, 1,0, 1,1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 мг/кг, в день, по меньшей мере в один из дней 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, или 40, или альтернативно, по меньшей мере в одну из недель 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 после начала лечения, или любой их комбинации, с ис-

пользованием единственной дозы или разделенных доз каждые 24, 12, 8, 6, 4 или 2 ч, или любой их комбинации.

"Эффективное количество" для опухолевой терапии может быть также измерено по его способности стабилизировать прогрессирование заболевания. Способность соединения ингибировать рак, может оцениваться в системе модели животного, предсказывающей эффективность в опухолях человека. Альтернативно, это свойство композиции может оцениваться испытанием способности этого соединения ингибировать рост клеток или индуцировать апоптоз анализами *in vitro*, известными квалифицированному практикующему врачу. Терапевтически эффективное количество терапевтического соединения может уменьшать размер опухоли или другим образом ослаблять симптомы в субъекте. Специалист со средней квалификацией в данной области будет способен определять такие количества на основе таких факторов, как размер субъекта, тяжесть симптомов субъекта и выбранная конкретная композиция или выбранный конкретный способ введения.

Анти-TF-антитело может также вводиться профилактически для уменьшения риска развития рака, задержки начала появления события в прогрессировании рака и/или уменьшения риска рецидива, когда рак находится в ремиссии. Это может быть особенно применимо в пациентах, в которых трудно определить местоположение опухоли, о которой известно, что она присутствует, вследствие других биологических факторов.

Анти-TF-антитела могут также вводиться в комбинированной терапии, т.е. в комбинации с другими терапевтическими агентами, релевантными для подлежащего лечению заболевания или состояния. Таким образом, в одном варианте осуществления, антителосодержащее лекарственное средство предназначено для комбинирования с одним или несколькими дополнительными агентами, такими как цитотоксический, химиотерапевтический или антиангиогенный агент.

Такое комбинированное введение может быть одновременным, раздельным или последовательным. Для одновременного введения эти агенты могут вводиться в виде одной композиции или в виде отдельных композиций, соответственно. Таким образом, данное изобретение обеспечивает также способы лечения нарушения, включающего в себя клетки, экспрессирующие TF, как описано выше, предусматривающие введение анти-TF-антитела данного изобретения, комбинированного с одним или несколькими дополнительными терапевтическими агентами, описанными ниже.

В одном варианте осуществления, данное изобретение обеспечивает способ лечения нарушения, включающего в себя клетки, экспрессирующие TF в субъекте, предусматривающий введение терапевтически эффективного количества анти-TF-антитела данного изобретения и по меньшей мере одного химиотерапевтического агента субъекту, нуждающемуся в этом.

В одном варианте осуществления, данное изобретение обеспечивает способ лечения или предотвращения рака, предусматривающий введение терапевтически эффективного количества анти-TF-антитела данного изобретения и по меньшей мере одного химиотерапевтического агента субъекту, нуждающемуся в этом.

В одном варианте осуществления, данное изобретение обеспечивает применение анти-TF-антитела данного изобретения для приготовления фармацевтической композиции для введения по меньшей мере с одним химиотерапевтическим агентом для лечения рака.

В одном варианте осуществления, такой химиотерапевтический агент может быть выбран из анти-метаболита, такого как метотрексат, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, цитарабин, флударабин, 5-фторурацил, декарбазин, гидроксимочевина, аспарагиназа, гемцитабин, кладрибин и сходные агенты.

В одном варианте осуществления, такой химиотерапевтический агент может быть выбран из алкилирующего агента, такого как мехлорэтамин, тиоэпа, хлорамбуцил, мелфалан, кармустин (BSNU), ломустин (CCNU), циклофосфамид, бусульфан, дибромоманнит, стрептозотозин, дакарбазин (DTIC), прокарбазин, митомицин С, цисплатин и другие производные платины, такие как карбоплатин, и сходных агентов.

В одном варианте осуществления, такой химиотерапевтический агент может быть выбран из анти-митотического агента, такого как таксаны, например, доцетаксел и паклитаксел, и алкалоиды барвинка (Vinca), например, виндезин, винкристин, винбластин и винорелбин.

В одном варианте осуществления, такой химиотерапевтический агент может быть выбран из ингибитора топоизомеразы, такого как топотекан или иринотекан.

В одном варианте осуществления, такой химиотерапевтический агент может быть выбран из цитостатического лекарственного средства, такого как этопозид и тенипозид.

В одном варианте осуществления, такой химиотерапевтический агент может быть выбран из ингибитора фактора роста, такого как ингибитор ErbB1 (EGFR) (такой как Iressa, эрбитукс (цетуксимаб), тарцева и сходные агенты), ингибитора ErbB2 (Her2/neu) (такого как герцептин и сходные агенты), и сходных агентов.

В одном варианте осуществления, такой химиотерапевтический агент может быть выбран из ингибитора тирозинкиназы, такого как иматиниб (Glivec, Gleevec STI571), лапатиниб, PTK787/ZK222584 и сходные агенты.

В одном варианте осуществления, данное изобретение обеспечивает способ лечения нарушения,

включающего в себя клетки, экспрессирующие ТФ в субъекте, предусматривающий введение терапевтически эффективного количества анти-ТФ-антитела данного изобретения и по меньшей мере одного ингибитора ангиогенеза, неоваскуляризации и/или другой васкуляризации, субъекту, нуждающемуся в этом.

Примерами таких ингибиторов ангиогенеза являются ингибиторы урокиназы, ингибиторы матричной металлопротеазы (такие как маримастат, неовастат, BAY 12-9566, AG 3340, BMS-275291 и сходные агенты), ингибиторы миграции и пролиферации эндотелиальных клеток (такие как TNP-470, скваламин, 2-метоксиэстрадиол, комбретастатины, эндостатин, ангиостатин, пеницилламин, SCH66336 (Schering-Plough Corp, Madison, NJ), R115777 (Janssen Pharmaceutica, Inc, Titusville, NJ) и сходные агенты), антагонисты ангиогенных факторов роста (такие как ZD6474, SU6668, антитела против ангиогенных агентов и/или их рецепторы (такие как VEGF, bFGF и ангиопоэтин-1), талидомид, аналоги талидомида (такие как CC-5013), Sugen 5416, SU5402, антиангиогенный рибозим (такой как ангиозим), интерферон α (такой как интерферон $\alpha 2a$), сурамин и сходные агенты), ингибиторы VEGF-R-киназы и другие антиангиогенные ингибиторы тирозинкиназы (такие как SUO11248), ингибиторы эндотелий-специфического интегрин/передачи сигнала выживания (такие как витайксин и сходные агенты), антагонисты/хелаторы меди (такие как тетрапиомолибдат, каптоприл и сходные агенты), карбоксиамидотриазол (CAI), ABT-627, SM101, интерлейкин-12 (IL-12), IM862, PNU145156E, а также нуклеотидные молекулы, ингибирующие ангиогенез (такие как антисмысловая-VEGF-кДНК, кДНК, кодирующая ангиостатин, кДНК, кодирующая р53, и кДНК, кодирующая дефектный рецептор-2 VEGF) и сходные агенты.

Другими примерами таких ингибиторов ангиогенеза, неоваскуляризации и/или другой васкуляризации являются антиангиогенные производные гепарина и родственные молекулы (например, гепариназа III), темозоломид, NK4, ингибирующий миграцию макрофагов фактор (MIF), ингибиторы циклооксигеназы-2, ингибиторы индуцируемого гипоксией фактора 1, антиангиогенные изофлавоны сои, олтипраз, фумагилин и их аналоги, аналоги соматостатина, пентозанполисульфат, натрийтекогалан, далтепарин, тумстатин, тромбоспондин, NM-3, комбрестатин, канстатин, авастатин, антитела против других релевантных мишеней (такие как анти-альфа- v /бета-3-интегрин и анти-кининостагин-mAb) и сходные агенты.

В одном варианте осуществления терапевтическим агентом для применения в комбинации с анти-ТФ-антителом для лечения нарушений, описанных выше, может быть противораковый иммуноген, такой как раковый антиген/опухолеассоциированный антиген (например, молекула адгезии эпителиальных клеток (EPCAM/TACSTD1), муцин 1 (MUC1), карциноэмбриональный антиген (CEA), опухолеассоциированный гликопротеин 72 (TAG-72), gp100, Melan-A, MART-1, KDR, RCAS1, MDA7, ассоциированные с раком вирусные вакцины (например, папилломавирусные вакцины человека), полученные из опухоли белки теплового шока и сходные агенты. Ряд других подходящих раковых антигенов/опухолеассоциированных антигенов, описанных в другом месте здесь, и сходных молекул, известных в данной области, могут также или альтернативно использоваться в таком варианте осуществления. Противораковые иммуногенные пептиды включают в себя также антиидиотипические "вакцины", такие как ВЕС2-антиидиотипические антитела, Митумомаб, SeaVac и родственные антиидиотипические антитела, антиидиотипическое антитело против MG7-антитела и другие противораковые антиидиотипические антитела (см., например, Birebent et al., *Vaccine*. 21(15), 1601-12 (2003), Li et al., *Chin Med J (Engl)*. 114(9), 962-6 (2001), Schmitt et al., *Hybridoma*. 13(5), 389-96 (1994), Maloney et al., *Hybridoma*. 4(3), 191-209 (1985), Raychardhuri et al., *J Immunol*. 137(5), 1743-9 (1986), Pohl et al., *Int J Cancer*. 50(6), 958-67 (1992), Bohlen et al., *Cytokines Mol Ther* 2(4), 231-8 (1996) и Maruyama, *J Immunol Methods*. 264(1-2), 121-33 (2002)). Такие антиидиотипические Ab могут быть необязательно конъюгированы с носителем, который может быть носителем с синтетической (обычно инертной) молекулой, белком (например, гемоцианином моллюска (KLH) (см., например, Ochi et al., *Eur J Immunol*. IZ(H), 1645-8 (1987)) или клеткой (например, эритроцитом - см., например, Wi et al., *J Immunol Methods*. 122(2), 227-34 (1989)).

В одном варианте осуществления, терапевтическим агентом для применения в комбинации с анти-ТФ-антителом для лечения нарушений, описанных выше, может быть противораковый цитокин, хемокин или их комбинация. Примеры подходящих цитокинов и факторов роста включают в себя IFN γ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-18, IL-23, IL-24, IL-27, IL-28a, IL-28b, IL-29, KGF, IFN α (например, IFN $\alpha 2b$), IFN β , GM-CSF, CD40L, Flt3-лиганд, фактор стволовых клеток, анцестим и TNF α . Подходящие хемокины могут включать в себя Glu-Leu-Arg (ELR)-негативные хемокины, такие как IP-10, MCP-3, MIG и SDF-1 α из семейств хемокинов CXC и C-C человека. Подходящие цитокины включают в себя производные цитокинов, варианты цитокинов, фрагменты цитокинов и слитые белки цитокинов. Эти и другие способы или применения, включающие в себя природно-встречающиеся пептид-кодирующие нуклеиновые кислоты, описанные здесь, могут альтернативно или дополнительно выполняться способами понижающей регуляции "активации генов" и гомологичной рекомбинации генов, таких как способы, описанные в US 5968502, US 6063630 и US 6187305 и EP 0505500.

В одном варианте осуществления терапевтическим агентом для применения в комбинации с анти-ТФ-антителом для лечения нарушений, описанных выше, может быть регулятор контроля клеточного цикла/апоптоза (или "регулирующий агент"). Регулятор контроля клеточного цикла/апоптоза может

включать в себя молекулы, которые имеют мишенью и модулируют регуляторы контроля клеточного цикла/апоптоза, такие как (i) cdc-25 (такой как NSC 663284), (ii) циклинзависимые киназы, которые сверхстимулируют клеточный цикл (такие как флавопиридол (L868275, HMR1275), 7-гидрокситауроспорин (UCN-01, KW-2401) и росковитин (R-росковитин, CYC202)), и (iii) модуляторы теломеразы (такие как BIBR1532, SOT-095, GRN163 и композиции, описанные, например, в US 6440735 и US 6713055). Неограничивающие примеры молекул, которые интерферируют с путями апоптоза, включают в себя TNF-родственный индуцирующий апоптоз лиганд (TRAIL)/апоптоз-2 лиганд (Apo-2L), антитела, которые активируют TRAIL-рецепторы, IFN и антисмысловой Bcl-2.

В одном варианте осуществления терапевтическим агентом для применения в комбинации с анти-TF-антителом для лечения нарушений, описанных выше, может быть гормональный регулирующий агент, такой как агенты, применимые для терапии, использующей анти-андроген и анти-эстроген. Примерами таких гормональных регулирующих агентов являются тамоксифен, идоксифен, фулвестрант, дролоксифен, торемифен, ралоксифен, диэтилстилбестрол, этинил-эстрадиол/этинил, антиандроген (такой как флутаминд/эулексин), прогестин (такой как капроат гидроксипрогестерона, медроксипрогестерон/провера, ацетат мегестрола/мегасе), адренкортикостероид (такой как гидрокортизон, преднизон), релизинг-фактор лютеинизирующего гормона (и его аналоги и другие LHRH-агонисты, такие как бусерелин и гoserелин), ингибитор ароматазы (такой как анастразол/аримидекс, аминоглутетимид/цитраден, экземестан), ингибитор гормона (такой как остреотид/сандостатин) и сходные агенты.

В одном варианте осуществления терапевтическим агентом для применения в комбинации с анти-TF-антителом для лечения нарушений, описанных выше, может быть анти-анергический агент (например, соединения с малыми молекулами, белки, гликопротеины или антитела, которые разрушают устойчивость к опухолевым и раковым антигенам). Примерами таких соединений являются молекулы, которые блокируют активность CTLA-4, такие как MDX-010 (ипилимумаб) (Phan et al., PNAS USA 100, 8372 (2003)).

В одном варианте осуществления терапевтическим агентом для применения в комбинации с анти-TF-антителом для лечения нарушений, описанных выше, может быть содержащая ген супрессора опухолей нуклеиновая кислота или вектор, такие как дефектный по репликации аденовирус, кодирующий человеческий рекомбинантный p53/SCH58500 дикого типа, и т.д.; антисмысловые нуклеиновые кислоты, нацеленные на онкогены, мутированные гены или гены с нарушенной регуляцией; или siRNA, нацеленные на мутированные гены или гены с нарушенной регуляцией. Примеры опухолевых супрессоров-мишеней включают в себя, например, BRCA1, RB1, BRCA2, DPC4 (Smad4), MSH2, MLH1 и DCC.

В одном варианте осуществления терапевтическим агентом для применения в комбинации с анти-TF-антителом для лечения нарушений, описанных выше, может быть противораковая нуклеиновая кислота, такая как антисмысловая нуклеиновая кислота (аугмерозен/03139), LY900003 (ISIS 3521), ISIS 2503, OGX-011 (ISIS 112989), LE-AON/LEraf-AON (инкапсулированный в липосоме антисмысловой олигонуклеотид с-raf/ISIS-5132), MG98, и другие антисмысловые нуклеиновые кислоты, которые нацелены на PKCa, кластерин, IGFBP, протеинкиназу A, циклин D1 или Bcl-2h.

В одном варианте осуществления терапевтическим агентом для применения в комбинации с анти-TF-антителом для лечения нарушений, описанных выше, может быть противораковая ингибиторная РНК-молекула (см., например, Lin et al., Curr Cancer Drug Targets. 1(3), 241-7 (2001), Erratum in: Curr Cancer Drug Targets. 3(3), 237 (2003), Lima et al., Cancer Gene Ther. 11(5), 309-16 (2004), Grzmil et al., Int J Oncol. 4(1), 97-105 (2004), Collis et al., Int J Radiat Oncol Biol Phys. 57(2 Suppl), S144 (2003), Yang et al., Oncogene. 22(36), 5694-701 (2003) и Zhang et al., Biochem Biophys Res Commun. 303(4), 1169-78 (2003)).

Композиции и способы комбинированного введения данного изобретения включают в себя также введение состоящих из нуклеиновой кислоты вакцин, таких как вакцины голой ДНК, кодирующей такие раковые антигены/опухолеассоциированные антигены (см., например, US 5589466, US 5593972, US 5703057, US 5879687, US 6235523 и US 6387888). В одном варианте осуществления этот комбинированный способ введения и/или комбинированная композиция содержит аутологичную вакцинную композицию. В одном варианте осуществления эта комбинированная композиция и/или способ комбинированного введения включает в себя вакцину цельных клеток или цитокинэкспрессирующих клеток (например, рекомбинантных IL-2-экспрессирующих фибробластов, рекомбинантных цитокин-экспрессирующих дендритных клеток и т.п.) (см., например, Kowalczyk et al., Acta Biochim Pol. 50(3), 613-24 (2003), Reilly et al., Methods Mol Med. 69, 233-57 (2002) и Tirapu et al., Curr Gene Ther. 2(1), 79-89 (2002). Другим примером такого подхода с аутологичными клетками, который может быть применим в комбинированных способах данного изобретения, является способ MyVax® Personalized Immunotherapy (ранее называемый GTOP-99) (Genitope Corporation - Redwood City, CA, USA).

В одном варианте осуществления данное изобретение обеспечивает комбинированные композиции и комбинированные способы введения, в которых анти-TF-антитело комбинируют или вводят совместно с вирусом, вирусными белками и т.п. Недостаточные в отношении репликации вирусы, которые обычно способны к одному или только небольшому количеству раундов репликации *in vivo*, и которые нацелены на опухолевые клетки, могут быть, например, применимыми компонентами таких композиций и способов. Такие вирусные агенты могут содержать нуклеиновые кислоты или быть ассоциированы с нуклеи-

новыми кислотами, которые содержат иммуностимуляторы, такие как GM-CSF и/или IL-2. Как природно онколитические, так и такие рекомбинантные онколитические вирусы (например, HSV-1-вирусы, реовирусы, недостаточный в отношении репликации и чувствительный к репликации аденовирус и т.д.) могут быть полезными компонентами таких способов и композиций. Таким образом, в одном варианте осуществления данное изобретение обеспечивает комбинированные композиции и комбинированные способы введения, где анти-TF-антитело комбинируют или вводят совместно с онколитическим вирусом. Примеры таких вирусов включают в себя аденовирусы и вирусы герпеса, которые могут быть или могут не быть модифицированными вирусами (см., например, Shah et al., *J Neurooncol.* 65(3), 203-26 (2003), Stiles et al., *Surgery.* 134(2), 357-64 (2003), Sunarmura et al., *Pancreas.* 28(3), 326-9 (2004), Teshigahara et al., *J Surg Oncol.* 85(1), 42-7 (2004), Varghese et al., *Cancer Gene Ther.* 9(12), 967-78 (2002), Wildner et al., *Cancer Res.* 59(2), 410-3 (1999), Yamanaka, *Int J Oncol.* 24(4), 919-23 (2004) и Zwiebel et al., *Semin Oncol.* 28(4), 336-43 (2001).

Комбинированные композиции и комбинированные способы введения данного изобретения могут также включать в себя способы "цельных клеток" и "адоптивные" способы иммунотерапии. Например, такие способы могут предусматривать инфузию или повторную инфузию клеток иммунной системы (например, инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL), таких как CD4⁺ и/или CD8⁺ Т-клетки (например, Т-клетки, увеличенные опухолеспецифическими антигенами и/или другими генетическими усилениями), антитело-экспрессирующих В-клеток или других антитело-продуцирующих/антигенпрезентирующих, дендритных клеток (например, анти-цитокин-экспрессирующих рекомбинантных дендритных клеток, дендритных клеток, культивируемых с DC-размножающим агентом, таким как GM-CSF и/или Flt3-L, и/или опухолеассоциированных нагруженных антигеном дендритных клеток), противоопухолевых NK-клеток, так называемых гибридных клеток или их комбинаций. В таких способах и композициях могут быть также использованы лизаты клеток. Клеточные "вакцины" в клинических испытаниях, которые могут быть применимы в таких аспектах, включают в себя лизаты клеток Canvaxin™, APC-8015 (Dendreon), HSPPC-96 (Antigenics) и Melacine®. Антигены выделяющиеся из раковых клеток, и их смеси (см., например, Bystryn et al., *Clinical Cancer Research Vol.* 7, 1882-1887, July 2001), необязательно смешанные с адьювантами, такими как квасцы, могут быть также компонентами в таких способах и комбинированных композициях.

В одном варианте осуществления анти-TF-антитело может доставляться пациенту в комбинации с применением способа внутренней вакцинации. Внутренней вакцинацией называют индуцированную смерть опухолевых или раковых клеток, такую как индуцированная лекарственным средством или индуцированная облучением смерть опухолевых клеток в пациенте, которая обычно приводит к вызыванию иммунной реакции, направленной в направлении (i) опухолевых клеток в целом, или (ii) частей опухолевых клеток, включающих в себя (a) секретированные белки, гликопротеины или другие продукты, (b) мембраноассоциированных белков или гликопротеинов или других компонентов, ассоциированных с мембранами или встроенных в мембраны, и/или c) внутриклеточных белков или других внутриклеточных компонентов. Индуцированная внутренней вакцинацией иммунная реакция может быть гуморальной (т.е. антитело-комплемент-опосредованной) или клеточно-опосредованной (например, развитие и/или увеличение эндогенных Т-лимфоцитов, которые узнают убитые внутри опухолевые клетки или их части). Кроме радиотерапии неограничиваемыми примерами лекарственных средств и агентов, которые могут быть использованы для индукции указанной смерти опухолевых клеток и внутренней вакцинации, являются общепринятые химиотерапевтические агенты, ингибиторы клеточного цикла, лекарственные средства против ангиогенеза, моноклональные антитела, апоптоз-индуцирующие агенты и ингибиторы трансдукции сигналов.

