



УКРАЇНА

(19) UA (11) 83988 (13) C2

(51) МПК (2006)

C07K 16/28 (2008.01)

A61K 39/395

A61P 35/00

C12N 5/10

C12N 15/13

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(54) МОНОКЛОНАЛЬНЕ АНТИПОДВІЙНЕ ІНТЕГРИНОВЕ АНТИТІЛО, ЩО СПЕЦИФІЧНО ЗВ'ЯЗУЄ ЛЮДСЬКІ ІНТЕГРИНИ АЛЬФА V БЕТА 3 ТА АЛЬФА V БЕТА 5, ФАРМАЦЕВТИЧНА КОМПОЗИЦІЯ, ЩО ЙОГО МІСТИТЬ, ТА ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ В ТЕРАПІЇ

1

2

(21) 2003021153

(22) 07.08.2001

(24) 10.09.2008

(86) PCT/US01/24784, 07.08.2001

(31) 60/223,363

(32) 07.08.2000

(33) US

(31) 60/920,267

(32) 01.08.2001

(33) US

(46) 10.09.2008, Бюл.№ 17, 2008 р.

(72) ГІЛЕС-КОМАР ДЖІЛЛ, US/US, ХЕВНЕР
ДЖОРДЖ, US/US, ШНАЙДЕР ЛІНДА, US/US, ТРІК-
ХА МОХІТ, US/US

(73) ЦЕНТОКОР, ІНК.

(56) WO A1 0031248, 02.06.2000.

WO 0044404, 03.08.2000.

S. TAM ET AL.: "Abciximab (ReoPro, chimeric 7E3 Fab) demonstrates equivalent affinity and functional blockade of glycoprotein IIb/IIIa and alpha (v)beta3 integrins." CIRCULATION , vol. 98, no. 11, 15 September 1998 (1998-09-15), pages 1085-1091, XP000882678.

M. TRIKHA ET AL.: "A potential new application for a cardiovascular drug: Role for ReoPro (Abciximab), an inhibitor of gpIIb/IIIa and alphaVbeta3 integrins, as an anti-cancer agent." PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, vol. 41, March 2000 (2000-03), page 577 XP002212901.

S. SUZUKI ET AL.: "cDNA and amino acid sequences of the cell adhesion protein receptor recognizing vitronectin reveal a transmembrane domain and homologies with other adhesion protein receptors." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE U.S.A., vol. 83, no. 22, November 1986 (1986-11), pages 8614-8618, XP002212902.

M. LEHMANN ET AL.: "A monodonal antibody inhibits adhesion to fibronectin and vitronectin of a colon carcinoma cell line and recognizes the integrins

alphaVbeta3, alphaVbeta5, and alphaVbeta6." CANCER RESEARCH, vol. 54, 15 April 1994 (1994-04-15), pages 2102-2107, XP002103619.

MITJANS F. ET AL.: 'An anti alphaV-Integrin antibody that blocks Integrin function inhibits the development of a human melanoma in nude mice' JOURNAL OF CELL SCIENCE vol. 108, 1995, pages 2825 - 2835.

(57) 1. Моноклональне антиподвійне інтегринове антитіло людини, що специфічно зв'язує людські інтегрини Альфа V Бета 3 та Альфа V Бета 5 з високою афінністю зв'язування, принаймні $2,1 \pm 1,33 \times 10^{-10}$ для Альфа V Бета 3 та принаймні $2,5 \pm 1,04 \times 10^{-11}$ для Альфа V Бета 5, до очищених інтегринів, яке має варіабельний регіон важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 7, та варіабельний регіон легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 8.2. Антитіло за п. 1, яке відрізняється тим, що зв'язує людські інтегрини Альфа V Бета 3 та Альфа V Бета 5 з афінністю принаймні 10^{-9} М, яка виміряна на клітинних лініях.

3. Антитіло за пп. 1 або 2, яке відрізняється тим, що воно вироблене за допомогою гібридоми, де гібридому одержують з В-клітини, отриманої з трансгенної тварини (не людини), яка має геном, що містить людський трансген важкого ланцюга або трансхромосому та людський трансген легкого ланцюга або трансхромосому, злиті до іморталізованої клітини.