Примерами других противораковых агентов, которые могут быть релевантными в качестве терапевтических агентов для применения к комбинации с анти-TF-антителом для лечения нарушений, описанных выше, являются индуцирующие дифференцировку агенты, аналоги ретиноевой кислоты (такие как вся-транс-ретиноевая кислота, 13-цис-ретиноевая кислота и сходные агенты), аналоги витамина D (такие как сеокальцитол и сходные агенты), ингибиторы ErbB3, ErbB4, IGF-IR, рецептор инсулина, PDGFRa, PDGFRbeta, Flk2, Flt4, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, TRKA, TRKC, c-met, Ron, Sea, Tie, Tie2, Eph, Ret, Ros, Aik, LTK, PTK7 и сходные агенты.

Примерами других противораковых агентов, которые могут быть релевантными в качестве терапевтических агентов для применения к комбинации с анти-TF-антителом для лечения нарушений, описанных выше, являются катепсин В, модуляторы дегидрогеназной активности катепсина D, глутатион-S-трансфераза (такая как глутацилцистеинсинтетаза и лактатдегидрогеназа), и сходные агенты.

Примерами других противораковых агентов, которые могут быть релевантными в качестве терапевтических агентов для применения к комбинации с анти-TF-антителом для лечения нарушений, описанных выше, являются эстрамустин и эпирубицин.

Примерами других противораковых агентов, которые могут быть релевантными в качестве терапевтических агентов для применения к комбинации с анти-TF-антителом для лечения нарушений, описанных выше, являются HSP90-ингибитор, такой как 17-аллиламино-geld-анамицин, антитела, направлен-

ные против опухолевого антигена, такого как PSA, CA125, KSA и т.д., интегрин, такие как интегрин $\beta 1$, ингибиторы VCAM и сходные агенты.

Примерами других противораковых агентов, которые могут быть релевантными в качестве терапевтических агентов для применения в комбинации с анти-TF-антителом для лечения нарушений, описанных выше, являются ингибиторы кальцинейрина (такие как валсподар, PSC 833 и другие MDR-1 или ингибиторы п-гликопротеина), TOR-ингибиторы (такие как сиролимус, эверолимус и рапамицин) и ингибиторы механизмов "хоминга лимфоцитов" (такие как FTY720), и агенты с действиями на передачу клеточных сигналов, такие как ингибиторы молекул адгезии (например, анти-LFA, и т.д.).

В одном варианте осуществления, анти-TF-антитело этого изобретения используют в комбинации с одним или несколькими другими терапевтическими антителами, такими как бевацизумаб (Avastin®), залутумумаб, цетуксимаб (Erbix®), панитумумаб (Vectibix™), офатумумаб, занолimumаб, даратумумаб, ранибизумаб (Lucentis®), Зенапакс, Симулест, Ремикаде, Хумира, Тисабри, Ксолаир, рапива, нимотузумаб, ритуксимаб и/или трастузумаб (Herceptin®). Другими терапевтическими антителами, которые могут быть использованы в комбинации с антителом данного изобретения, являются антитела, описанные в WO 98/40408 (антитела, которые могут связывать нативный TF человека), WO 04/094475 (антитела, способные связываться с тканевым фактором человека, которые не ингибируют опосредованную фактором коагуляцию крови в сравнении с нормальным контролем плазмы), WO 03/093422 (антитела, которые связываются с более высокой афинностью с комплексом TF:VIa, чем с одним TF) или WO 03/037361 (агонист или антагонист TF для лечения, связанного с апоптозом).

В другом варианте осуществления, два или более различных антител этого изобретения, описанных выше, используют в комбинации для лечения заболевания. Особенно интересные комбинации включают в себя два или более неконкурирующих антител. Так, в одном варианте осуществления, пациента лечат комбинацией антитела cross-block-группы I, определенного здесь, с антителом группы II или III, определенных здесь. В другом варианте осуществления, пациента лечат комбинацией антитела группы II, определенной здесь ниже, с антителом группы III. Такая комбинированная терапия может приводить к связыванию увеличенного количества молекул антитела на клетку, что может привести к увеличению эффективности, например, посредством активации комплемент-опосредованного лизиса.

В одном варианте осуществления, анти-TF-антитело может вводиться в связи с доставкой одного или нескольких агентов, которые стимулируют доступ анти-TF-антитела или комбинированной композиции во внутреннюю часть опухоли. Такие способы могут, например, выполняться в ассоциации с доставкой релаксина, который способен релаксировать опухоль (см., например, US 6719977). В одном варианте осуществления, анти-TF-антитело данного изобретения может быть связано с проникающим в клетку пептидом (CPP). Проникающие в клетку пептиды и родственные пептиды (такие как сконструированные генной инженерией проникающие в клетку антитела) описаны, например, в Zhao et al., J Immunol Methods. 254(1-2), 137-45 (2001), Hong et al., Cancer Res. 60(23), 6551-6 (2000). Lindgren et al., Biochem J. 377(Pt 1), 69-76 (2004), Buerger et al., J Cancer Res Clin Oncol. 129(12), 669-75 (2003), Pooga et al., FASEB J. 12(1), 67-77 (1998) и Tseng et al., Mol Pharmacol. 62(4), 864-72 (2002).

В одном варианте осуществления, данное изобретение обеспечивает способ лечения нарушения, включающего в себя клетки, экспрессирующие TF в субъекте, предусматривающий введение терапевтически эффективного количества анти-TF-антитела и по меньшей мере одного противовоспалительного агента субъекту, нуждающемуся в этом.

В одном варианте осуществления, такой противовоспалительный агент может быть выбран из аспирина и других салицилатов, ингибиторов Cox-2 (таких как рофекоксиб и целекоксиб), NSAID (таких как ибупрофен, фенпрофен, напроксен, сулиндак, диклофенак, пироксикам, кетопрофен, дифлунисал, набуметон, этодлак, оксапрозин и индометацин), анти-IL6R-антител, анти-IL8-антител (например, антител, описанных в WO 2004058797, например, 10F8), анти-IL15-антител (например, антител, описанных в WO 03017935 и WO 2004076620), анти-IL15R-антител, анти-CD4-антител (например, занолimumаба), анти-CD11a-антител (например, эфализумаба), анти-альфа-4/бета-1-интегрин (VLA4)-антител (например, натализумаба), CTLA4-Ig для лечения воспалительных заболеваний, преднизолона, преднизона, модифицирующих заболевание антиревматических лекарственных средств (DMARD), таких как метотрексат, гидроксихлорохин, сульфасалазин, ингибиторов синтеза пиримидинов (такие как лефлуномид), блокирующих рецептор IL-1 агентов (таких как анакинра), блокирующих TNF- α агентов (таких как этанерцепт, инфликсимаб и адалимумаб) и сходных агентов.

В одном варианте осуществления, такой иммуносупрессивный и/или иммуномодуляторный агент может быть выбран из циклоспорина, азатиоприна, микофеноловой кислоты, микофенолата-мофетила, кортикостероидов, таких как преднизон, метотрексат, соли золота, сульфасалазина, антималярийных агентов, бреквинара, лефлуномида, мизорибина, 15-дезоксипергуалина, 6-меркаптопурина, циклофосфамида, рапамицина, такролимуса (FK-506), OKT3, анти-тимоцит-глобулина, тимопентина, тимосина- α и сходных агентов.

В одном варианте осуществления такой иммуносупрессивный и/или иммуномодуляторный агент может быть выбран из иммуносупрессивных антител, таких как антитела, связывающиеся с p75 IL-2-

рецептора, антител против CD25 (например, антител, описанных в WO 2004045512, таких как AB1, AB7, AB11 и AB12) или антител, связывающихся, например, с MHC, CD2, CD3, CD4, CD7, CD28, B7, CD40, CD45, IFN γ , TNF- α , IL-4, IL-5, IL-6R, IL-7, IL-8, IL-10, CD11a или CD58, или антител, связывающихся с их лигандами.

В одном варианте осуществления такой иммуносупрессивный и/или иммуномодуляторный агент может быть выбран из растворимых молекул IL-15R, IL-10 B7 (B7-1, B7-2, их вариантов и их фрагментов), ICOS и OX40, ингибитора отрицательного регулятора T-клеток (такого как антитело против CTLA4) и сходных агентов.

В одном варианте осуществления данное изобретение обеспечивает способ лечения нарушения, включающего в себя клетки, экспрессирующие TF в субъекте, предусматривающий введение терапевтически эффективного количества анти-TF-антитела и анти-C3b(i) антитела субъекту, нуждающемуся в этом.

В одном варианте осуществления терапевтический агент для применения в комбинации с анти-TF-антителами для лечения нарушений, описанных выше, может быть выбран из ингибиторов гистондеацетилазы (например, фенилбутирата) и/или агентов репарации ДНК (например, ферментов репарации ДНК и родственных композиций, таких как димерин).

Способы данного изобретения для лечения нарушения, описанного выше, предусматривающие введение терапевтически эффективного количества анти-TF-антитела, могут также предусматривать направленную против рака фотодинамическую терапию (например, противораковую лазерную терапию - которая необязательно может практиковаться с использованием фотосенсибилизирующего агента, см., например, Zhang et al., J Control Release. 93(2), 141-50 (2003)), противораковых использующих звуковую (акустическую) волну и ударную волну терапий (см., например, Kambe et al., Hum Cell. 10(1), 87-94 (1997)), и/или противораковой нутрицевтической терапии (см., например, Roudebush et al., Vet Clin North Am Small Anim Pract. 34(1), 249-69, viii (2004) и Rafi, Nutrition. 20(1), 78-82 (2004)). Подобным образом, анти-TF-антитело может быть использовано для приготовления фармацевтической композиции для лечения нарушения, описанного выше, для введения с направленной против рака фотодинамической терапией (например, противораковой лазерной терапией - которая необязательно может практиковаться с использованием фотосенсибилизирующего агента, противораковых использующих звуковую (акустическую) волну и ударную волну терапий и/или противораковой нутрицевтической терапии).

В одном варианте осуществления данное изобретение обеспечивает способ лечения нарушения, включающего в себя клетки, экспрессирующие TF в субъекте, предусматривающий введение терапевтически эффективного количества анти-TF-антитела, такого как анти-TF-антитело данного изобретения, и радиотерапии субъекту, нуждающемуся в этом.

В одном варианте осуществления это изобретение обеспечивает способ лечения или предотвращения рака, предусматривающий введение терапевтически эффективного количества анти-TF-антитела, такого как анти-TF-антитело данного изобретения, и радиотерапии субъекту, нуждающемуся в этом.

В одном варианте осуществления это изобретение обеспечивает применение анти-TF-антитела, такого как анти-TF-антитело данного изобретения, для приготовления фармацевтической композиции для лечения рака, подлежащей введению в комбинации с радиотерапией.

Радиотерапия может включать в себя облучение или ассоциированное введение радиофармацевтических препаратов пациенту. Источник излучения может быть либо наружным, либо внутренним относительно получающего лечение пациента (облучение может быть, например, в форме наружной лучевой терапии (EBRT) или близкофокусной лучевой терапии (BT)). Радиоактивные элементы, которые могут быть использованы в практике таких способов, включают в себя, например, радий, цезий-137, иридий-192, америций-241, золото-198, кобальт-57, медь-67, технеций-99, иодид-123, иодид-131 и индий-111.

В следующем варианте осуществления это изобретение обеспечивает способ лечения или предотвращения рака, предусматривающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества анти-TF-антитела, такого как анти-TF-антитело данного изобретения, в комбинации с хирургией.

Как описано выше, фармацевтическая композиция может вводиться в комбинированной терапии, т.е. в комбинации с одним или несколькими агентами, релевантными в отношении заболевания или состояния, подлежащего лечению, либо в виде отдельных фармацевтических композиций, либо с соединением данного изобретения, приготовленным совместно с одним или несколькими дополнительными терапевтическими агентами, описанными выше. Такие комбинированные терапии могут требовать более низких доз соединения данного изобретения и/или вводимых совместно агентов, что позволяет избежать возможных токсичностей или осложнений, ассоциированных с различными монотерапиями.

Кроме вышеописанных, другие интересные комбинированные терапии включают в себя следующее:

Для лечения панкреатического рака анти-TF-антитело в комбинации с антиметаболитом, таким как 5-фторурацил и/или гемцитабин, возможно в комбинации с одним или несколькими соединениями, выбранными из 90Y-hPAM4, ARC-100, ARQ-197, AZD-6244, бардоксолон-метила, циксутумумаба, (IMC-A12), фолитиксорина-кальция, GVAX, ипилимумаба, KRX-0601, мербарона, MGCD-0103, MORAb-009,

PX-12, Rh-Apo2L, TLN-4601, трабедресена, волоциксимаба (M200), WX-671, пеметрекседа, рубитекана, иксабепилона, OCX-0191Vion, 216586-46-8, лапатиниба, матуцумаба, иматиниба, сорафиниба, трастуцумаба, эксабепилона, эрлотиниба, авастина и цетуксимаба.

Для лечения колоректального рака анти-TF-антитело в комбинации с одним или несколькими соединениями, выбранными из гемцитабина, бевацицумаба, FOLFOX, FOLFIRI, XELOX, IFL, оксалиплатина, иринотекана, 5-FU/LV, Капецитабина, UFT, нацеленных на EGFR агентов, таких как цетуксимаб, панитумумаб, залутумумаб, нимотузумаб; ингибиторов VEGF или ингибиторов тирозинкиназы, таких как сунитиниб.

Для лечения рака молочной железы анти-TF-антитело в комбинации с одним или несколькими соединениями, выбранными из антиметаболитов, антрациклинов, таксанов, алкилирующих агентов, эпотилонов антигормональных (фемара, тамоксифена и т.д.), ингибиторов ErbB2 (Her2/neu) (таких как герцептин и сходные агенты), CAF/FAC (циклофосфамида, доксорубицина, 5FU) AC (цикло, доксо), CMF (цикло, метотрексата, 5FU), Доцетаксел+капецитабин, GT (паклитаксела, гемцитабина) FEC (цикло, эпи, 5FU) в комбинации с герцептином: Паклитаксел ±карбоплатин, Винорелбином, Доцетакселом, СТ в комбинации с лапатинибом; Капецитабина.

Для лечения мочевого пузыря анти-TF-антитело в комбинации с одним или несколькими соединениями, выбранными из антиметаболитов (гемцитабина, алимты, метотрексмата), аналогов платины (цисплатина, карбоплатина), ингибиторов EGF α (таких как цетуксимаб или залутумумаб), ингибиторов VEGF (таких как Авастин), доксорубицина, ингибиторов тирозинкиназы, таких как gefitinib, трастуцумаб, антимитотического агента, такого как таксаны, например паклитаксел, и алкалоидов Vinca, например винбластин.

Для лечения рака предстательной железы анти-TF-антитело в комбинации с одним или несколькими соединениями, выбранными из: гормональной/антигормональной терапий; таких как антиандрогены, агонисты рилизинг-фактора лютеинизирующего гормона (LHRH), и химиотерапевтических веществ, таких как таксаны, митоксатрон, эстрамустин, 5FU, винбластин, иксабепилон.

Для лечения рака яичника анти-TF-антитело в комбинации с одним или несколькими соединениями, выбранными из антимитотического агента, такого как таксаны, и алкалоидов Vinca, каеликса, топотекана.

Диагностические применения

Анти-TF-антитела этого изобретения могут быть также использованы для диагностических целей. Так, в дополнительном аспекте, это изобретение относится к диагностической композиции, содержащей анти-TF-антитело, определенное здесь.

В одном варианте осуществления, анти-TF-антитело данного изобретения может быть использовано *in vivo* или *in vitro* для диагностики заболеваний, в которых активированные клетки, экспрессирующие TF, играют активную роль в патогенезе, детектированием уровней TF или уровней клеток, которые содержат TF на поверхности их мембраны. Это может достигаться, например, контактированием тестируемой пробы, необязательно вместе с контрольной пробой, с анти-TF-антителом при условиях, которые позволяют образование комплекса между этим антителом и TF. Затем образование комплекса детектируют (например, с использованием ELISA). При использовании контрольной пробы вместе с тест-пробой, комплекс детектируют в обеих пробах, и любое статистически значимое различие в образовании комплексов между этими пробами является показателем присутствия TF в тест-пробе.

Таким образом, в следующем аспекте, это изобретение относится к способу детектирования присутствия антигена TF или клетки, экспрессирующей TF, в пробе, предусматривающему

контактирование пробы с анти-TF-антителом этого изобретения или биспецифической молекулой этого изобретения при условиях, которые позволяют образование комплекса между этим антителом и TF; и

анализ, был ли образован комплекс.

В одном варианте осуществления, этот способ выполняют *in vitro*.

Более конкретно, данное изобретение обеспечивает способы для идентификации и диагностики инвазивных клеток и тканей и других клеток-мишеней анти-TF-антител данного изобретения, и для мониторинга прогресса терапевтического лечения, состояния после лечения, риска развития рака, прогрессирования рака и т.п.

В одном примере такого диагностического анализа, данное изобретение обеспечивает способ диагностики уровня инвазивных клеток в ткани, предусматривающий образование иммунокомплекса между анти-TF-антителом и потенциальными TF-содержащими тканями и детектирование образования этого иммунокомплекса, где образование иммунокомплекса коррелирует с присутствием инвазивных клеток в этой ткани. Это контактирование может проводиться *in vivo*, с использованием меченых выделенных антител и стандартных способов визуализации, или может проводиться *in vitro* на пробах ткани.

Анти-TF-антитела могут быть использованы для детектирования TF-содержащих пептидов и пептидных фрагментов в любой подходящей биологической пробе любым подходящим способом. Примеры общепринятых иммуноанализов, обеспечиваемых данным изобретением, включают в себя, без ограничения, анализы ELISA, RIA, FACS, анализы резонанса плазмонов, хроматографические анализы, иммуно-

гистохимию ткани, Вестерн-блоттинг и/или иммунопреципитацию с использованием анти-TF-антитела. Анти-TF-антитела данного изобретения могут быть использованы для детектирования TF и TF-фрагментов из людей. Подходящие метки для анти-TF-антитела и/или вторичных антител, используемых в таких способах, включают в себя, без ограничения, различные ферменты, простетические группы, флуоресцентные материалы, люминесцентные материалы и радиоактивные материалы. Примеры подходящих ферментов включают в себя пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, β -галактозидазу или ацетилхолинэстеразу; примеры подходящих комплексов простетических групп включают в себя стрептавидин/биотин и авидин/биотин; примеры подходящих флуоресцентных материалов включают в себя умбеллиферон, флуоресцеин, дансилхлорид или фикоэритрин: пример люминесцентного материала включает в себя люминол; и примеры подходящего радиоактивного материала включают в себя ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S и ^3H .

Анти-TF-антитела могут также анализироваться в биологической пробе конкурентным иммуноанализом, использующим стандарты TF-пептида, меченые детектируемым веществом, и немеченое анти-TF-антитело. В таком анализе объединяют биологическую пробу, меченый стандарт (стандарты) TF-пептида и анти-TF-антитела и определяют количество меченого TF-стандарта, связанного с немеченым анти-TF-антителом. Количество TF-пептида в биологической пробе обратно пропорционально количеству меченого стандарта TF, связанного с анти-TF-антителом.

Анти-TF-антитела применимы, в частности, в визуализации опухолей *in vivo*. Визуализация *in vivo* опухолей, ассоциированных с TF, может выполняться любым подходящим способом. Например, ^{99}Tc -мечение или мечение другим испускающим гамма-лучи изотопом может быть использовано для мечения анти-TF-антител в опухолях или вторично меченых (например, FITC-меченых) комплексов анти-TF-антитело:TF из опухолей и визуализировано гамма-сцинтилляционной камерой (например, устройством Elscint Apex 409ECT), обычно с использованием низкоэнергетического коллиматора с высоким разрешением или низкоэнергетического коллиматора для всех целей. Затем окрашенные ткани оценивают на счет радиоактивности в качестве индикатора количества TF-ассоциированных пептидов в этой опухоли. Изображения, полученные с использованием таких способов, могут быть использованы для оценивания биораспределения TF в пациенте, млекопитающем или ткани, например, в контексте применения TF или TF-фрагментов в качестве биомаркера на присутствие инвазивных раковых клеток. Вариации этого способа могут включать в себя применение магнитно-резонансной томографии (MRI) для улучшения визуализации в сравнении со способами с гамма-камерой. Сходные способы и принципы иммуносцинтиграфии описаны, например, в Srivastava (ed.), *Radiolabeled Monoclonal Antibodies For Imaging And Therapy* (Plenum Press 1988), Chase, "Medical Applications of Radioisotopes," in Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 18th Edition, Gennaro et al., (eds.), pp. 624-652 (Mack Publishing Co., 1990), and Brown, "Clinical Use of Monoclonal Antibodies," in *Biotechnology And Pharmacy* 227-49, Pezzuto et al., (eds.) (Chapman & Hall 1993). Такие изображения могут быть также использованы для нацеленной доставки других противораковых агентов, примеры которых описаны здесь (например, апоптотические агенты, токсины или композиции программы СНОР химиотерапии). Кроме того, такие изображения могут также или альтернативно служить основой для хирургических способов для удаления опухолей. Кроме того, такие способы визуализации *in vivo* могут позволить идентификацию и локализацию опухоли в ситуации, когда пациент идентифицирован как имеющий опухоль (вследствие присутствия других биомаркеров, метастазов и т.д.), но опухоль не может быть идентифицирована традиционными аналитическими способами. Все из этих способов являются признаками данного изобретения.

Визуализация *in vivo* и другие диагностические способы, обеспеченные данным изобретением, применимы, в частности, в детектировании микрометастазов в пациенте-человеке (например, в пациенте, ранее не диагностируемым как имеющий рак, или в пациенте в период восстановления/ремиссии рака). Например, было продемонстрировано, что раковые клетки карциномы, которые составляют до 90% всех раковых клеток, окрашиваются очень хорошо композициями конъюгатов анти-TF-антитела. Детектирование моноклональными анти-TF-антителами, описанное здесь, может быть показателем присутствия карцином, которые являются агрессивными/инвазивными, а также или альтернативно обеспечивают указание на возможность использования родственного моноклонального анти-TF-антитела против таких микрометастазов.

В одном варианте осуществления данное изобретение обеспечивает способ визуализации *in vivo*, в котором анти-TF-антитело данного изобретения конъюгируют со стимулирующим детектирование непроницаемым для рентгеновских лучей агентом, это конъюгированное антитело вводят хозяину, например, инъекцией в кровоток, и анализируют присутствие и местоположение меченого антитела в этом хозяине. Посредством этого способа и любого другого диагностического способа, обеспеченного здесь, данное изобретение обеспечивает способ скрининга на присутствие ассоциированных с заболеванием клеток в пациенте-человеке или биологической пробе из пациента-человека.

Для диагностической визуализации радиоактивные изотопы могут быть связаны с анти-TF-антителом либо непосредственно, либо опосредованно с использованием промежуточной функциональной группы. Применимые промежуточные функциональные группы включают в себя хелаторы, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота и диэтилентриаминпентауксусная кислота (см., например, US

5057313).

Кроме радиоизотопов и непрозрачных для рентгеновских лучей агентов, диагностические способы могут выполняться с использованием анти-ТФ-антител, которые конъюгированы с красителями (например, с комплексом биотин-стрептавидин), контрастными агентами, флуоресцентными соединениями или молекулами и усиливающими агентами (например, парамагнитными ионами) для магнитно-резонансной томографии (MRI) (см., например, Патент США No. 6,331,175, который описывает способы MRI и получение антител, конъюгированных с усиливающим MRI агентом). Такие диагностические/детектирующие агенты могут быть выбраны из агентов для применения в магнитно-резонансной томографии и флуоресцентных соединений. Для загрузки анти-ТФ-антитела радиоактивными металлами или парамагнитными ионами может быть необходимой реакция его с реагентом, имеющим длинный хвост, к которому прикрепляют множество хелатирующих групп для связывания этих ионов. Такой хвост может быть полимером, таким как полилизин, полисахарид или другая дериватизованная или дериватируемая цепь, имеющая боковые группы, с которыми могут соединяться хелатирующие группы, такие как, например, порфирины, полиамины, кроун-эфиры, бистиосемикарбазоны, полиоксимы и т.п. группы, о которых известно, что они применимы для этой цели. Хелаты могут быть связаны с анти-ТФ-антителами с использованием стандартных химических способов.

Таким образом, данное изобретение обеспечивает диагностические конъюгаты анти-ТФ-антитела, в которых анти-ТФ-антитело конъюгировано с контрастным агентом (такой как агент для магнитно-резонансной томографии, компьютерной томографии или усиливающий ультразвуковой контраст агент) или радионуклидом, которым может быть, например, гамма-, бета-, альфа-, оже-электрон- или позитрон-испускающий изотоп.

В следующем аспекте это изобретение относится к набору для детектирования присутствия антигена ТФ или клетки, экспрессирующей ТФ, в пробе, содержащему анти-ТФ-антитело этого изобретения или биспецифическую молекулу этого изобретения; и инструкции для применения этого набора.

В одном варианте осуществления это изобретение обеспечивает набор для диагностики рака, содержащий контейнер, содержащий анти-ТФ-антитело, и один или несколько реагентов для детектирования связывания этого анти-ТФ-антитела с пептидом ТФ. Реагенты могут включать в себя, например, флуоресцентные метки, ферментативные метки или другие детектируемые метки. Эти реагенты могут также включать в себя вторичные или третичные антитела или реагенты для ферментативных реакций, где эти ферментативные реакции продуцируют продукт, который может быть визуализирован. В одном варианте осуществления данное изобретение обеспечивает диагностический набор, содержащий одно или несколько анти-ТФ-антител данного изобретения в меченой или немеченой форме в подходящем контейнере (подходящих контейнерах), реагенты для инкубаций для непрямого анализа и субстраты или дериватирующие агенты для детектирования в таком анализе, в зависимости от природы этой метки. Могут быть также включены контрольный реагент (контрольные реагенты) и инструкции для применения.

Диагностические наборы могут также поставляться для применения с анти-ТФ-антителом, таким как конъюгированное/меченое анти-ТФ-антитело, для детектирования клеточной активности или для детектирования присутствия пептидов ТФ в пробе ткани или хозяине. В таких диагностических наборах а также наборах для терапевтических применений, описанных здесь в другом месте, анти-ТФ-антитело обычно может быть обеспечено в лиофилизированной форме в контейнере, либо отдельно, либо вместе с дополнительными антителами, специфическими в отношении клетки-мишени или пептида-мишени. Обычно включены также фармацевтически приемлемый носитель (например, инертный разбавитель) и/или его компоненты, такие как Трис, фосфатный или карбонатный буфер, стабилизаторы, консерванты, биоциды, инертные белки, например, сывороточный альбумин, или т.п. (обычно в отдельном контейнере для смешивания) и дополнительные реагенты (также обычно в отдельном контейнере (контейнерах)). В некоторых наборах включено также вторичное антитело, способное связываться с анти-ТФ-антителом, которое обычно присутствует в отдельном контейнере. Это второе антитело обычно конъюгировано с меткой и приготовлено способом, сходным со способом приготовления анти-ТФ-антитела данного изобретения. С использованием способов, описанных выше и в другом месте здесь, анти-ТФ-антитела могут быть использованы для определения субпопуляций раковых/опухолевых клеток и характеристики таких клеток и родственных тканей/роста.

Детектирование *in situ* может выполняться взятием гистологического образца из пациента и обеспечением предоставления комбинации меченых анти-ТФ-антител данного изобретения такому образцу. Это анти-ТФ-антитело данного изобретения может быть обеспечено нанесением или наслаиванием этого меченого анти-ТФ-антитела данного изобретения на биологическую пробу. Посредством применения такой процедуры можно определить не только присутствие ТФ или ТФ-фрагментов, но также распределение таких пептидов в испытываемой ткани (например, в контексте оценивания распространения раковых клеток). С использованием данного изобретения квалифицированные в данной области специалисты легко поймут, что любой из большого разнообразия гистологических способов (таких как процедуры окрашивания) могут быть модифицированы для достижения такого детектирования *in situ*.

В дополнительном аспекте это изобретение относится к антиидиотипическому антителу, которое связывается с анти-ТФ-антителом этого изобретения, описанным здесь.

Антиидиотипическое (Id) антитело является антителом, которое узнает уникальные детерминанты, обычно ассоциированные с антигенсвязывающим сайтом антитела. Id-антитело может быть получено иммунизацией животного того же самого вида и генетического типа, что и источник анти-TF-mAb, с использованием mAb, к которому было получено анти-Id. Иммунизированное животное обычно может узнавать и реагировать на идиотипические детерминанты иммунизирующего антитела продуцированием антитела против этих идиотипических детерминант (анти-Id-антитела). Такие антитела описаны, например, в US 4,699,880. Такие антитела являются дополнительными признаками данного изобретения.

Анти-Id-антитело может быть также использовано в качестве "иммуногена" для индукции иммунной реакции в еще одном животном с получением так называемого анти-анти-Id-антитела. Анти-анти-Id может быть эпитопно идентичным исходному mAb, которое индуцировало анти-Id. Таким образом, с использованием антител к идиотипическим детерминантам mAb, можно идентифицировать другие клоны, экспрессирующие антитела идентичной специфичности. Анти-Id-антитела могут варьироваться (производя посредством этого варианты анти-Id-антитела) и/или дериватизоваться любым подходящим способом, таким как способы, описанные в другом месте здесь в отношении анти-TF-антител данного изобретения. Например, анти-Id-mAb могут быть связаны с носителем, таким как гемоцианин моллюска (KLH), и использованы для иммунизации мышей BALB/c. Сыворотки из этих мышей обычно будут содержать анти-анти-Id-антитела, которые имеют связывающие свойства, сходные, если не идентичные, со свойствами первоначального/исходного TF-антитела.

Данное изобретение иллюстрируется далее следующими примерами, которые не должны пониматься как дополнительное ограничение.

Примеры

Пример 1. Экспрессионные конструкции для тканевого фактора (TF)

Были генерированы полностью кодон-оптимизированные конструкции для экспрессии TF или его внеклеточных доменов в клетках HEK, NSO или CHO. Белки, кодируемые этими конструкциями, являются идентичными Genbank accession NP_001984 для TF. Эти конструкции содержали подходящие сайты рестрикции для клонирования и оптимальной последовательности Козака (Kozak, 1987). Эти конструкции клонировали в экспрессирующем векторе млекопитающих pEE13.4 (Lonza Biologies) (Bebington, Renner et al., 1992) с получением pEE13.4TF. Использовали ПЦР для амплификации части, кодирующей внеклеточный домен (ECD) (аминокислоты 1-251) TF, из этой синтетической конструкции, с добавлением С-концевой His-метки, содержащей 6 His-остатков (TFECDHis). Эту конструкцию клонировали в pEE13.4 и полностью секвенировали для подтверждения правильности этой конструкции.

Пример 2. Транзиторная экспрессия в клетках HEK-293F

Клетки Freestyle™ 293-F (субклон HEK-293, адаптированный к суспензионному росту и химически определенной среде Freestyle, (HEK-293F)) получали из Invitrogen и трансфицировали подходящей ДНК-плазмидой с использованием 293фектина (Invitrogen) в соответствии с инструкциями изготовителя. В случае экспрессии антитела, коэкспрессировали подходящие векторы тяжелой цепи и легкой цепи, как описано в примере 10.

Пример 3. Полустабильная экспрессия в клетках NSO

pEE13.4TF стабильно трансфицировали в клетках NSO и отбирали стабильные клетки на рост в отсутствие глутамин и в присутствии 7,5 мкМ метилсульфоксимида (MSX). Пул клонов выращивали в суспензионной культуре с поддержанием давления отбора. Пулы тестировали на экспрессию TF FACS-анализом и хранили для последующего использования.

Пример 4. Стабильная экспрессия в клетках CHO

pEE13.4TF стабильно трансфицировали в клетках CHO-K1SV (Lonza Biologies) и стабильные клоны отбирали на рост в отсутствие глутамин и в присутствии 50 мкМ MSX. Отдельные клоны выскребали и размножали и тестировали на экспрессию TF FACS-анализом, как описано ниже. Высокоэкспрессирующие клоны отбирали и хранили для последующего использования.

Пример 5. Очистка His-меченого TF

TFECDHis экспрессировали в клетках HEK-293F. His-метка в TFECDHis позволяет очистку аффинной хроматографией с иммобилизованным металлом. В этом процессе, хелатор, фиксированный на хроматографическую колонку, загружали Co^{2+} -катионами. TFECDHis-содержащий супернатант инкубируют с этой смолой в периодическом режиме (т.е. в растворе). His-меченый белок связывается сильно с гранулами смолы, тогда как другие белки, присутствующие в супернатанте, не связываются сильно. После инкубирования эти гранулы извлекают из супернатанта и упаковывают в колонку. Эту колонку промывают для удаления слабо связанных белков. Затем сильно связанные TFECDHis-белки элюируют буфером, содержащим имидазол, который конкурирует со связыванием His к Co^{2+} . Элюент удаляют из этого белка сменой буфера на обессоливающей колонке.

Пример 6. Процедура иммунизации трангенных мышей

Мышей NuMaB иммунизировали каждые две недели с чередованием иммунизации 5×10^6 полустабильными трансфицированными NSO-TF-клетками или 20 мкг TFECDHis-белком. В целом выполняли восемь иммунизаций, четыре внутривенных (IV) и четыре подкожных (SC) иммунизации в основа-

нии хвоста. Первую иммунизацию клетками выполняли в полном адьюванте Фрейнда (CFA; Difco Laboratories, Detroit, MI, USA). Для всех других иммунизаций, клетки инъецировали IP в ЗФР и TFECDFHis инъецировали SC с использованием неполного адьюванта Фрейнда (IFA; Difco Laboratories, Detroit, MI, USA). Когда было обнаружено, что сывороточные титры являются достаточными (было обнаружено, что разведение сыворотки 1/50 является положительным в анализе антигенспецифического скрининга, как описано в примере 7, по меньшей мере на 2 последовательных проводимых каждые две недели событиях скрининга), мышей дополнительно иммунизировали дважды внутривенно (IV) 10 мкг TFECDFHis-белка в 100 мкл ЗФР, за 4 и 3 дня перед слиянием. Первую иммунизацию клетками выполняли в CFA, для всех других (7) иммунизаций клетки инъецировали IP в ЗФР. Когда было обнаружено, что титры являются достаточными, мышей иммунизировали дополнительно дважды IV с 1×10^6 транзитивно полустабильно трансфицированными NSO-TF-клетками в 100 мкл ЗФР, за 4 и 3 дня перед слиянием.

Когда было обнаружено, что сывороточные титры являются достаточными (при определении, описанном выше), мышей дополнительно иммунизировали дважды внутривенно (IV) 10 мкг TFECDFHis-белка в 100 мкл ЗФР, за 4 и 3 дня перед слиянием.

Пример 7. Гомогенный антигенспецифический скрининг-анализ

Присутствие анти-TF-антител в сыворотках иммунизированных мышей или HuMab (моноклонального антитела человека) в культуральном супернатанте гибридомы или трансфектомы определяли гомогенными анализами антигенспецифического скрининга (четыре квадранта) с использованием Технологии флуориметрического микрообъемного анализа (FMAT; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Для этого использовали комбинацию 3 анализов на основе клеток и один анализ на основе гранул. В анализах на основе клеток, определяли связывание с TH1015-TF (клеток HEK-293F, транзитивно экспрессирующих TF; полученных, как описано выше) и A431 (которые экспрессируют TF на клеточной поверхности), а также клеток HEK293 дикого типа (которые не экспрессируют TF, отрицательный контроль). В анализе на основе гранул, определяли связывание с биотинилированным TF, связанным на грануле стрептавидина (SB1015-TF).

Пробы добавляли к клеткам/гранулам для связывания с TF. Затем связывание HuMab детектировали с использованием флуоресцентного конъюгата (Козье антитело против анти-IgG-Cy5-человека; Jackson ImmunoResearch). Мышиное антитело против анти-TF человека-антитела (ERL; связанное с Alexa-647 в Genmab) использовали в качестве положительного контроля, объединенную сыворотку HuMab-мыши и мышинное антитело chrompure-Alexa647 использовали в качестве отрицательных контролей. Эти пробы сканировали с использованием Системы Клеточного детектирования Applied Biosystems 8200 (8200 CDS) и использовали "счет x флуоресценция" для считывания.

Пример 8. Генерирование гибридомы HuMab

Мышей HuMab с достаточным развитием антигенспецифического титра (определяемого, как описано выше) эвтаназировали и собирали селезенку и лимфатические узлы, фланкирующие брюшную аорту и полую вену. Слияние спленоцитов и клеток лимфатического узла с миеломной клеточной линией мыши выполняли электрослиянием с использованием Системы электрослияния CEEF 50 (Cyto Pulse Sciences, Glen Burnie, MD, USA), по существу в соответствии с инструкциями изготовителя. Отбор и культивирование полученных гибридом HuMab выполняли на основе стандартных протоколов (например, как описано в Coligan J. E., Bierer, B. E., Margulies, D. H., Shevach, E. M. and Strober, W., eds. *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, Inc., 2006).

Пример 9. Масс-спектрометрия очищенных антител

Малые аликвоты 0,8 мл содержащего антитело супернатанта из 6-луночной или Hyperflask фазы очищали с использованием колонок PhyTip, содержащих Белок G-смола (PhyNexus Inc., San Jose, USA) на рабочей станции Sciclone ALH 3000 (Caliper Lifesciences, Hopkinton, USA). Колонки PhyTip использовали в соответствии с инструкциями изготовителя, но буферы заменяли: буфером связывания ЗФР (B.Braun, Medical B. V., Oss, Netherlands) и буфером элюции 0,1 М Глицин-HCl pH 2,7 (Fluka Riedel-de Haen, Buchs, Germany). После очистки, пробы нейтрализовали 2 М Трис-HCl pH 9,0 (Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, Netherlands). Альтернативно, в некоторых случаях очищали большие объемы культуральных супернатантов с использованием белок А-аффинной колоночной хроматографией.

После очистки пробы помещали в 384-луночный планшет (Waters, планшет с квадратными лунками на 100 мкл, part# 186002631). Пробы дегликозилировали в течение ночи при 37°C N-гликозидазой F (Roche cat no 11365177001. Добавляли ДТТ (15 мг/мл) (1 мкл на лунку и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Пробы (5 или 6 мкл) обессоливали на Acquity UPLC™ (Waters, Milford, USA) с BEH300 C18, 1,7 мкм, колонка 2,1×50 мм при 60°C. MQ-воду и ацетонитрил категории LC-MS (Biosolve, cat no 01204101, Valkenswaard, The Netherlands) с 0,1% муравьиной кислотой в обоих случаях (Fluka, cat no 56302, Buchs, Germany), использовали в качестве элюентов А и В соответственно. Масс-спектры времяпролетной ионизации в электроспее регистрировали в неавтономной системе на масс-спектрометре micrOTOF™ (Bruker, Bremen, Germany), работающем в режиме положительных ионов. Перед анализом шкалу 900-3000 m/z калибровали с настраивающей смесью ES (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Масс-спектры подвергали деконволюции (обращению свертки) с использованием программы DataAnalysis™ v.

3.4 (Bruker) с использованием алгоритма поиска Максимальной энтропии для молекулярных масс между 5 и 80 кДа.

После деконволюции полученные массы тяжелой и легкой цепей для всех проб сравнивали для нахождения дубликатных антител. В сравнении тяжелых цепей учитывали возможное присутствие вариантов с С-концевыми лизинами. Это приводило к перечню уникальных антител, где уникальность определяется как уникальная комбинация тяжелой и легкой цепей. В случае нахождения дубликатных антител, использовали результаты из других тестов для решения, который был самым лучшим материалом, с которым следует продолжать эксперименты.

MS-анализ молекулярных масс тяжелых и легких цепей 118 TF-специфических гибридом давал 70 уникальных антител (уникальных комбинаций тяжелая цепь/легкая цепь). Их характеризовали в ряде функциональных анализов, идентифицирующих 14 основных кандидатов, TF-специфических антител.

Пример 10. Анализ последовательности вариабельных доменов анти-TF-HuMab и клонирование в экспрессирующие векторах

Тотальную РНК анти-TF-HuMab получали из 5×10^6 гибридомных клеток и 5'-RACE-Комплементарную ДНК (кДНК) получали из 100 нг тотальной РНК, с использованием набора для амплификации кДНК SMART RACE (Clontech), в соответствии с инструкциями изготовителя. Кодировующие районы VH (вариабельного района тяжелой цепи) и VL (вариабельного района легкой цепи) амплифицировали при помощи ПЦР и клонировали в вектор pCR-Blunt II-TOPO (Invitrogen) с использованием набора для клонирования Zero Blunt PCR (Invitrogen). Для каждого HuMab, секвенировали 16 клонов VL и 8 клонов VH. Эти последовательности приведены в Списке последовательностей и на фиг. 1 здесь.

Табл. 1А и табл. 1В (ниже) дают обзор информации последовательностей антител и наиболее гомологичных последовательностей зародышевой линии.