4. Антитіло за будь-яким з пп. 1-3, яке відрізняється тим, що воно суттєво нейтралізує активність одного з інтегринів людини Альфа V Бета 3 та Альфа V Бета 5 або їх фрагмента.

5. Антитіло за будь-яким з пп. 1-4, яке відрізняється тим, що воно повністю інгібує адгезію M21 клітини до вітронектину.

6. Антитіло за будь-яким з пп. 1-5, яке відрізняється тим, що воно містить важкий ланцюг IgG1 або IgG3.

(13) C2

(11) 83988

(19) UA

7. Антитіло за будь-яким з пп. 1-6, яке **відрізняється** тим, що воно містить важкий ланцюг IgG1 людини та легкий ланцюг IgG1 людини.

8. Застосування антитіла за будь-яким з пп. 1-7 в терапії.

9. Фармацевтична композиція яка містить антитіло людини за будь-яким з пп. 1-7 та фармацевтично прийнятний носій.

10. Ізольована нуклеїнова кислота, яка кодує антитіло людини за будь-яким з пп. 1-7.

11. Вектор експресії, який включає ізольовану нуклеїнову кислоту за п. 10.

12. Клітина-хазяїн, що містить вектор експресії за п. 11.

13. Клітина-хазяїн за п. 12, яка **відрізняється** тим, що являє собою COS-1, COS-7, HEK293, BHK21, CHO, BSC-1, Нер G2, 653, SP/2, 293, HeLa, мієлому, лімфому або клітину рослини.

14. Спосіб виробництва антитіла людини за будь-яким з пп. 1-7, який включає культивування клітини-хазяїна за пп. 12 або 13 за таких умов, що антитіло є експресованим.

15. Застосування антитіла за будь-яким з пп. 1-7 при виробництві лікарського засобу для лікування або попередження розладів, опосередкованих Альфа V Бета 3 та Альфа V Бета 5 інтегринами, вибраних з групи, що включає лейкоз, гострий лейкоз, гострий лімфобластний лейкоз (ALL), В-клітинний, Т-клітинний або FAB гострий лімфобластний лейкоз (ALL), гострий мієлолейкоз (AML), хронічний мієлоцитарний лейкоз (CML), хронічний лімфолейкоз (CLL), волосатоклітинний лейкоз, мієлодиспластичний синдром (MDS), лімфому, хворобу Ходжкіна, злоякісну лімфому, неходжкінську лімфому, лімфому Беркіта, множинну мієлому, саркому Капоші, колоректальну карциному, панкреатичну карциному, назофарингеальну карциному, злоякісний гістіоцитоз, паранеопластичний синдром (гіперкальцемія при злоякісних новоутвореннях), солідну пухлину, аденокарциному, саркому, злоякісну меланому, гемангіому, метастазуючу пухлину, ракозалежну резорбцію кісток, ракозалежний біль у кістках або злоякісні захворювання.

16. Застосування за п. 15, яке **відрізняється** тим, що лікарський засіб є придатним для парентерального, підшкірного, внутрішньом'язового, внутрішньовенового, внутрішньосуглобового, інтрабронхіального, інтраабдомінального, інтракапсулярного, інтрахрящового, інтракавітарного, інтрацеліального, інтрамозочкового, інтрацеребровентрикулярного, введення в товстий кишківник, інтрацервікального, інтрагастрального, внутрішньопечінкового, внутрішньоміокардіального, внутрішньокісткового, внутрішньотазового, інтраплеврального, інтрапростатового, внутрішньолегеневого, інтра ректального, внутрішньониркового, інтраспінального, інтрасиновіального, інтраторакального, внутрішньоматкового, інтравезикального, болюсного, вагінального, ректального, букального, сублінгвального, інтраназального або трансдермального введення.

17. Спосіб лікування розладів, опосередкованих Альфа V Бета 3 та Альфа V Бета 5 інтегринами, вибраних з групи, що включає лейкоз, гострий

лейкоз, гострий лімфобластний лейкоз (ALL), В-клітинний, Т-клітинний або FAB гострий лімфобластний лейкоз (ALL), гострий мієлолейкоз (AML), хронічний мієлоцитарний лейкоз (CML), хронічний лімфолейкоз (CLL), волосатоклітинний лейкоз, мієлодиспластичний синдром (MDS), лімфому, хворобу Ходжкіна, злоякісну лімфому, неходжкінську лімфому, лімфому