Таблица 1А. Гомологии тяжелых цепей

Ab	V-ГЕН и аллель	идентичность V-района, %	J-ГЕН и аллель	D-GENE и аллель	CDR-IMGT длины
003	IGHV1-69*02, or IGHV1-69*04	97,57% (281/288 нт)	IGHJ4*02	IGHD6-13*01	[8,8,11]
098	IGHV1-69*04	95,49% (275/288 нт)	IGHJ3*02	IGHD2-21*02	[8,8,11]
011	IGHV3-23*01	96,53% (278/288 нт)	IGHJ4*02	IGHD1-26*01	[8,8,11]
017	IGHV3-23*01	98,26% (283/288 нт)	IGHJ2*01	IGHD2-15*01	[8,8,13]
092	IGHV3-23*01	97,92% (282/288 нт)	IGHJ4*02	IGHD7-27*01	[8,8,11]
101	IGHV3-23*01	95,83% (276/288 нт)	IGHJ4*02	IGHD7-27*01	[8,8,11]
025	IGHV3-30-3*01	97,57% (281/288 нт)	IGHJ4*02	IGHD7-27*01	[8,8,13]
109	IGHV3-30-3*01	96,18% (277/288 нт)	IGHJ4*02	IGHD7-27*01	[8,8,13]
111	IGHV3-30-3*01	97,57% (281/288 нт)	IGHJ4*02	IGHD3-10*01	[8,8,13]
114	IGHV3-33*01, or IGHV3-33*03	94,44% (272/288 нт)	IGHJ6*02	IGHD3-10*01	[8,8,12]
013	IGHV5-51*01	99,65% (287/288 нт)	IGHJ3*02	IGHD6-13*01	[8,8,19]

Таблица 1В. Гомологии легких цепей

Ab	V-ГЕН и аллель	идентичность V-района % (нт)	J-ГЕН и аллель	CDR-IMGT длины
003	IGKV1-13*02	99,28% (277/279 нт)	IGKJ4*01	[6.3.9]
011	IGKV1D-16*01	98,57% (275/279 нт)	IGKJ2*01	[6.3.9]
013	IGKV1D-16*01	98,57% (275/279 нт)	IGKJ5*01	[6.3.9]
092	IGKV1D-16*01	99,28% (277/279 нт)	IGKJ2*01	[6.3.10]
098	IGKV1D-16*01	100,00% (279/279 нт)	IGKJ2*01	[6.3.9]
101	IGKV1D-16*01	100,00% (279/279 нт)	IGKJ2*01	[6.3.10]
025	IGKV3-11*01	100,00% (279/279 нт)	IGKJ4*01	[6.3.9]
109	IGKV3-11*01	99,64% (278/279 нт)	IGKJ4*01	[6.3.9]
017	IGKV3-20*01	99,29% (280/282 нт)	IGKJ1*01	[7.3.9]
114	IGKV3-20*01	99,65% (281/282 нт)	IGKJ4*01	[7.3.8]

Ссылки на список последовательностей:

VH-район	
SEQ ID No: 1	VH 013
SEQ ID No: 2	VH 013 , CDR1
SEQ ID No: 3	VH 013 , CDR2
SEQ ID No: 4	VH 013 , CDR3
SEQ ID No: 5	VH 114
SEQ ID No: 6	VH 114 , CDR1

041176

SEQ ID No: 7	VH 114 , CDR2
SEQ ID No: 8	VH 114 , CDR3
SEQ ID No: 9	VH 011
SEQ ID No: 10	VH 011 , CDR1
SEQ ID No: 11	VH 011 , CDR2
SEQ ID No: 12	VH 011 , CDR3
SEQ ID No: 13	VH 017-D12
SEQ ID No: 14	VH 017-D12 , CDR1
SEQ ID No: 15	VH 017-D12 , CDR2
SEQ ID No: 16	VH 017-D12 , CDR3
SEQ ID No: 17	VH 042
SEQ ID No: 18	VH 042 , CDR1
SEQ ID No: 19	VH 042 , CDR2
SEQ ID No: 20	VH 042 , CDR3
SEQ ID No: 21	VH 092-A09
SEQ ID No: 22	VH 092-A09, CDR1
SEQ ID No: 23	VH 092-A09, CDR2
SEQ ID No: 24	VH 092-A09, CDR3
SEQ ID No: 25	VH 101
SEQ ID No: 26	VH 101 , CDR1
SEQ ID No: 27	VH 101 , CDR2
SEQ ID No: 28	VH 101 , CDR3
SEQ ID No: 29	VH 003
SEQ ID No: 30	VH 003 , CDR1
SEQ ID No: 31	VH 003 , CDR2
SEQ ID No: 32	VH 003 , CDR3
SEQ ID No: 33	VH 025
SEQ ID No: 34	VH 025 , CDR1
SEQ ID No: 35	VH 025 , CDR2
SEQ ID No: 36	VH 025 , CDR3
SEQ ID No: 37	VH 109
SEQ ID No: 38	VH 109 , CDR1
SEQ ID No: 39	VH 109 , CDR2
SEQ ID No: 40	VH 109 , CDR3
SEQ ID No: 41	VH 044
SEQ ID No: 42	VH 044 , CDR1
SEQ ID No: 43	VH 044 , CDR2
SEQ ID No: 44	VH 044 , CDR3
SEQ ID No: 45	VH 087-Lg6
SEQ ID No: 46	VH 087-Lg6, CDR1

041176

SEQ ID No: 47	VH 087-Lg6, CDR2
SEQ ID No: 48	VH 087-Lg6, CDR3
SEQ ID No: 49	VH 098
SEQ ID No: 50	VH 098 , CDR1
SEQ ID No: 51	VH 098 , CDR2
SEQ ID No: 52	VH 098 , CDR3
SEQ ID No: 53	VH 111
SEQ ID No: 54	VH 111 , CDR1
SEQ ID No: 55	VH 111 , CDR2
SEQ ID No: 56	VH 111 , CDR3

VL-район	
SEQ ID No: 57	VL 013
SEQ ID No: 58	VL 013 , CDR1
SEQ ID No: 59	VL 013 , CDR2
SEQ ID No: 60	VL 013 , CDR3
SEQ ID No: 61	VL 114
SEQ ID No: 62	VL 114 , CDR1
SEQ ID No: 63	VL 114 , CDR2
SEQ ID No: 64	VL 114 , CDR3
SEQ ID No: 65	VL 011
SEQ ID No: 66	VL 011 , CDR1
SEQ ID No: 67	VL 011 , CDR2
SEQ ID No: 68	VL 011 , CDR3
SEQ ID No: 69	VL 017-D12
SEQ ID No: 70	VL 017-D12 , CDR1
SEQ ID No: 71	VL 017-D12 , CDR2
SEQ ID No: 72	VL 017-D12 , CDR3
SEQ ID No: 73	VL 042
SEQ ID No: 74	VL 042 , CDR1
SEQ ID No: 75	VL 042 , CDR2
SEQ ID No: 76	VL 042 , CDR3
SEQ ID No: 77	VL 092-A09
SEQ ID No: 78	VL 092-A09, CDR1
SEQ ID No: 79	VL 092-A09, CDR2
SEQ ID No: 80	VL 092-A09, CDR3
SEQ ID No: 81	VL 101
SEQ ID No: 82	VL 101 , CDR1
SEQ ID No: 83	VL 101 , CDR2
SEQ ID No: 84	VL 101 , CDR3
SEQ ID No: 85	VL 003

SEQ ID No: 86	VL 003 , CDR1
SEQ ID No: 87	VL 003 , CDR2
SEQ ID No: 88	VL 003 , CDR3
SEQ ID No: 89	VL 025
SEQ ID No: 90	VL 025 , CDR1
SEQ ID No: 91	VL 025 , CDR2
SEQ ID No: 92	VL 025 , CDR3
SEQ ID No: 93	VL 109
SEQ ID No: 94	VL 109 , CDR1
SEQ ID No: 95	VL 109 , CDR2
SEQ ID No: 96	VL 109 , CDR3
SEQ ID No: 97	VL 044
SEQ ID No: 98	VL 044 , CDR1
SEQ ID No: 99	VL 044 , CDR2
SEQ ID No: 100	VL 044 , CDR3
SEQ ID No: 101	VL 087
SEQ ID No: 102	VL 087 , CDR1
SEQ ID No: 103	VL 087 , CDR2
SEQ ID No: 104	VL 087 , CDR3
SEQ ID No: 105	VL 098
SEQ ID No: 106	VL 098 , CDR1
SEQ ID No: 107	VL 098 , CDR2
SEQ ID No: 108	VL 098 , CDR3
SEQ ID No: 109	VL 111
SEQ ID No: 110	VL 111 , CDR1
SEQ ID No: 111	VL 111 , CDR2
SEQ ID No: 112	VL 111 , CDR3

Пример 11. Очистка антител

Культуральный супернатант фильтровали через фильтры 0,2 мкм без выходов и наносили на Белок А-колонки на 5 мл (rProtein A FF, Amersham Bioscience) и элюировали смесью 0,1 М лимонная кислота-NaOH, pH 3. Элюат немедленно нейтрализовали 2 М Трис-HCl, pH 9 и диализовали в течение ночи против 12,6 мМ NaH₂PO₄ 140 мМ NaCl, pH 7,4 (B. Braun). После диализа пробы стерильно фильтровали через фильтры 0,2 мкм без выходов. Чистоту определяли электрофорезом в ДСН-ПААГ и концентрацию измеряли нефелометрией и оптическую плотность измеряли при 280 нм. Очищенные антитела в виде аликвот хранили при -80°C. После оттаивания, аликвоты очищенных антител хранили при 4°C. Выполняли масс-спектрометрию для идентификации молекулярной массы тяжелых и легких цепей, экспрессируемых гибридами, как описано в примере 9.

Пример 12. Исследования перекрестной конкуренции антител с использованием сэндвич-ELISA

Лунки планшета ELISA покрывали в течение ночи при +4°C каждым из анти-TF-HuMab (0,5 или 2 мкг/мл 100 мкл на лунку), разбавленным в 3ФР. Эти лунки ELISA промывали 3ФР, блокировали в течение 1 ч при комнатной температуре 2% (o/o) куриной сывороткой (Gibco, Paisley, Scotland) в 3ФР и промывали опять 3ФР. Затем добавляли 50 мкл анти-TF-HuMab (10 мкг/мл) с последующим добавлением 50 мкл TFECDDHis (0,5 или 1 мкг/мл) (генерированных в Genmab; пример 5) и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре (при встряхивании). Планшеты промывали 3 раза 3ФРТ (3ФР+0,05% Твин) и инкубировали с разведенным 1:2000 анти-his-биотином ВАМ050 в течение одного часа при комнатной температуре (при встряхивании). Планшеты промывали и инкубировали с Стрептавидин-поли-HRP (Santquin, Amsterdam, The Netherlands) в течение 20 мин при комнатной температуре и опять промывали. Эту реакцию дополнительно проявляли с АВТС (Roche Diagnostics) при комнатной температуре в темноте, останавливали после 15 мин добавлением 2% (m/o) щавелевой кислоты и измеряли оптическую плотность при 405 нм.

Табл. 2 показывает, что могли быть идентифицированы 3 cross-block-группы (группы антител, конкурирующих друг с другом за связывание TFECDDHis), причем антитела 013, 044 и 087-Lg6 принадлежат к одной cross-block-группе (группе I), антитела 011, 017-D12, 42, 092-A09 и 101 принадлежат к другой cross-block-группе (группе II) и антитела 003, 025, 109 и 111 принадлежат к третьей cross-block-группе (группе III). Было обнаружено, что антитело 114 конкурирует за связывание TFECDDHis с антителами как cross-block-группы II, так и III. Связывание антитела 098 с TFECDDHis могло быть преодолено антителами как cross-block-группы II, так и III.

Таблица 2. Конкуренция анти-TF-антител за связывание с TFECDFHis

	I			II				
	0,5 мкг покрытия	2 мкг покрытия	2 мкг покрытия	0,5 мкг покрытия	0,5 мкг покрытия	0,5 мкг покрытия	0,5 мкг покрытия	0,5 мкг покрытия
Конкурирующее антитело (10 мкг/мл)	13	44	087-Lg6	11	017-D12	42	092-A09	101
13	19	5	28	101	100	98	110	98
44	93	40	29	109	96	96	103	109
087-Lg6	91	54	41	103	93	95	109	93
11	96	143	929	20	34	35	21	23
017-D12	97	143	995	14	25	20	8	12
42	99	143	931	18	28	27	10	17
092-A09	95	143	995	22	37	37	32	24
101	96	100	714	10	15	15	10	12
114	101	143	995	21	34	34	19	22
98	95	143	995	90	93	97	91	86
3	84	118	770	100	95	91	96	88
25	102	143	995	117	96	108	111	100
109	96	143	995	101	100	101	99	102
111	89	143	995	110	93	102	95	108
	II/III		III					
	0,5 мкг покрытия	2 мкг покрытия	0,5 мкг покрытия	0,5 мкг покрытия	0,5 мкг покрытия	2 мкг покрытия		
Конкурирующее антитело (10 мкг/мл)	114	98	3	25	109	111		
13	105	320	85	89	110	175		
44	105	330	80	108	94	175		
087-Lg6	107	210	88	105	103	115		
11	19	9	103	104	109	175		
017-D12	9	9	100	108	97	175		
42	24	8	98	93	111	155		
092-A09	22	10	103	108	101	175		
101	11	7	96	108	106	118		
114	13	9	100	47	26	5		
98	94	24	103	94	86	35		
3	102	10	33	22	10	6		
25	28	10	48	34	11	6		
109	44	9	62	51	17	6		
111	99	37	89	104	93	43		

Белые блоки указывают отсутствие конкуренции за связывание, светло-серые блоки указывают частичную конкуренцию за связывание и темно-серые блоки указывают конкуренцию за связывание с TFECDFHis.

Пример 13. Связывание анти-TF-HuMab с внеклеточным доменом TF в ELISA

Специфичность полученных анти-TF-HuMab оценивали при помощи ELISA. Планшеты ELISA (Microton; Greiner Bio-One) покрывали в течение ночи при +4°C 0,5 мкг/мл TFECDFHis в ЗФР, pH 7,4. Покрыватье планшеты ELISA опустошали и блокировали в течение одного часа при комнатной температуре 2% (o/o) куриной сывороткой (Gibco, Paisley, Scotland) в ЗФР и промывали в ЗФР, содержащем 0,05% Твин 20 (ЗФРТ). Затем, HuMab, серийно разведенные в ЗФРТС (ЗФР, дополненном 2% (o/o) куриной сывороткой и 0,05% (o/o) Твином-20), инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре в условиях встряхивания (300 об/мин). Связанные HuMab детектировали с использованием HRP-конъюгированных козьих антител против IgG человека (Jackson ImmunoResearch), разведенных 1:5000 в ЗФРТС, которые инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре в условиях встряхивания (300 об/мин). Эту реакцию дополнительно проявляли с ABTS (Roche Diagnostics) при комнатной температуре в темноте, останавливали после 15-30 мин добавлением 2% (m/o) щавелевой кислоты и затем измеряли оптическую плотность при 405 нм. HuMab-KLN (моноклональное антитело человека против KLN (гемоцианина моллюска)) использовали в качестве отрицательного контроля. Мышиное антитело против TF человека-антитело (ERL) использовали в качестве положительного контроля. (HRP-меченое антитело против IgG мыши в виде конъюгата). Кривые связывания анализировали с использованием нелинейной регрессии (сигмоидальная кривая доза-ответ с переменным наклоном) с использованием программного обеспечения GraphPad Prism V4.03.

Как видно на фиг. 3, все из этих анти-TF-антител связывали TFECDFHis. Величины EC₅₀ для этих HuMab являются средней величиной из 3 экспериментов и варьируются между 0,09 и 0,46 нМ (табл. 3 ниже).

Группа	HuMab TF	EC50 нМ
I	13	0,24
I	44	0,14
I	87-Lg6	0,09
II	11	0,16
II	017-D12	0,25
II	42	0,23
II	092-A09	0,18
II	101	0,28
II/III	98	0,13
II/III	114	0,17
III	3	0,46
III	25	0,34
III	109	0,27
III	111	0,11

Пример 14. Связывание анти-TF-HuMab с мембраносвязанным TF

Связывание анти-TF-HuMab с мембраносвязанным TF определяли FACS-анализом, с использованием TF-трансфицированных клеток CHO, или TF-экспрессирующих линий опухолевых клеток MDA-MB-231, (люцифераза-трансфицированных) A431 и Вх-PC3.

Клетки ресуспендировали в ЗФР (2×10^6 клеток/мл), помещали в 96-луночные V-донные планшеты (50 мкл на лунку). 50 мкл серийно разведенного HuMab в FACS-буфере (ЗФР, дополненном 0,1% БСА и 0,02% Na-азидом) добавляли к этим клеткам и инкубировали в течение 30 мин на льду. После промывания три раза FACS-буфером, добавляли 50 мкл фикоэритрина (PE)-конъюгированного козьего антитела против IgGFc человека (Jackson ImmunoResearch), разведенного 1:100 в FACS-буфере. После 30 мин на льду (в темноте), клетки промывали три раза и специфическое связывание HuMab детектировали проточной цитометрией на FACSCalibur (BD Biosciences). HuMab-KLN использовали в качестве отрицательного контроля. Мышиное анти-TF-антитело с последующим PE-конъюгированным антителом против IgGFc мыши использовали в качестве положительного контроля. Кривые связывания анализировали с использованием нелинейной регрессии (сигмоидальная кривая доза-ответ с переменным наклоном) с использованием программного обеспечения GraphPad San Diego, CA, USA).

Фиг. 4 показывает пример кривых связывания TF-специфических HuMab с клетками MDA-MB-231. Табл. 4 дает обзор величин EC₅₀ связывания TF-специфических HuMab с TF-трансфицированными клетками CHO (S1015-TF), MDA-MB-231, A431 и Вх-PC3.

Таблица 4. Обзор EC₅₀ и максимальных величин индекса средней флуоресценции (max MFI), определенных FACS-анализом связывания TF-специфических HuMabs с различными типами клеток

группа	HuMab TF	MDA-MB-231		Вх-PC3		A431		S1015-TF-012	
		EC50	Max MFI	EC50	Max MFI	EC50	Max MFI	EC50	Max MFI
I	13	1,58	2451	1,86	1305	8,04	3622	1,07	5207
I	44	0,87	1881	1,88	1136	1,45	2646	2,13	5021
I	87-Lg6	8,28	1107	7,19	1030	нт	нт	нт	нт
II	11	0,47	2143	1,01	1280	0,20	2606	1,32	5654
II	017-D12	1,33	2401	1,61	1422	1,24	3296	1,21	5792
II	42	0,25	1518	2,45	1701	нт	нт	нт	нт
II	092-A09	0,53	2290	0,84	1262	0,83	31,37	1,32	5409
II	101	0,85	2071	2,25	1220	3,16	2934	1,77	5859
II/III	98	0,99	1956	1,38	1151	1,40	2755	0,96	5229
II/III	114	0,47	2438	0,80	1407	0,90	3433	1,72	6095
III	3	3,20	1798	4,98	1106	6,94	2530	2,06	4247
III	25	0,69	2254	0,88	1320	5,19	3170	0,73	5808
III	109	2,16	2052	4,04	1324	1,74	3124	0,92	5629
III	111	1,03	1774	1,83	1128	2,88	3043	0,55	5353

Величины EC₅₀ приведены в нМ. Max MFI для клеток MDA-MB-231, ВхPC3 и A431 при 30 мкг/мл антитела, для S1015-TF при 7,5 мкг/мл антитела.

Пример 15. Ингибирование связывания FVIIa с TF

Ингибирование связывания FVIIa с TFECDFhis посредством TF-HuMab измеряли при помощи ELISA. Планшеты ELISA покрывали в течение ночи TFECDFhis (0,5 мкг/мл, 10 мкл на лунку). Планшеты опустошали, блокировали ЗФР, содержащим 2% (о/о) куриной сывороткой (1 ч при комнатной температуре), и снова опустошали. 4-кратные серийные разведения TF-HuMab или HuMab-KLN (отрицательный контроль) добавляли к этим лункам с последующим добавлением FVIIa при EC₅₀-концентрации (100 нМ), и планшеты инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре (при встряхивании, 300 об/мин). Планшеты промывали и инкубировали с кроличьим анти-FVIIa-антителом (2,5 мкг; Abcam), как описано выше. Планшеты промывали и инкубировали со свиным антителом-HRP против кроличьего IgG (1:2,500; DAKO). После промывания иммунные комплексы визуализировали с использованием ABTS в качестве субстрата. Реакцию останавливали добавлением 2% о/о щавелевой кислоты с последующим измерением оптической плотности при 405 нм с использованием ELISA-ридера. Концентрацию антитела, необходимую для получения 50% ингибирования (IC₅₀), рассчитывали с использованием программы

GraphPad prism (нелинейного регрессионного анализа).

Фиг. 5 показывает, что антитела из cross-block-групп II и III эффективно ингибировали связывание FVIIa с TF, в то время как антитела из cross-block-группы I не ингибировали (или ингибировали в гораздо меньшей степени) связывание FVIIa.

Таблица 5. Величины IC_{50} и величины максимального ингибирования (процент) ингибирования связывания FVII с TF TF-специфическими HuMab

Группа	HuMab TF	IC_{50} нМ	максимальное ингибирование
I	13	19,3	27
I	44	0,8	54
I	87-Lg6	na	35
II	11	1,1	91
II	017-D12	1,9	90
II	42	2,7	88
II	092-A09	1,5	90
II	101	0,6	84
II/III	98	0,8	85
II/III	114	1,3	90
III	3	1,9	89
III	25	2,1	90
III	109	1,7	90
III	111	1,7	79

Табл. 5 показывает величины IC_{50} и величины максимального ингибирования (процент) ингибирования связывания FVIIa с TF-специфическими HuMab.

Пример 16 Ингибирование фосфорилирования FVIIa-индуцированной ERK

После связывания фактора коагуляции VIIa (FVIIa) с TF, запускается фосфорилирование митоген-активируемой киназы (p42 и p44 MAPK или ERK1 и ERK2). Линия клеток эпидермоидной карциномы A431 экспрессирует высокие уровни TF, и после стимуляции фактором FVIIa оптимальное (3-5-кратное) фосфорилирование ERK (ERK-P), измеренное с использованием анализа AlphaScreen Surefire ERK (Perkin Elmer), индуцируется в пределах 10 мин.

Клетки A431 (30000 клеток на лунку) высевали в 96-луночные TC-планшеты и культивировали в течение ночи (37°C, 5% CO₂, влажность 85%) в бессывороточной среде (RPMI, содержащей 20% HSA и пенициллин/стрептомицин). Затем среду заменяли DMEM (без добавок) и клетки инкубировали в течение 1,5 ч. Добавляли 3-кратные серийные разведения TF-HuMab или HuMab-KLN и клетки инкубировали в течение 0,5 ч. Затем клетки стимулировали FVIIa при концентрации EC_{50} (50 нМ; 10 мин; 37°C, 5% CO₂, влажность 85%). Клетки промывали один раз ЗФР и лизировали с использованием 25 мкл лизисного буфера (Perkin Elmer, набор Surefire). Лизаты центрифугировали (3 мин, 330 ×g, RT). Четыре мкл супернатанта переносили в 384-луночные Проксипланшеты (Perkin Elmer). Добавляли 7 мкл смеси буфер для реакции/буфер для активации, содержащей гранулы AlphaScreen (Perkin Elmer, набор Surefire), и планшеты инкубировали в темноте в течение 2 ч при комнатной температуре. Планшеты считывали с использованием протокола "Surefire Plus" из EnVision-технологии.

Фиг. 6 показывает, что, при измерении с использованием анализа AlphaScreen Surefire ERK, антитело 013 не ингибирует FVIIa-индуцированное фосфорилирование, 044 и 111 умеренно ингибируют фосфорилирование ERK, а все другие антитела эффективно блокируют фосфорилирование ERK.

Табл. 6 показывает величины IC_{50} и величины максимального ингибирования (процент) ингибирования FVIIa-индуцированного фосфорилирования ERK TF-специфическими HuMab, измеренного с использованием анализа AlphaScreen Surefire ERK.

Таблица 6. Величины IC_{50} и величины максимального ингибирования (процент) ингибирования FVIIa-индуцированного фосфорилирования ERK (измеренного с использованием анализа AlphaScreen Surefire ERK) TF-специфическими HuMab

Группа	HuMab TF	IC_{50} нМ	% максимальное ингибирование
I	13	9,11	26
I	44	>66,6	45
I	87-Lg6	нт	нт
II	11	0,79	69
II	017-D12	2,01	65
II	42	нт	нт
II	092-A09	1,27	68
II	101	1,05	57
II/III	98	1,89	64
II/III	114	1,08	68
III	3	7,99	63
III	25	2,16	66
III	109	2,42	72
III	111	>66,6	52

Результаты, полученные в анализе AlphaScreen Surefire ERK, подтверждали Вестерн-блот-анализом

с использованием клеточных линий HaCaT и VxPC3. 30000 клеток на лунку высевали в DMEM, содержащей минимальные концентрации сыворотки (среда для голодания), и культивировали в течение ночи. Клетки дополнительно культивировали в течение 2 ч в DMEM без сыворотки, анти-TF-антитела добавляли во время последних 30 мин культивирования. Клетки стимулировали 0, 10 или 50 нМ FVIIa в течение 10 мин (37°C) и затем лизировали в буфере для лизиса клеток (50 мкл лизисного буфера на лунку, 30-60 мин лизиса в условиях встряхивания, при комнатной температуре). К каждой пробе добавляли 25 мкл ДСН-содержащего буфера для проб. Пробы наносили на гели электрофореза на ДСН-ПААГ, подвергали электрофорезу и блоттингу с использованием стандартных процедур для Вестерн-блоттинга. Блоты блокировали TBSTix-содержащим 5% не относящимся к анализу белком (ELK) в течение 1 ч при комнатной температуре. Блоты инкубировали с кроличьим анти-ERK-P-антителом (в течение ночи, 4°C). Блоты промывали TBSTix и инкубировали с антителом против кроличьего IgG-HRP (1 ч при комнатной температуре), промывали, проявляли с использованием субстрата HRP и визуализировали с использованием системы визуализации Optigo Ultima Imaging system (Isogen Life Sciences).

Фиг. 6а показывает результаты в клетках VxPC3 для субпанели антител. Фосфорилирование ERK, индуцированное 10 нМ FVIIa, не ингибировалось антителом 013, тогда как оно эффективно ингибировалось антителами 111, 044 и 025 (последнее в качестве примера для всех других TF-специфических HuMab, описанных здесь). Более сильно индуцированное фосфорилирование ERK (50 нМ FVIIa) не ингибировалось антителами 013, 111 и 044, но ингибировалось антителом 025.

Пример 17. Ингибирование FVIIa-индуцированного высвобождения IL-8

Способность TF-специфических HuMab ингибировать FVIIa-индуцированное высвобождение IL-8, тестировали с использованием клеток MDA-MB-231. Клетки высевали в 96-луночные планшеты (60000 клеток на лунку) и культивировали (в течение ночи, 37°C, 5% CO₂) в DMEM, содержащей CS, пируват натрия, L-глутамин, MEM NEAA и пенициллин/стрептомицин. Среда культуры ткани удаляли, клетки промывали дважды бессывороточной, содержащей высокую концентрацию кальция средой (DMEM, содержащей пенициллин/стрептомицин) и культивировали в этой среде в течение дополнительных 105 мин. Добавляли серийные разведения антител и клетки культивировали в течение 15 мин. Добавляли FVIIa (Novo Nordisk; конечная концентрация 10 нМ) и клетки культивировали в течение 5 ч. Супернатант удаляли и центрифугировали (300×g, RT). Концентрации IL-8 в супернатанте измеряли с использованием набора ELISA для IL-8 в соответствии с протоколом изготовителя (Sanquin).

Фиг. 7 показывает, что антитела из cross-block-групп II и III эффективно ингибировали FVIIa-индуцированное высвобождение IL-8 клетками MDA-MB-231, за исключением антитела 111 из cross-block-группы III. Антитела из cross-block-группы I (013, 044 и 87-Lg6), все, не ингибировали FVIIa-индуцированное высвобождение IL-8.

Табл. 7 показывает величины IC₅₀ и величины максимального ингибирования (процент) ингибирования FVIIa-индуцированного высвобождения IL-8 TF-специфическими HuMab.

Таблица 7. Величины IC₅₀ и величины максимального ингибирования (процент) ингибирования FVIIa-индуцированного высвобождения IL-8 TF-специфическими HuMab

Группа	HuMab TF	IC ₅₀ нМ	максимальное ингибирование
I	13	na	-0,3
I	44	74,6	17,2
I	87-Lg6	na	4,3
II	11	9,4	61,7
II	017-D12	9,0	65,8
II	42	14,9	53,7
II	092-A09	28,2	66,6
II	101	22,7	74,9
II/III	98	9,3	59,0
II/III	114	9,2	71,5
III	3	23,7	76,2
III	25	23,1	75,6
III	109	13,6	70,4
III	111	>200	40,1

Пример 18. Ингибирование генерирования Fxα

Способность TF-специфических HuMab ингибировать генерирование Fxα тестировали в анализе, в котором превращение FX в Fxα комплексом TF/FVIIa измеряют с использованием колориметрического Fxα-специфического субстрата. TF (Innovin) добавляли в плоскодонные 96-луночные планшеты вместе с серийным разведением TF-специфических HuMab, положительного контроля (анти-TF мыши) или отрицательного контроля (HuMab-KLH) (все разведенные в Neres-буфере, содержащем 3 мМ CaCl₂). Планшеты инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре и добавляли FVIIa (конечная концентрация 1 нМ) и FX (ERL; конечная концентрация 200 нМ). Планшеты инкубировали 30 мин при 37°C. 50 мкл из каждой лунки переносили в 96-луночный планшет, содержащий (предварительно нагретый, 37°C) стоп-буфер (5 мМ ЭДТА в 100 мл Neres-буфера). Добавляли Fxα-специфический субстрат Chromogenix-

2765 (Instrumentation Laboratory Company), планшеты инкубировали в течение 60 мин при 37°C и измеряли OD₄₀₅ им при 37°C.

Фиг. 8 показывает, что антитело 017-D12 сильно ингибировало генерирование FXa, 013 продемонстрировало промежуточное ингибирование и другие антитела не показали ингибирования генерирования FXa.

Табл. 8 показывает величины IC₅₀ и величины максимального ингибирования (процент) ингибирования генерирования FXa TF-специфическими HuMab.

Таблица 8. Величины IC₅₀ и величины максимального ингибирования (процент) ингибирования генерирования FXa TF-специфическими HuMab

группа	HuMab TF	IC50 нМ	максимальное ингибирование %
I	13	0,05	31
I	44	NA	3
I	87-Lg6	нт	нт
II	11	0,05	26
II	017-D12	0,28	84
II	42	нт	нт
II	092-A09	0,30	21
II	101	нт	нт
II/III	98	0,43	14
II/III	114	0,24	21
III	3	0,07	21
III	25	0,30	19
III	109	0,09	18
III	111	0,07	7

Пример 19. Ингибирование коагуляции крови

Ингибирование коагуляции крови TF-HuMab измеряли в анализе, определяющем TF-индуцированное время свертывания. Готовили смеси 17 мкл 100 мМ CaCl₂ (конечная концентрация 17 мМ), 10 мкл 1:100 инновина (конечная концентрация 1:1000), 23 мкл 1× FIEPES-буфера и 50 мкл серийно разведенного антитела в 96-луночных планшетах. Добавляли 50 мкл плазмы человека в лунки планшетов Immulon 2B (Thermo Electron). Добавляли 50 мкл приготовленных смесей антител в планшеты Immulon 2b и развитие коагуляции при 405 нм измеряли каждые 15 с в течение 25 мин с использованием кинетического планшет-ридера. Увеличение оптической плотности строили во времени и рассчитывали время свертывания (t1/2). Время свертывания строили в зависимости от концентрации антитела. IC₅₀ индуцированного антителом ингибирования коагуляции рассчитывали из этих данных нелинейным регрессионным анализом с использованием GraphPad Prism.

Фиг. 9 показывает, что антитела 044, 087 и 111 не ингибировали TF-индуцированную коагуляцию крови, тогда как все другие антитела ингибировали.

Табл. 9 показывает величины IC₅₀ ингибирования коагуляции крови TF-специфическими HuMab.

Таблица 9. Величины IC₅₀ ингибирования коагуляции крови TF-специфическими HuMab

группа	HuMab TF	IC50 нМ
I	13	0,6
I	44	NA
I	87-Lg6	NA
II	11	1,6
II	017-D12	2,6
II	42	1,5
II	092-A09	0,2
II	101	0,7
II/III	98	1,1
II/III	114	0,4
III	3	7,3
III	25	2,3
III	109	7,6
III	111	NA

Пример 20. Антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность

Приготовление клеток-мишеней:

TF-экспрессирующие клетки-мишени (5×10⁶ клеток Vx-PC3, клеток MDA-MB-231 или клеток A431) собирали, промывали (дважды в ЗФР, 1500 об/мин, 5 мин) и собирали в 1 мл культуральной среды RPMI 1640, дополненной сывороткой Cosmic Calf, пируватом натрия, L-глутамином, MEM NEAA и пенициллином/стрептомицином, к которой добавляли 100 мкКи ⁵¹Cr (Хром-51; Amersham Biosciences Europe GmbH, Roosendaal, The Netherlands). Эту смесь инкубировали во встряхивающейся водяной бане в течение 1 ч при 37°C. После промывания клеток (дважды в ЗФР, 1500 об/мин, 5 мин), эти клетки ресуспендировали в культуральной среде и жизнеспособные клетки считали способом вытеснения красителя трипанового синего. Жизнеспособные клетки доводили до концентрации 1×10⁵ клеток/мл.

Приготовление эффекторных клеток:

Периферические мононуклеарные клетки крови (PBMC) выделяли из свежих лейкоцитных пленок (Sanquin, Amsterdam, The Netherlands) с использованием стандартного центрифугирования в градиенте Фиколла в соответствии с инструкциями изготовителя (среда для отделения лимфоцитов; Lonza, Verviers, France). После ресуспендирования клеток в культуральной среде клетки считали способом вытеснения трипанового синего и доводили до концентрации 1×10^7 клеток/мл.

Установление ADCC:

50 мкл ^{51}Cr -меченых клеток-мишеней переносили в микротитрационные лунки и добавляли 50 мкл серийно разведенного антитела, разведенного в культуральной среде. Клетки инкубировали (RT, 15 мин) и добавляли 50 мкл эффекторных клеток, с получением отношения эффектор:мишень 100:1. Для определения максимального уровня лизиса, 100 мкл 5% Тритона-X100 добавляли вместо эффекторных клеток; для определения спонтанного уровня лизиса добавляли 100 мкл культуральной среды; для определения уровня независимого от антитела лизиса добавляли 50 мкл эффекторных клеток и 50 мкл культуральной среды). Затем клетки инкубировали в течение ночи при 37°C , 5% CO_2 . После центрифугирования этих клеток (1200 об/мин, 3 мин) 75 мкл супа переносили в микронные пробирки. Высвобождаемый ^{51}Cr считали в гамма-счетчике и процент опосредованного антителом лизиса рассчитывали следующим образом:

$$\left(\frac{\text{имп/мин пробы-имп/мин независимого от антител лизиса}}{\text{имп/мин максимального лизиса-имп/мин спонтанного лизиса}} \right) \times 100\%$$

где имп/мин является количеством импульсов в минуту.

Фиг. 10 показывает, что все тестируемые TF-HuMab индуцировали лизис клеток Vx-PC3 посредством ADCC, хотя и с различными эффективностями (EC_{50}).

Табл. 10 показывает величины EC_{50} (нМ) ADCC различных клеточных линий TF-специфическими HuMab.

Таблица 10. Величины EC_{50} (нМ) ADCC различных клеточных линий TF-специфическими HuMab

группа	HuMab TF	MDA-MB-231	Vx-PC3	A431
		EC_{50}	EC_{50}	EC_{50}
I	13	0,06	0,07	0,11
I	44	0,08	0,12	0,19
I	87-Lg6	nt	nt	nt
II	11	0,07	0,22	0,06
II	017-D12	0,14	0,13	0,18
II	42	nt	nt	nt
II	092-A09	0,11	0,13	0,22
II	101	0,10	0,09	0,01
II/III	98	0,15	0,02	0,07
II/III	114	0,07	0,07	0,08
III	3	0,29	0,17	0,58
III	25	0,24	0,15	0,16
III	109	0,12	0,06	0,13
III	111	0,84	0,22	1,56

Пример 21. Отложение комплемента

Отложение фрагментов комплемента C3c и C4c к TF-HuMab инкубированным клеткам-мишеням измеряли при помощи FACS-анализа. TF-экспрессирующие клетки-мишени (клетки Vx-PC3 или MDA-MB-231) высевали в 96-луночных круглодонных планшетах (1×10^5 клеток на лунку) в RPMI, содержащей 1% БСА. Добавляли антитело (30 мкг/мл) и клетки инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин. 25 мкл объединенной сыворотки человека добавляли в качестве источника комплемента, инактивированную нагреванием сыворотку человека использовали для определения спонтанного связывания комплемента. Клетки инкубировали при 37°C в течение 45 мин. Клетки промывали один раз и инкубировали с анти-C3c человека-FITC или анти-C4c человека-FITC (DAKO) в FACS-буфере и инкубировали в течение 30 мин на льду. Пробы анализировали с использованием FACS Canto.

Фиг. 11 показывает, что антитела из cross-block-группы I не индуцировали отложения C3c или C4c ни на клетках VxPC3, ни на клетках MDA-MB-231. Все тестированные антитела из cross-block-группы II не индуцировали отложения C3c и C4c, как и антитела из cross-block-группы III, за исключением антитела 003.

Пример 22. Исследования авидности/аффинности

Определение аффинности:

Связывание антител с TF анализировали резонансом поверхностных плазмонов в BIAcore 3000 (GE Healthcare). Для этого анализа использовали TFECDis. HuMab-антитела (500 резонансных единиц) иммобилизовали на сенсорном чипе CM-5 в соответствии с процедурой, рекомендуемой изготовителем. Вкратце, после активации с использованием EDC и NHS HuMab-антитело инъецировали на этой активированной поверхности CM-5 в 10 мМ ацетате натрия, pH в диапазоне от 4,0 до 5,5 при 5 мкл/мин с последующим добавлением 1 М этаноламина для дезактивации. Ряды концентраций TFECDis в HBS-EP-буфере инъецировали на иммобилизованные антитела при скорости потока 30 мкл/мин в течение 180 с. Регенерацию поверхности HuMab выполняли инъекцией 10 мМ Глицин-HCl или 10 мМ ацетат натрия pH

3,0. Кинетический анализ выполняли с использованием двойного ссылочного вычитания и модели 1:1 (langmuir) анализа связывания.

Табл. 11 показывает для большинства HuMab определенную аффинность в (суб) наномолярном диапазоне. Кинетические параметры не могли быть определены для всех антител. 044 действительно давал высокую вариацию скоростей диссоциации (k_d) и имел высокие вычеты, что означает, что подгонка этих кривых не была хорошей. 098, 111 и 087-Lg6 имели скорости диссоциации, которые были слишком высокими для измерения при помощи Biacore 3000. п.а. не оцениваемая $\geq 10^{-3} \text{ c}^{-1}$

Таблица. 11. Кинетические константы TF-HuMab для реактивности с TFECdHis - измерения аффинности

группа	HuMabTF	аффинность нМ	ka (1/Mc)	kd (1/c)
I	13	2.78	5.67E+05	1.57E-03
I	44	n.a.	8.77E+04	variable
I	87-Lg6	n.a.	5.91 E+05	n.a.
II	11	3.15	2.86E+05	9.02E-04
II	017-D12	2.55	1.02E+05	2.59E-04
II	42	4.22	1.64E+05	6.90E-04
II	092-A09	14.1	1.42E+05	2.00E-03
II	101	3.4	3.18E+05	1.07E-03
II/III	98	n.a.	2.90E+05	n.a.
II/III	114	11	1.77E+05	1.95E-03
III	3	4.51	2.33E+05	1.26E-03
III	25	1.97	3.29E+05	6.50E-04
III	109	4.75	1.65E+05	7.77E-04
III	111	n.a.	2.13E+05	n.a.

Определение avidности:

Связывание TF (TFECdHis) с TF-специфическими HuMab определяли в основном, как описано выше, причем TFECdHis являются иммобилизованными на сенсорном чипе CM-5 (300 резонансных единиц), и ряд концентраций антител Humab использовали для кинетического анализа. Кинетический анализ выполняли с использованием двойного ссылочного вычитания и модели 1:1 (langmuir) анализа связывания.

Табл. 12 показывает измерения avidности для антител 11, 98, 109 и 111. В то время как измерения аффинности для 98 и 111 показали высокие скорости диссоциации (выше пределов определения при помощи Biacore (т.е. $>10^{-3}$)), определение avidности выявило взаимодействия в наномолярном диапазоне.

Таблица 12. Кинетические константы TFECdHis для реактивности с TF-HuMab - измерения avidности

группа	HuMab TF	avidность нМ
II	11	0,47
II/III	98	4,85
III	109	0,01
III	111	0,11

Пример 23. Иммуногистохимический анализ связывания с нормальными тканями человека и панкреатическими опухолями

Связывание TF-HuMab с различными тканями человека, о которых известно, что они экспрессируют TF (ободочной кишки, сердца, почки, кожи, легкого и головного мозга) определяли иммуногистохимией (ИНС).

ИНС на замороженной ткани

Замороженные срезы ткани нарезают (толщиной 4-6 мкм) и фиксируют в ацетоне. Эндогенную тканевую пероксидазу (PO) блокируют и предметные стекла с тканями предынкубируют с нормальной сывороткой человека для предотвращения асептического связывания позднее наносимых антител с эндогенными Fc-рецепторами. Мышиные Ab, направленные против TF человека (и Ab мыши в качестве отрицательного контроля), наносят на эти ткани при оптимальном разведении и затем детектируют с использованием PowerVision-PO (козьих антител против IgG мыши/кролика)-PO). TF-специфические HuMab связывали с Fab' козьего антитела против IgG человека (Fc)-FITC и после этого наносят на предметные стекла с замороженными тканями при 3 разведениях, в том числе с заранее определенным оптимальным разведением. Затем комплекс HuMab-Fab-FITC детектируют кроличьим анти-FITC и PowerVision-PO. Активность PO визуализируют с использованием АЕС в качестве субстрата и ядра визуализируют гематоксилином. Окрашивание анализируют под яркочувствительным микроскопом.

ИНС с Ab мыши на фиксированной формалином и залитой в парафин (FFPE) ткани

Биопсии FFPE-ткани нарезают при 4 мкм, депарафинуют, блокируют в отношении эндогенной тканевой пероксидазы и подвергают восстановлению антигена ((pH6, цитратный буфер). Перед инкубированием с мышиным Ab тканевые предметные стекла предынкубируют с нормальной сывороткой человека для предотвращения асептического связывания с эндогенными Fc-рецепторами. Мышиные Ab,

направленные против TF человека (и Ab мыши в качестве отрицательного контроля), наносили на эти тканевые предметные стекла при оптимальном разведении и затем детектировали с использованием Powervision-PO (козжих антител против IgG мыши/кролика)-PO). Активность PO визуализировали с использованием АЕС в качестве субстрата и ядра визуализировали гематоксилином. Окрашивание анализировали под яркочувствительным микроскопом.

Фиг. 12 показывает пример связывания антитела 013 (положительное окрашивание), 011 (положительное окрашивание), 114 (положительное окрашивание) и 111 (промежуточное окрашивание) с клубочками почки. Антитело 098 и 044 не связывают клубочки.

Табл. 13 дает обзор результатов окрашивания для всех TF-HuMab во всех испытанных тканях почки человека.

Таблица 13. ИHC-окрашивание клубочков человека

группа	HuMab TF	ИHC клубочки человека
I	13	+
I	44	-
I	87-Lg6	nt
II	11	+
II	017-D12	+
II	42	nt
II	092-A09	nt
II	101	+
II/III	98	-
II/III	114	+
III	3	+
III	25	nt
III	109	+
III	111	+/-

Табл. 14 дает обзор результатов окрашивания выбранных TF-специфических HuMab в почке, ободочной кишке, сердце, большом мозге и коже человека, а также в панкреатических опухолях человека.

Таблица 14. ИHC окрашивание нормальной ткани и панкреатических опухолей человека

Ab	Почка человека	ободочная кишка человека	Сердце человека	Головной мозг человека	Кожа человека	Панкр. опухоль
13	почечный сорпулус +	базальная мембрана++	-	+	эпидермис +	+++
114	почечный сорпулус ++	базальная мембрана++	-	++	эпидермис ++	++++
11	почечный сорпулус +	базальная мембрана++	-	++	n.a. (+)	+++
44	-	базальная мембрана+	-	+/-	n.a.	++
98	-	базальная мембрана+	-	+/-	n.a. (+)	+++
111	почечный сорпулус +/-	базальная мембрана+	-	+	n.a.	+++

ИHC-анализ связывания TF-HuMab с панкреатическими опухолями человека выявил положительное окрашивание для всех TF-HuMab (приведенных в качестве иллюстрации на фиг. 13).

Пример 24. Лечение установленного опухолевого ксенотрансплантата MDA-MB-231 в жировых телах молочной железы мышей SCID

Эффективность *in vivo* TF-HuMab определяли в установленных ортотопических опухолях ксенотрансплантатов MDA-MB-231 в мышцах SCID. 2×10^6 опухолевых клеток в ЗФР инъецировали s.c. во 2-ом жировом теле молочных желез самок мышей SCID с последующей обработкой с использованием TF-HuMab или контрольного mAb (HuMab-KLH), начиная с момента, когда размеры опухолей стали измеримыми. Антитела инъецировали в день 21 (260 мкг/мышь), день 28 (130 мкг/мышь) и день 42 (130 мкг/мышь). Объем опухоли определяли по меньшей мере 2 раза в неделю. Объемы (мм^3) рассчитывали из измерений калипера (PLEXX) в виде $0,52 \times (\text{длина}) \times (\text{ширина})^2$.

Фиг. 14 показывает, что антитела 114, 111, 013, 098, 011 и 044, все, были эффективными в ингибировании роста установленных опухолей MDA-MB-231.

Пример 25. Пилотное повторяемое введение доз TF-специфических HuMab в собакоподобных обезьянах

Для получения начальной информации о токсикологии TF-специфических HuMab, в том числе оценивания способности антител интерферировать с каскадом коагуляции и, следовательно, увеличивать риск кровотечения в подвергаемых воздействию животных, выполняли пилотное исследование с повторяемым введением доз в собакоподобных обезьянах.

Два самца и две самки собакоподобных обезьян (*Macaca fascicularis*), в возрасте приблизительно 2 лет, получали внутривенные инъекции антитела 011:

день 1 исследования: 0 мг/кг (только носитель)

день 8: 1 мг/кг; 1 мл/мин

день 15: 10 мг/кг; 1 мл/мин

день 22: 100 мг/кг; 1 мл/мин

Этих животных наблюдали до дня 27, в этой временной точке животных эвтаназировали для аутопсии и гистологического оценивания органов.

Основными конечными точками этого исследования были

клинические наблюдения: определяемые ежедневно, признаки кровотечения из десен, глаз;

время функционального кровотечения и потери крови: определяемые в дни 1, 8, 15 и 22 (1, 24 и 120 ч после введения дозы) и двух временных точках перед испытанием;

кровь/следы крови/сгустки: НЕ-окрашивание всех тканей (определяемое в тканях, полученных при конечном умерщвлении);

кровь в моче, фекалиях, рвоте: определяемая ежедневно/еженедельно.

Не наблюдали видимой токсичности повторяемого, увеличивающего введения доз антитела 011. Животные не обнаруживали клинических симптомов и не было указания на высвобождение цитокинов. Кроме того, не было видимых клинических симптомов ухудшенной системы коагуляции или системных кровотечений. Во временной точке 1 ч после введения дозы, среднее время кровотечения в день 22 было значимо более высоким, чем наблюдаемое в день 1 ($p=0,012$). Не было других статистически значимых различий между днями 8, 15 и 22 в сравнении с днем 1. Кроме того, было обнаружено, что не имелось видимой токсичности в отношении основных органов и не было вредных гематологических эффектов. Предварительным заключением по гистологическому оцениванию тканей из этого исследования является то, что не было гистологических открытий в четырех получающих лечение животных, которые можно было бы приписать лечению тест-антителами.

Фиг. 15 показывает точки отдельных данных для каждого животного (пробы в двух повторностях) в зависимости от времени. Время кровотечения для 4 животных определяли в дни 1, 8, 15 и 22 (1, 24 и 120 ч) и в двух временных точках перед исследованием.

Пример 26. Превентивное и терапевтическое лечение опухолевых ксенотрансплантатов VxPC3 в мышцах SCID

Определяли эффективность *in vivo* TF-HuMab в превентивном или терапевтическом лечении ксенотрансплантатов клеток VxPC3 в мышцах SCID. 10×10^6 опухолевых клеток VxPC3 в 3ФР инъецировали *s.c.* в самок мышей SCID, с последующим лечением с использованием TF-HuMab или контрольного mAb (HuMab-KLN). Для превентивного лечения, антитела (400 мкг/мышь) инъецировали *i.p.* спустя 1 ч после индукции опухоли. Для терапевтического лечения, инъекцию антител (300 мкг/мышь) начинали в день 8 после индукции опухоли, с последующими еженедельными инъекциями антител (150 мкг/мышь). Объем опухоли определяли по меньшей мере 2 раза в неделю. Объемы (мм^3) рассчитывали из измерений калипером (PLEXX) в виде $0,52 \times (\text{длина}) \times (\text{ширина})^2$.

Фиг. 16 показывает, что TF-специфические HuMab способны предотвращать, а также лечить опухоли ксенотрансплантата VxPC3.

Пример 27. Перетасовка ДНК между мышинным и человеческим TF для определения доменов, важных для связывания анти-TF-HuMab

Для определения доменов, важных для связывания анти-TF-HuMab с TF человека, выполняли перетасовку ДНК между TF человека и мышши. Перетасованные конструкции получали из ДНК, кодирующей TF человека, заменой доменов человека мышшиными доменами, и из ДНК, кодирующей мышшиный TF, заменой мышшиных доменов доменами человека. Если домен в TF человека является важным для связывания анти-TF-HuMab, связывание будет утрачено после замены этого домена мышшиным доменом. TF человека и мышши являются на 57% гомологичными на уровне белка. Фиг. 17A и 17B показывают конструкции для TF человека, содержащие мышшиные домены (TFh, содержащие домены TFmm) и для мышшиного TF, содержащего домены TF человека. Клетки HEK293F транзитивно трансфицировали этими конструкциями или одним вектором (pcDNA3.3SP; псевдо). FACS-анализ выполняли по существу, как описано *supra*, с 30 мкг/мл очищенного исходного материала. HuMab-KLN использовали в качестве контрольного Ab.

Фиг. 17 показывает, что все, кроме одного анти-TF-HuMab, связываются только с TF человека, но не с мышшиным TF. HuMab-TF-003 обнаруживает некоторое связывание с мышшиным TF.

Фиг. 18A-О показывает результаты связывания различных анти-TF-HuMab с конструкциями, экспрессируемыми на клетках HEK293F. Эти результаты суммированы в Табл. 15. В этой таблице анти-TF-HuMab классифицированы в виде групп на основе доменов на TF человека, которые являются важными для связывания этих HuMab.

Перетасованные конструкции TFh	HuMab, которые обнаруживают уменьшенное связывание
1-41 мм 42-84 мм	Ничего 11, 17, 42, 92, 98, 101, 111
85-122 мм 123-137 мм	25, 42, 98, 109, 111 44, 114
185-225 мм 226-250 мм	13, 27, 44, 87 44
Группы, основанные на связывании перетасованных конструкций	HuMab в этой группе
1. 42-84 2. 42-84 + 85-122	11, 17, 92, 101 42, 98, 111
3. 85-122	25, 109
4. 123-137 5. 185-225	114 13, 27, 87
6. 123-137 + 185-225 + 226-250	44

Пример 28. Связывание Fab-фрагментов анти-TF-HuMab с внеклеточным доменом TF, определяемое при помощи ELISA, и с клеточным TF на клетках VxPC3, определяемое при помощи FACS

Связывание Fab-фрагментов анти-TF-HuMab с TF измеряли при помощи ELISA (нанесенного в виде покрытия внеклеточного домена TF) и при помощи FACS (TF на клетках VxPC3). ELISA выполняли в основном, как описано supra. Связанные Fab-фрагменты детектировали с использованием FtRP-конъюгированного ослиного антитела против H+L человека. FACS-анализ выполняли в основном, как описано supra. FITC-конъюгированное козье антитело против IgG (H+L) человека (Jackson) использовали для детектирования связанных основных кандидатов. Флуоресценцию измеряли на FACSCantoII. Кривые связывания анализировали, как описано supra, с использованием программы GraphPad Prism 5.

Фиг. 19 показывает меньшее связывание HuMab-TF-098 и -111 Fab-фрагментов с внеклеточным доменом TF, в сравнении с -011 Fab-фрагментами, измеренными при помощи ELISA.

Фиг. 20 показывает меньшее связывание HuMab-TF-098 и -111 Fab-фрагментов с клеточным доменом TF, в сравнении с -011 Fab-фрагментами, измеренными при помощи FACS на клетках VxPC3.

Табл. 16 показывает величины EC_{50} HuMab-TF Fab-фрагментов для связывания с внеклеточным доменом TF согласно ELISA и с клеточным TF согласно FACS на клетках VxPC3.

Таблица 16. Обзор величин EC_{50} для связывания HuMab-TF Fab-фрагментов с внеклеточным доменом TF согласно ELISA и с клеточным TF согласно FACS на клетках VxPC3

HuMab-TF	EC_{50} (ELISA)	EC_{50} (FACS)
011	0,04	0,132
013	0,03	0,301
044	0,59	8,040
098	1,98	n.a.
109	0,02	0,143
111	3,14	na

Величины EC_{50} даны в мкг/мл.

na - не могли быть рассчитаны.

Пример 29. Связывание анти-TF-HuMab с клеточными линиями, экспрессирующими различные уровни TF

Связывание анти-TF-HuMab с мембраносвязанным TF на клеточных линиях, экспрессирующих различные уровни TF, определяли FACS-анализом, по существу, как описано supra. Мышиное анти-TF-антитело с последующим PE-конъюгированным антителом против IgGfc мыши использовали в качестве положительного контроля. Флуоресценцию измеряли на FACSCantoII. Кривые связывания анализировали в основном, как описано supra, с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 5. Количество молекул TF на клеточных линиях определяли с использованием набора Qifi (Dako, Glostrup, Denmark), в соответствии с инструкциями изготовителя. Было определено, что клетки SW480 экспрессируют ~ 20000 молекул TF на клетку, клетки SK-OV-3 экспрессируют ~ 60000 молекул на клетку, клетки AsPC-1 экспрессируют ~ 175000 молекул на клетку и клетки MDA-MB-231 экспрессируют ~900000 молекул на клетку.

Фиг. 21 - HuMab-TF-98 и -111 обнаруживают сходные характеристики связывания с HuMab-TF-11, -13 и -109 клеточной линии MDA-MD-231, экспрессирующей высокие количества TF. В клеточных линиях с меньшим количеством молекул TF на клетку, например, клеточных линиях SK-OV-3 и SW480, HuMab-TF-98 и 111 обнаруживают отличающиеся характеристики связывания в сравнении с другими HuMab-TF-антителами.

Перечень последовательностей

<110> Genmab

<120> Тканевой фактор

<130> P57

<160> 112

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 126

<212> белок

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

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

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Ile His Arg Gly Ala Gly Tyr Ser Ser Ser Trp Pro Gly Ala
 100 105 110

Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 2

<211> 8

<212> белок

<213> Homo sapiens

<400> 2

Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp
 1 5

041176

<210> 3
<211> 8
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 3

Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr
1 5

<210> 4
<211> 19
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 4

Ala Arg Ile His Arg Gly Ala Gly Tyr Ser Ser Trp Pro Gly Ala
1 5 10 15

Phe Asp Ile

<210> 5
<211> 119
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 5

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Asn Asp
20 25 30

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

Ala Leu Ile Trp Tyr Asp Gly Val Asn Lys Asn Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Lys Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Pro Gly Thr Phe Tyr Gly Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly
100 105 110

041176

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 6
<211> 8
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 6

Gly Phe Thr Val Ser Asn Asp Gly
1 5

<210> 7
<211> 8
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 7

Ile Trp Tyr Asp Gly Val Asn Lys
1 5

<210> 8
<211> 12
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 8

Ala Arg Arg Pro Gly Thr Phe Tyr Gly Leu Asp Val
1 5 10

<210> 9
<211> 118
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 9

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Asp Tyr Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val
50 55 60

041176

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Ser Pro Trp Gly Tyr Tyr Leu Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 10
<211> 8
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 10

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Ala
1 5

<210> 11
<211> 8
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 11

Ile Ser Gly Ser Gly Asp Tyr Thr
1 5

<210> 12
<211> 11
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 12

Ala Arg Ser Pro Trp Gly Tyr Tyr Leu Asp Ser
1 5 10

<210> 13
<211> 120
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 13

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

041176

20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Asp Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Asp Gly Tyr Phe Leu Leu Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 14
<211> 8
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 14

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
1 5

<210> 15
<211> 8
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 15

Ile Ser Gly Ser Gly Asp Ser Thr
1 5

<210> 16
<211> 13
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 16

Ala Lys Asp Gly Tyr Phe Leu Leu Trp Tyr Phe Asp Leu
1 5 10

<210> 17

041176

<211> 118
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 17

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

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

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

Ser Val Ile Ser Gly Ser Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Ala Pro Trp Thr Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 18
<211> 8
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 18

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly
1 5

<210> 19
<211> 8
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 19

Ile Ser Gly Ser Gly Gly Thr Thr
1 5

<210> 20

041176

<211> 11
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 20

Ala Lys Ala Pro Trp Thr Tyr Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 21
<211> 118
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 21

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Thr Pro Trp Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 22
<211> 8
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 22

Gly Phe Thr Phe Asn Asn Tyr Ala
1 5

<210> 23

041176

<211> 8
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 23

Ile Ser Gly Ser Gly Gly Arg Thr
1 5

<210> 24
<211> 11
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 24

Ala Lys Thr Pro Trp Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 25
<211> 118
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 25

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

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

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

Ser Gly Ile Ser Gly Ser Gly Val Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asp Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Lys Thr Pro Trp Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Ile
100 105 110

Leu Val Ala Val Ser Ser
115

<210> 26

041176

<211> 8
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 26

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Ala
1 5

<210> 27
<211> 8
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 27

Ile Ser Gly Ser Gly Val Thr Thr
1 5

<210> 28
<211> 11
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 28

Ala Lys Thr Pro Trp Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 29
<211> 118
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 29

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Pro Arg Gly Thr Phe Ser Tyr Tyr
20 25 30

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

Gly Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Val Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

041176

Ala Arg Glu Gly Asp Arg Arg Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 30
<211> 8
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 30

Arg Gly Thr Phe Ser Tyr Tyr Thr
1 5

<210> 31
<211> 8
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 31

Ile Ile Pro Ile Leu Gly Val Ala
1 5

<210> 32
<211> 11
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 32

Ala Arg Glu Gly Asp Arg Arg Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 33
<211> 120
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 33

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

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

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

041176

Ala Val Ile Ser Asn Asp Gly Tyr Asn Asp Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Gly Gln Leu Gly Arg Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 34
<211> 8
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 34

Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr Ala
1 5

<210> 35
<211> 8
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 35

Ile Ser Asn Asp Gly Tyr Asn Asp
1 5

<210> 36
<211> 13
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 36

Ala Arg Asp Gly Gln Leu Gly Arg Gly Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 37
<211> 120
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 37

041176

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Pro Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ile Tyr
20 25 30

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

Ala Val Val Ser Asn Asp Gly Tyr Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asp Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Gly Gln Leu Gly Arg Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 38
<211> 8
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 38

Gly Phe Thr Phe Ser Ile Tyr Ala
1 5

<210> 39
<211> 8
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 39

Val Ser Asn Asp Gly Tyr Asn Lys
1 5

<210> 40
<211> 13
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 40

041176

Ala Arg Asp Gly Gln Leu Gly Arg Gly Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 41
<211> 118
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 41

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

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

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

Ala Val Ile Pro Tyr Asp Gly Asp Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Asp Trp Gly Leu Glu Val Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Ala
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 42
<211> 8
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 42

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Ala
1 5

<210> 43
<211> 8
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 43

041176

Ile Pro Tyr Asp Gly Asp Asn Lys
1 5

<210> 44
<211> 11
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 44

Ala Arg Glu Asp Trp Gly Leu Glu Val Asp Tyr
1 5 10

<210> 45
<211> 121
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 45

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Cys
20 25 30

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

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg His Lys Leu Gly Met Asp His Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 46
<211> 8
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 46

041176

Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Cys Trp
1 5

<210> 47
<211> 8
<212> Genok
<213> Homo sapiens

<400> 47

Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr
1 5

<210> 48
<211> 14
<212> Genok
<213> Homo sapiens

<400> 48

Ala Arg His Lys Leu Gly Met Asp His Asp Ala Phe Asp Ile
1 5 10

<210> 49
<211> 118
<212> Genok
<213> Homo sapiens

<400> 49

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Ser Phe Asn Asn Tyr
20 25 30

Pro Ile Phe Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Phe Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Ile Thr Ala Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Gly Gly Asp Asp Leu Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

041176

Met Val Ser Val Ser Ser
115

<210> 50
<211> 8
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 50

Gly Gly Ser Phe Asn Asn Tyr Pro
1 5

<210> 51
<211> 8
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 51

Ile Ile Pro Ile Leu Gly Ile Thr
1 5

<210> 52
<211> 11
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 52

Ala Gly Gly Asp Asp Leu Asp Ala Phe Asp Ile
1 5 10

<210> 53
<211> 120
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 53

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

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

Ala Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Asp Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Ser Asn Asp Gly Ile Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

041176

65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Asp His Thr Met Val Arg Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 54
<211> 8
<212> 6енoк
<213> Homo sapiens

<400> 54

Gly Phe Thr Phe Asn Arg Tyr Ala
1 5

<210> 55
<211> 8
<212> 6енoк
<213> Homo sapiens

<400> 55

Ile Ser Asn Asp Gly Ile Asn Lys
1 5

<210> 56
<211> 13
<212> 6енoк
<213> Homo sapiens

<400> 56

Ala Arg Asp His Thr Met Val Arg Gly Ala Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 57
<211> 107
<212> 6енoк
<213> Homo sapiens

<400> 57

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

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

041176

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Ser Asp Pro Ile
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 58
<211> 6
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 58

Gln Gly Ile Ser Arg Trp
1 5

<210> 59
<211> 3
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 59

Ala Ala Ser
1

<210> 60
<211> 9
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 60

Gln Gln Tyr Asp Ser Asp Pro Ile Thr
1 5

<210> 61
<211> 107
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 61

041176

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

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

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 62
<211> 7
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 62

Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr
1 5

<210> 63
<211> 3
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 63

Gly Ala Ser
1

<210> 64
<211> 8
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 64

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Leu Thr
1 5

041176

<210> 65
<211> 107
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 65

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 66
<211> 6
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 66

Gln Gly Ile Ser Ser Arg
1 5

<210> 67
<211> 3
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 67

Ala Ala Ser
1

<210> 68
<211> 9
<212> белок

041176

<213> Homo sapiens

<400> 68

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 69

<211> 108

<212> белок

<213> Homo sapiens

<400> 69

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Ser Ser
20 25 30

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

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 70

<211> 7

<212> белок

<213> Homo sapiens

<400> 70

Gln Ser Val Arg Ser Ser Tyr
1 5

<210> 71

<211> 3

<212> белок

<213> Homo sapiens

<400> 71

041176

Gly Ala Ser
1

<210> 72
<211> 9
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 72

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Arg Thr
1 5

<210> 73
<211> 108
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 73

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Ser Ser
20 25 30

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

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 74
<211> 7
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 74

Gln Ser Val Gly Ser Ser Ser
1 5

041176

<210> 75
<211> 3
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 75

Gly Ala Ser
1

<210> 76
<211> 9
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 76

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Arg Thr
1 5

<210> 77
<211> 107
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 77

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 78
<211> 6
<212> белок
<213> Homo sapiens

041176

<400> 78

Gln Gly Ile Ser Ser Arg
1 5

<210> 79

<211> 3

<212> Genok

<213> Homo sapiens

<400> 79

Ala Ala Ser
1

<210> 80

<211> 9

<212> Genok

<213> Homo sapiens

<400> 80

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 81

<211> 108

<212> Genok

<213> Homo sapiens

<400> 81

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

041176

100 105

<210> 82
 <211> 6
 <212> белок
 <213> Homo sapiens

<400> 82

Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 1 5

<210> 83
 <211> 3
 <212> белок
 <213> Homo sapiens

<400> 83

Ala Ala Ser
 1

<210> 84
 <211> 10
 <212> белок
 <213> Homo sapiens

<400> 84

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu Tyr Thr
 1 5 10

<210> 85
 <211> 107
 <212> белок
 <213> Homo sapiens

<400> 85

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

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

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

Tyr Asp Ala Ser Ile Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

041176

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 86
<211> 6
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 86

Gln Asp Ile Ser Ser Ala
1 5

<210> 87
<211> 3
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 87

Asp Ala Ser
1

<210> 88
<211> 9
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 88

Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 89
<211> 107
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 89

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

041176

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 90
<211> 6
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 90

Gln Ser Val Ser Ser Tyr
1 5

<210> 91
<211> 3
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 91

Asp Ala Ser
1

<210> 92
<211> 9
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 92

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr
1 5

<210> 93
<211> 107
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 93

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Ile Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 94
<211> 6
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 94

Gln Ser Val Ser Ser Tyr
1 5

<210> 95
<211> 3
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 95

Asp Ala Ser
1

<210> 96
<211> 9
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 96

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr
1 5

<210> 97
<211> 107
<212> белок
<213> Homo sapiens

041176

<400> 97

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

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

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

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 98

<211> 6

<212> белок

<213> Homo sapiens

<400> 98

Gln Gly Ile Asn Ser Ala
1 5

<210> 99

<211> 3

<212> белок

<213> Homo sapiens

<400> 99

Asp Ala Ser
1

<210> 100

<211> 9

<212> белок

<213> Homo sapiens

<400> 100

Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu Thr

041176

1 5

<210> 101
<211> 107
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 101

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Thr Val Glu Val Lys
100 105

<210> 102
<211> 6
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 102

Gln Gly Ile Ser Ser Trp
1 5

<210> 103
<211> 3
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 103

Ala Ala Ser
1

<210> 104

041176

<211> 9
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 104

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Pro Thr
1 5

<210> 105
<211> 107
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 105

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 106
<211> 6
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 106

Gln Gly Ile Ser Ser Trp
1 5

<210> 107
<211> 3
<212> белок
<213> Homo sapiens

<400> 107
 Ala Ala Ser
 1

<210> 108
 <211> 9
 <212> белок
 <213> Homo sapiens

<400> 108
 Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 109
 <211> 107
 <212> белок
 <213> Homo sapiens

<400> 109
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 110
 <211> 6
 <212> белок
 <213> Homo sapiens

<400> 110
 Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 1 5
 <210> 111
 <211> 3
 <212> белок
 <213> Homo sapiens

<400> 111
 Asp Ala Ser
 1

<210> 112
 <211> 9
 <212> белок
 <213> Homo sapiens

<400> 112
 Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr
 1 5

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело человека IgG1, которое связывает тканевой фактор человека, включающее область V_H , содержащую CDR 1, 2 и 3 с последовательностями SEQ ID NO: 10, 11 и 12, и область V_L , содержащую CDR 1, 2 и 3 с последовательностями SEQ ID NO: 66, 67 и 68, или вариант указанного антитела, где указанный вариант имеет не более 3 консервативных аминокислотных замен.

2. Антитело по п.1, которое имеет одно или более следующих свойств:

- связывается с внеклеточным доменом тканевого фактора с кажущейся аффинностью (EC_{50}) 3 нМ или менее,
- связывается с клетками млекопитающих, экспрессирующих тканевой фактор, с кажущейся аффинностью (EC_{50}) 10 нМ или менее,
- способно индуцировать антителозависимую клеточную цитотоксичность в клетках A431 с величиной EC_{50} 1 нМ или менее,

d) является эффективным в ингибировании роста установленных опухолей MDA-MB-231 и/или в ингибировании роста установленных опухолей ВхРСЗ,

e) ингибирует индуцированную тканевым фактором коагуляцию крови с медианной концентрацией ингибирования, меньшей чем 10 нМ,

f) ингибирует превращение FX в FXa комплексом тканевый фактор/FVIIa менее чем на 50%,

g) ингибирует FVIIa-индуцированное высвобождение IL-8 клетками MDA-MB-231 с максимальной величиной ингибирования более 50% или

h) ингибирует связывание FVIIa с тканевым фактором с максимальной величиной ингибирования более 80% или

i) ингибирует FVIIa-индуцированное фосфорилирование ERK с медианной концентрацией ингибирования, меньшей чем 10 нМ или

j) способно индуцировать отложение C3c и C4c.

3. Антитело по п.2, где клетками млекопитающих, экспрессирующими тканевый фактор, как указано в подпункте b), являются клетки A431, трансфицированные конструкцией, кодирующей тканевый фактор.

4. Антитело по любому из пп.1-3, включающее:

I) V_H , которая

a) по меньшей мере на 80% идентична последовательности области V_H SEQ ID NO: 9,

b) по меньшей мере на 90% идентична последовательности области V_H SEQ ID NO: 9,

c) по меньшей мере на 95% идентична последовательности области V_H SEQ ID NO: 9 или

d) на 100% идентична последовательности области V_H SEQ ID NO: 9, и

II) V_L , которая

a) по меньшей мере на 80% идентична последовательности области V_L SEQ ID NO: 65,

b) по меньшей мере на 90% идентична последовательности области V_L SEQ ID NO: 65,

c) по меньшей мере на 95% идентична последовательности области V_L SEQ ID NO: 65 или

d) на 100% идентична последовательности области V_L SEQ ID NO: 65.

5. Антитело по любому из пп.1-4, содержащее:

(a) область V_H , содержащую последовательность SEQ ID NO: 9, и область V_L , содержащую последовательность SEQ ID NO: 65, или

(b) вариант указанного антитела, который имеет не более 3 консервативных аминокислотных замен.

6. Антитело по любому из пп.1-5, которое дополнительно имеет одно или более следующих свойств: ингибирование пролиферации, ингибирование ангиогенеза опухолей, индукцию апоптоза опухолевых клеток, связывание с альтернативно сплайсированным тканевым фактором.

7. Антитело по любому из пп.1-6, которое конъюгировано с другой частицей, выбранной из цитотоксической частицы, радиоизотопа или лекарственного средства.

8. Биспецифическая молекула для диагностики или лечения рака, содержащая антитело по любому из пп.1-7 и вторую специфичность связывания, выбранную из группы, состоящей из специфичности связывания в отношении эффекторной клетки человека, Fc-рецептора человека или T-клеточного рецептора.

9. Экспрессирующий вектор для продуцирования антитела по п.1, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотные последовательности V_H CDR 1, 2 и 3 SEQ ID NO: 10-12 и V_L CDR 1, 2 и 3 SEQ ID NO: 66-68.

10. Экспрессирующий вектор для продуцирования антитела по п.1, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотные последовательности области V_H SEQ ID NO: 9 и области V_L SEQ ID NO: 65.

11. Рекомбинантная эукариотическая или прокариотическая клетка-хозяин, содержащая вектор по любому из пп.9 или 10, которая продуцирует антитело по любому из пп.1-6.

12. Фармацевтическая композиция для лечения рака, содержащая антитело по любому из пп.1-7 или биспецифическую молекулу по п.8 и фармацевтически приемлемый носитель.

13. Применение антитела по любому из пп.1-7 в качестве лекарственного средства для лечения рака.

14. Применение биспецифической молекулы по п.8 в качестве лекарственного средства для лечения рака.

15. Применение антитела по любому из пп.1-7 в качестве лекарственного средства для лечения рака в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтическими агентами.

16. Применение биспецифической молекулы по п.8 в качестве лекарственного средства для лечения рака в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтическими агентами.

17. Применение по любому из пп.15 или 16, согласно которому одним или несколькими терапевтическими агентами является химиотерапевтический агент.

18. Применение антитела по любому из пп.1-7 для приготовления лекарственного средства для лечения рака.

19. Применение биспецифической молекулы по п.8 для приготовления лекарственного средства для лечения рака.

20. Применение по любому из пп.13-19, согласно которому рак выбран из группы, состоящей из опухолей центральной нервной системы, рака головы и шеи, рака легких, рака молочной железы, эзофагеального рака, рака желудка, рака печени и желчных путей, рака поджелудочной железы, колоректального рака, рака мочевого пузыря, рака почки, рака предстательной железы, эндометриального рака, рака яичника, злокачественной меланомы, саркомы, опухолей неизвестного первичного происхождения, рака костного мозга, острого лимфобластного лейкоза, хронического лимфобластного лейкоза и неходжкинской лимфомы, рака кожи, глиомы, рака головного мозга, матки и прямой кишки.

21. Фармацевтическая композиция для ингибирования роста и/или пролиферации опухолевой клетки, экспрессирующей тканевый фактор, содержащая антитело по любому из пп.1-7 или биспецифическую молекулу по п.8.

22. Способ получения антитела по любому из пп.1-6, включающий стадии:

- a) культивирование клетки-хозяина по п.11 и
- b) очистка антитела из культуральной среды.

23. Диагностическая композиция для диагностики рака, содержащая антитело по любому из пп.1-7.

24. Способ детектирования присутствия тканевого фактора в образце, включающий контактирование образца с антителом по любому из пп.1-7 или биспецифической молекулой по п.8 в условиях, обеспечивающих образование комплекса между антителом или биспецифической молекулой и тканевым фактором, анализ, произошло ли образование комплекса или нет, и детекцию тканевого фактора в образце.

25. Набор для детектирования присутствия тканевого фактора (TF) в образце, содержащий антитело по любому из пп.1-7 или биспецифическую молекулу по п.8;

один или более реагентов для детектирования связывания анти-TF антитела и пептида TF и инструкцию по применению этого набора.

Сопоставление последовательностей

Ниже приведены последовательности антител данного изобретения. SEQ ID NO: приведены в скобках справа от последовательности. CDR1, CDR2 и кдр3 по Кабату являются выделенными: последовательности, представленные курсивом, представляют CDR1, подчеркнутые последовательности представляют CDR2 и последовательности, представленные жирным шрифтом, представляют CDR3.

VH:

1--CDR1--1 | |--CDR2-- | |-----CDR3-----|

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSG**YDGGD**GHVWRQMPGKGLMMG**ITVYDSD**NYSPFQGVTTISADKSIETAYLQWSSLKASDTAMYY**CAELTICGMDGSGEIAAD**WGQGTWTVSS VH1015-013 (1)

QVQLVDSGGVQVQGRSLRLSCAAS**QYDGGD**GHVWRQMPGKGLMMVAV**YDSD**NYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC**CAELTICGMDGSGEIAAD**WGQGTWTVSS VH1015-114 (5)

EVQLLESQGGVLPQGGSLRLSCAAS**QYDGGD**GHVWRQMPGKGLMMVAV**YDSD**NYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC**CAELTICGMDGSGEIAAD**WGQGTWTVSS VH1015-011 (9)

EVQLLESQGGVLPQGGSLRLSCAAS**QYDGGD**GHVWRQMPGKGLMMVAV**YDSD**NYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC**CAELTICGMDGSGEIAAD**WGQGTWTVSS VH1015-017 (13)

EVQLLESQGGVLPQGGSLRLSCAAS**QYDGGD**GHVWRQMPGKGLMMVAV**YDSD**NYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC**CAELTICGMDGSGEIAAD**WGQGTWTVSS VH1015-042 (17)

EVQLLESQGGVLPQGGSLRLSCAAS**QYDGGD**GHVWRQMPGKGLMMVAV**YDSD**NYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC**CAELTICGMDGSGEIAAD**WGQGTWTVSS VH1015-092 (21)

EVQLLESQGGVLPQGGSLRLSCAAS**QYDGGD**GHVWRQMPGKGLMMVAV**YDSD**NYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC**CAELTICGMDGSGEIAAD**WGQGTWTVSS VH1015-101 (25)

QVQLVDSGGVQVQGRSLRLSCAAS**QYDGGD**GHVWRQMPGKGLMMVAV**YDSD**NYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC**CAELTICGMDGSGEIAAD**WGQGTWTVSS VH1015-003 (29)

QVQLVDSGGVQVQGRSLRLSCAAS**QYDGGD**GHVWRQMPGKGLMMVAV**YDSD**NYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC**CAELTICGMDGSGEIAAD**WGQGTWTVSS VH1015-025 (33)

QVQLVDSGGVQVQGRSLRLSCAAS**QYDGGD**GHVWRQMPGKGLMMVAV**YDSD**NYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC**CAELTICGMDGSGEIAAD**WGQGTWTVSS VH1015-109 (37)

QVQLVDSGGVQVQGRSLRLSCAAS**QYDGGD**GHVWRQMPGKGLMMVAV**YDSD**NYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC**CAELTICGMDGSGEIAAD**WGQGTWTVSS VH1015-044 (41)

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSG**YDGGD**GHVWRQMPGKGLMMG**ITVYDSD**NYSPFQGVTTISADKSIETAYLQWSSLKASDTAMYY**CAELTICGMDGSGEIAAD**WGQGTWTVSS VH1015-087 (45)

QVQLVDSGGVQVQGRSLRLSCAAS**QYDGGD**GHVWRQMPGKGLMMVAV**YDSD**NYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC**CAELTICGMDGSGEIAAD**WGQGTWTVSS VH1015-098 (49)

QVQLVDSGGVQVQGRSLRLSCAAS**QYDGGD**GHVWRQMPGKGLMMVAV**YDSD**NYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC**CAELTICGMDGSGEIAAD**WGQGTWTVSS VH1015-111 (53)

VL:

1--CDR1--1 | |CDR2 | |-----CDR3-----|

DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRAS**QYDGGD**GLAWYQKPKFAKSLIY**AS**SLQSGVPSRPSGSGSDFTLTLSLQPEDFATYYC**QYDGGD**WGQGTWTVSS VH1015-013 (57)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRA**QYDGGD**GLAWYQKPKFAKSLIY**AS**SLQSGVPSRPSGSGSDFTLTLSLQPEDFATYYC**QYDGGD**WGQGTWTVSS VH1015-114 (61)

DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRAS**QYDGGD**GLAWYQKPKFAKSLIY**AS**SLQSGVPSRPSGSGSDFTLTLSLQPEDFATYYC**QYDGGD**WGQGTWTVSS VH1015-011 (65)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRA**QYDGGD**GLAWYQKPKFAKSLIY**AS**SLQSGVPSRPSGSGSDFTLTLSLQPEDFATYYC**QYDGGD**WGQGTWTVSS VH1015-017 (69)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRA**QYDGGD**GLAWYQKPKFAKSLIY**AS**SLQSGVPSRPSGSGSDFTLTLSLQPEDFATYYC**QYDGGD**WGQGTWTVSS VH1015-042 (73)

DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRAS**QYDGGD**GLAWYQKPKFAKSLIY**AS**SLQSGVPSRPSGSGSDFTLTLSLQPEDFATYYC**QYDGGD**WGQGTWTVSS VH1015-092 (77)

DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRAS**QYDGGD**GLAWYQKPKFAKSLIY**AS**SLQSGVPSRPSGSGSDFTLTLSLQPEDFATYYC**QYDGGD**WGQGTWTVSS VH1015-101 (81)

AIQLTQSPSSLSASVGRVITTCRAS**QYDGGD**GLAWYQKPKFAKSLIY**AS**SLQSGVPSRPSGSGSDFTLTLSLQPEDFATYYC**QYDGGD**WGQGTWTVSS VH1015-003 (85)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRA**QYDGGD**GLAWYQKPKFAKSLIY**AS**SLQSGVPSRPSGSGSDFTLTLSLQPEDFATYYC**QYDGGD**WGQGTWTVSS VH1015-025 (89)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRA**QYDGGD**GLAWYQKPKFAKSLIY**AS**SLQSGVPSRPSGSGSDFTLTLSLQPEDFATYYC**QYDGGD**WGQGTWTVSS VH1015-109 (93)

AIQLTQSPSSLSASVGRVITTCRAS**QYDGGD**GLAWYQKPKFAKSLIY**AS**SLQSGVPSRPSGSGSDFTLTLSLQPEDFATYYC**QYDGGD**WGQGTWTVSS VH1015-044 (97)

DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRAS**QYDGGD**GLAWYQKPKFAKSLIY**AS**SLQSGVPSRPSGSGSDFTLTLSLQPEDFATYYC**QYDGGD**WGQGTWTVSS VH1015-087 (101)

DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRAS**QYDGGD**GLAWYQKPKFAKSLIY**AS**SLQSGVPSRPSGSGSDFTLTLSLQPEDFATYYC**QYDGGD**WGQGTWTVSS VH1015-098 (105)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRA**QYDGGD**GLAWYQKPKFAKSLIY**AS**SLQSGVPSRPSGSGSDFTLTLSLQPEDFATYYC**QYDGGD**WGQGTWTVSS VH1015-111 (109)

Фиг. 1

SEQ ID NO:113: Аминокислотная последовательность C_H1-района дикого типа IgG4 человека.

```

1  ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFFPEPTVS WNSGALTSGV
51  HTFFAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVAP
101 EVHNAKTKPR EEQFNSTYRV VSVLTVLHGD WLNKGEYKCK VSNKGLPSSI
151 PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVSVLTVLH QDWLNGKEYK
201 CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GPPEPQVYTF LPPEQEMTK NOVSLTCLVK
251 GFYPSDIAVE WESNGQFENN YKTPPVLDSD DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG
301 NVPSCSVMHE ALHNNYTKSL LSSLGK

```

Последовательность, приведенная курсивом, представляет CH1-район, выделенная последовательность представляет шарнирную область, регулярная последовательность представляет CH2-район и подчеркнутая последовательность представляет CH3-район.

SEQ ID NO: 114: Аминокислотная последовательность не имеющего шарнирной области C_H1-района IgG4-человека.

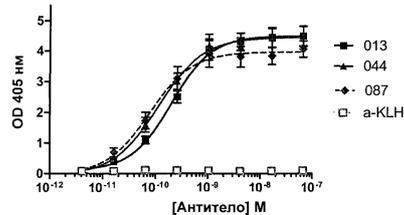
```

1  ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFFPEPTVS WNSGALTSGV
51  HTFFAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVAP
101 EFLGGPSVFL FPPKPKDILM ISRTPEVTCV VVDVSDQEDPE VQFNWYVDGV
151 EVHNAKTKPR EEQFNSTYRV VSVLTVLHGD WLNKGEYKCK VSNKGLPSSI
201 EKTISKAKGQ PREPQVYTFP PSQPEMKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE
251 SNGQFENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSRLTV DKSRWQEGNV PSCSVMHEAL
301 HNNYTKSLS LSLGK

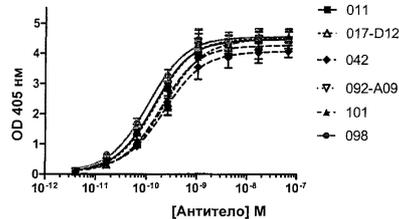
```

Фиг. 2

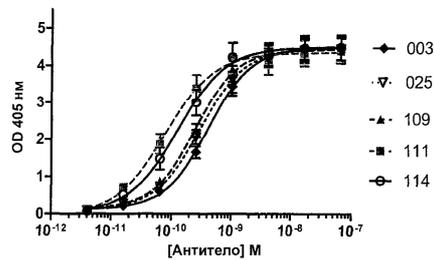
ELISA TFECDis crossblock-группа I



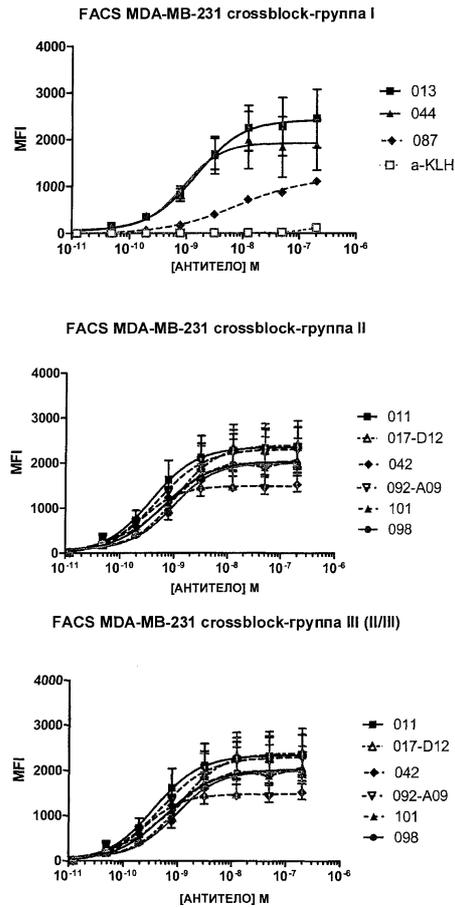
ELISA TFECDis crossblock-группа II



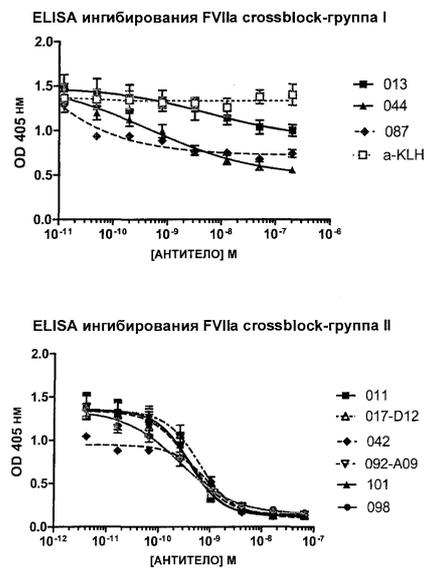
ELISA TFECDis crossblock-группа III (IIII)



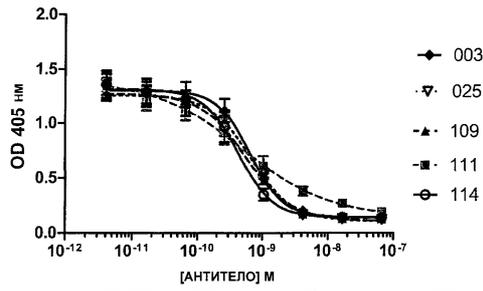
Фиг. 3. Связывание анти-TF-НuMab с внеклеточным доменом TF в ELISA_связывании определяли при помощи ELISA



Фиг. 4. Связывание анти-ТF-НuMab с мембраносвязанным TF на клетках MDA-MD-231. Связывание определяли FACS-анализом.

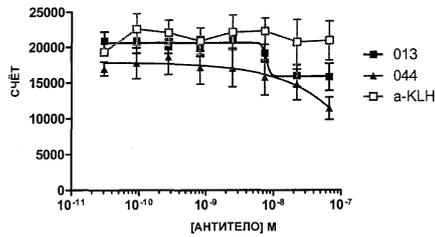


ELISA ингибирования FVIIa crossblock-группа III, (II/III)

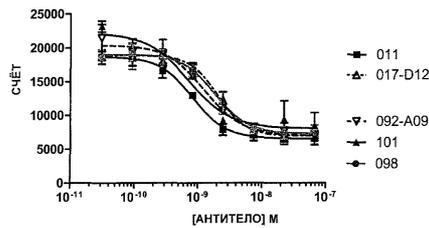


Фиг. 5. Ингибирование связывания FVIIa с TF и ингибирование TF-специфическими NuMab этого связывания измеряли при помощи ELISA.

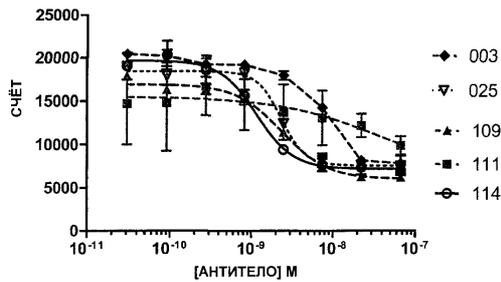
Ингибирование ERK-P crossblock-группа I A431



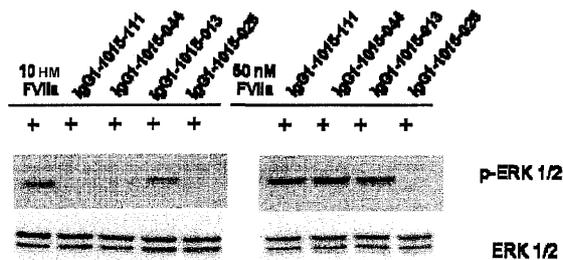
Ингибирование ERK-P crossblock-группа II A431



Ингибирование ERK-P crossblock-группа III (II/III) A431

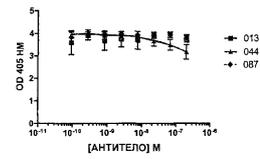


Фиг. 6. Ингибирование FVIIa-индуцированного фосфорилирования ERK

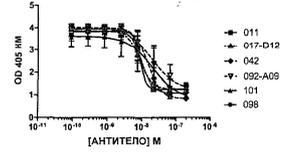


Фиг. 6А. Ингибирование FVIIa-индуцированного фосфорилирования ERK с использованием Вестерн-блот-анализа

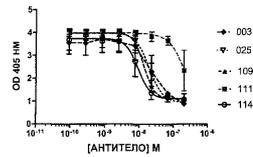
Ингибирование продуцирования IL-8
MDA-MB-231
crossblock-группа I



Ингибирование продуцирования IL-8
MDA-MB-231
crossblock-группа II

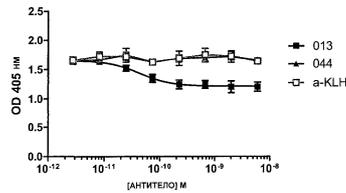


Ингибирование продуцирования IL-8
MDA-MB-231
crossblock-группа III (II/II)

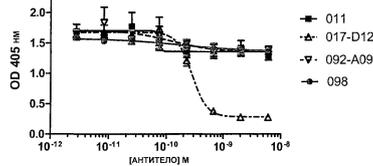


Фиг. 7. Ингибирование FVIIa-индуцированного высвобождения IL-8. MDA-MB-231 культивировали в бессывороточной среде, добавляли TF-специфические антитела и FVIIa. FVIIa-индуцированный IL-8 измеряли при помощи ELISA.

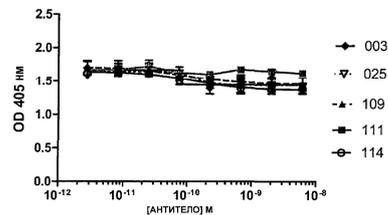
Ингибирование генерирования Fxa
crossblock-группа I



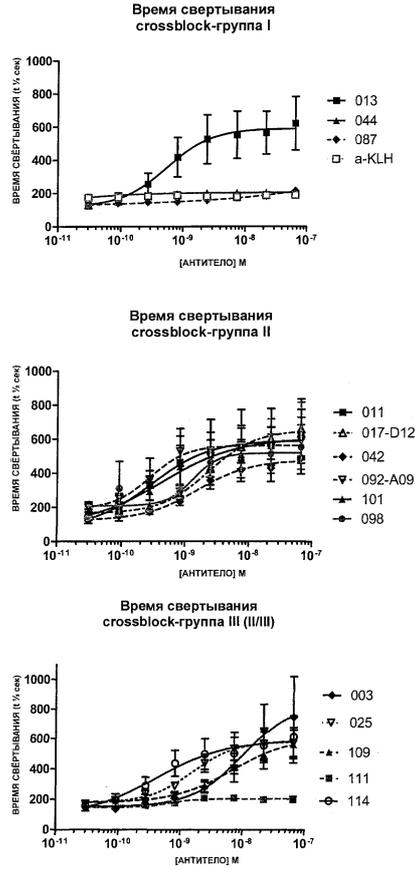
Ингибирование генерирования Fxa
crossblock-группа II



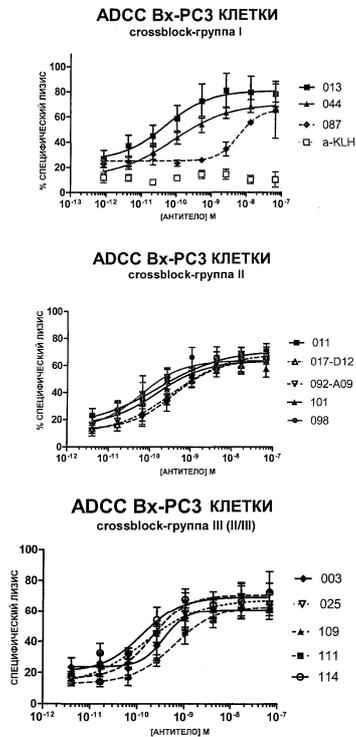
Ингибирование генерирования Fxa
crossblock-группа III (II/II)



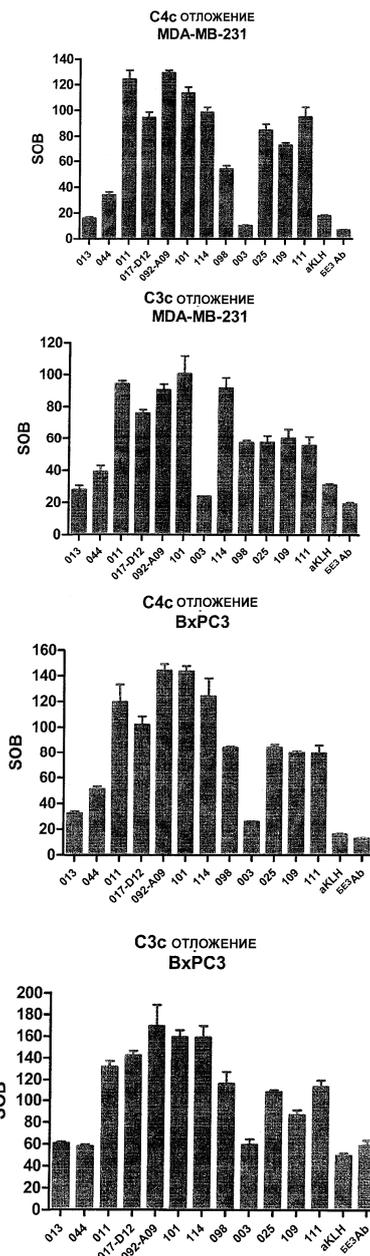
Фиг. 8. Ингибирование генерирования FХа. Способность TF-специфических НuМab ингибировать генерирование FХа тестировали в анализе, в котором превращение FX в FХа комплексом TF/FVIIa измеряют с использованием коллометрического FХа-специфического субстрата.



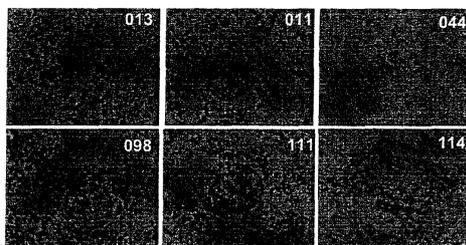
Фиг. 9. Ингибирование коагуляции крови. Ингибирование коагуляции крови измеряли в анализе, определяющем время свертывания.



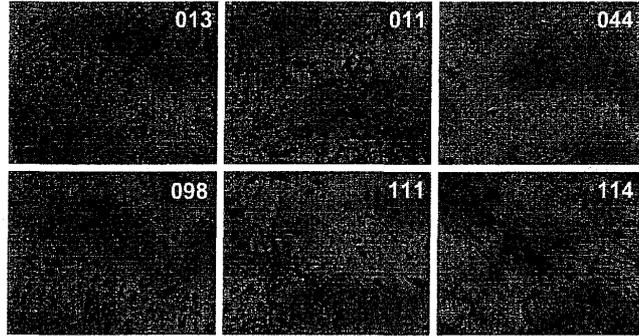
Фиг. 10. TF-HuMab индуцировало лизис клеток Vx-PC3 посредством ADCC.



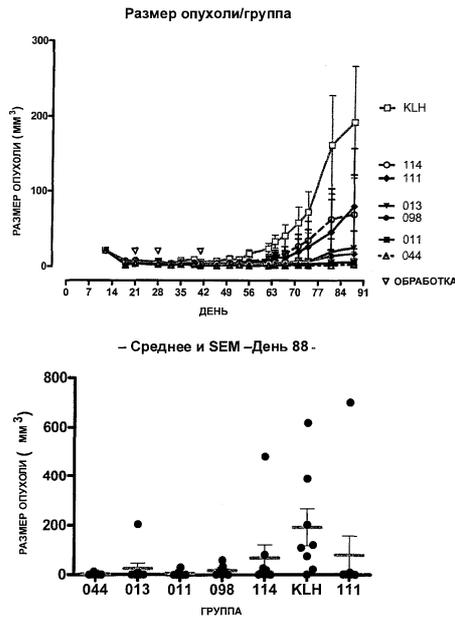
Фиг. 11. Отложение компонента



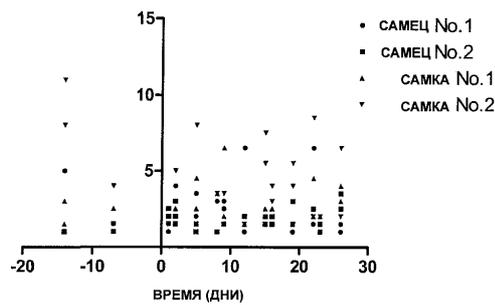
Фиг. 12. Иммуногистохимический анализ связывания TF-HuMab с нормальной почкой человека.



Фиг. 13. Иммуногистохимический анализ связывания TF-HuMab с панкреатическими опухолями.



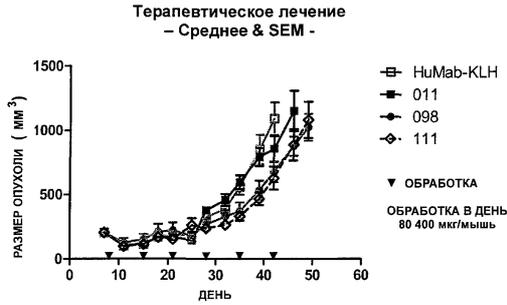
Фиг. 14. Эффективность *in vivo* TF-HuMab в установленном ксенотрансплантате опухоли MDA-MB-231 в жировых телах молочной железы мышей SCID.



Фиг. 15. Время кровотечения (минуты), определенное в собакоподобных обезьянах после внутривенной инъекции TF-специфического HuMab 011. Антитело вводили в день 1 (0 мг/кг), 8 (1 мг/кг), 15 (10 мг/кг и 22 (100 мг/кг). Функциональное время кровотечения и потерю крови определяли спустя 1, 24 и 120 ч после введения доз.

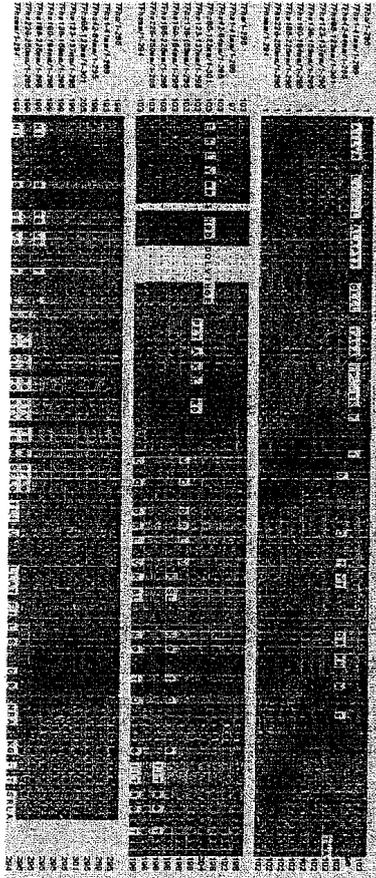


Повторяемые измерения 2-факторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим апостериорным тестированием Бонферрони: 111 vs. KLN: от д28 и далее: P<0,05, от д32 и далее: P<0,01.

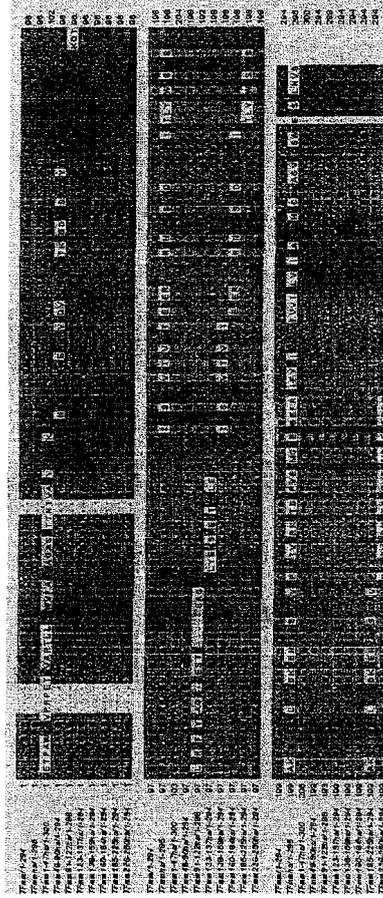


Повторяемые измерения 2-факторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим апостериорным тестированием Бонферрони: 111 vs. KLN: от д35 и далее: P<0,05.

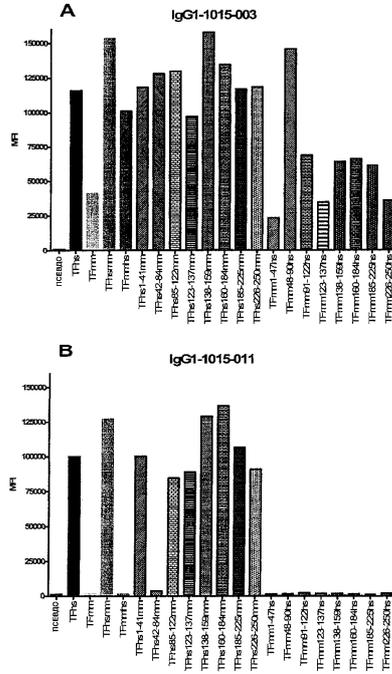
Фиг. 16

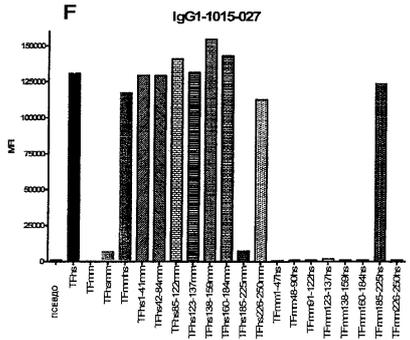
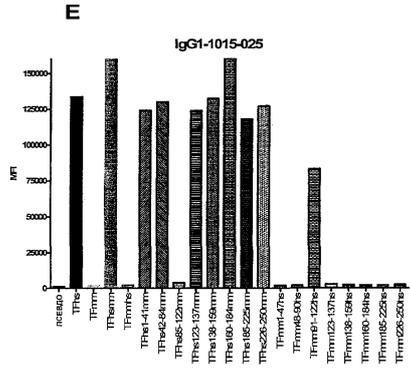
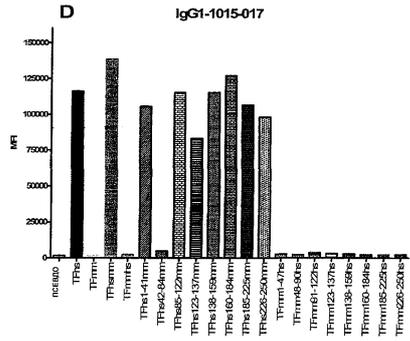
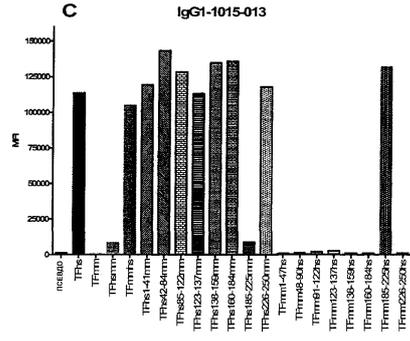


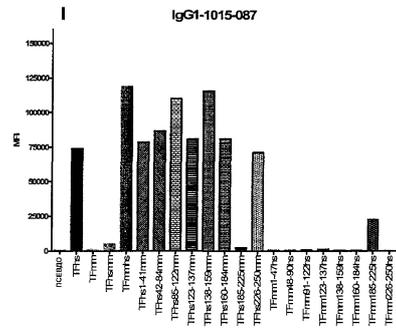
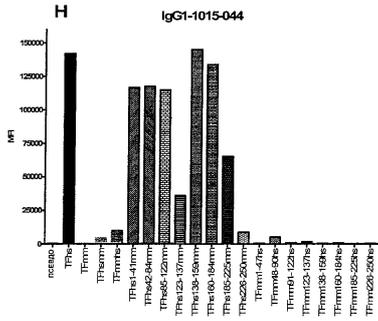
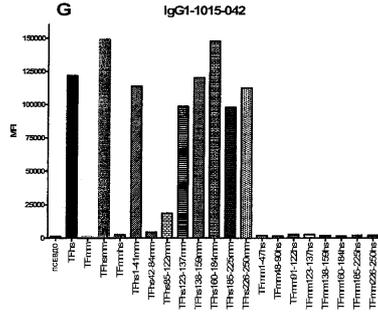
Фиг. 17А. Перетасованная конструкция TFhs, содержащая TFmm-домены.

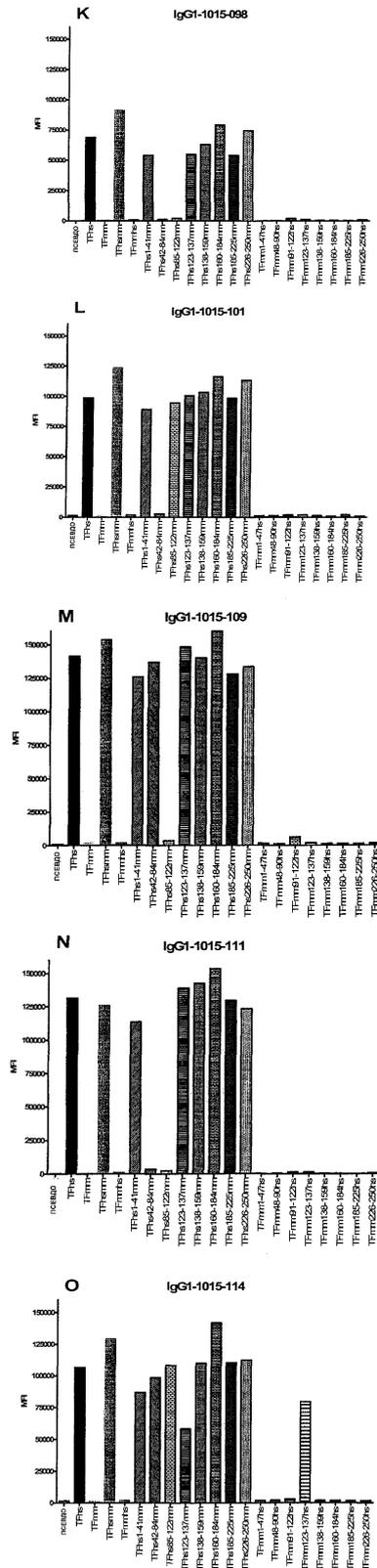


Фиг. 17В: Перетасованная конструкция TFmm, содержащая TFhs-домены.

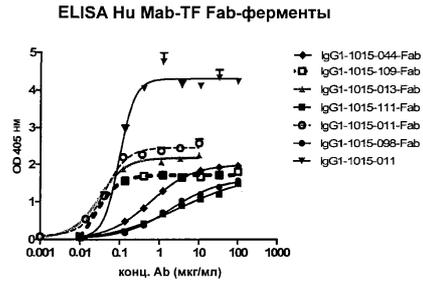




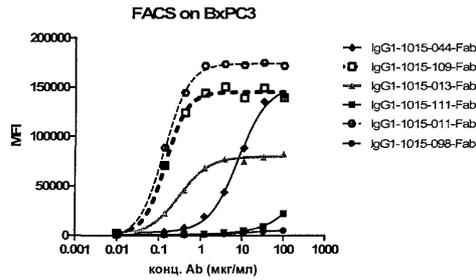




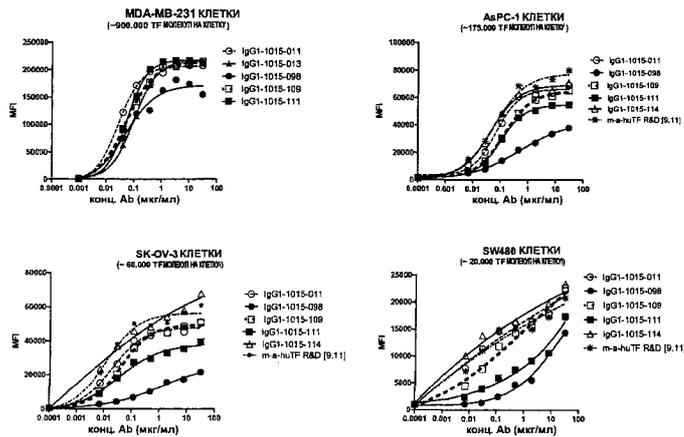
Фиг. 18. Связывание анти-TF-HuMab с перетасованными конструкциями TF, экспрессируемыми на клетках HEK293F. Показаны профили связывания анти-TF-HuMab с различными перетасованными конструкциями TF, экспрессируемыми на клетках HEK293F, измеренные при помощи FACS. Каждая панель показывает данные из одного основного клона. На x-оси изображены различные конструкции; псевдо, TFhs, TFmm, TFhsmm, TFhsmhs, TFhs1-41mm, TFhs42-84mm, TFhs85-122mm, TFhs123-137mm, TFhs138-159mm, TFhs160-184mm, TFhs185-225mm, TFhs226-250mm, TFmm1-47hs, TFmm48-90hs, TFmm91-122hs, TFmm123-137hs, TFmm138-159hs, TFmm160-184hs, TFmm185-225hs, TFmm226-250hs.



Фиг. 19. Связывание Fab-фрагментов HuMab-TF с внеклеточным доменом TF, определенное при помощи ELISA.



Фиг. 20. Связывание Fab-фрагментов HuMab-TF с клеточным TF, определенное при помощи FACS на клетках BxPC3.



Фиг. 21. Профиль связывания анти-TF-HuMab зависит от количества экспрессированных молекул TF. Связывание анти-TF-HuMab с клеточными линиями, экспрессирующими различные уровни TF, определяли при помощи FACS. 1) клетки, 2) молекул на клетку, 3) концентрация Ab (мкг/мл).

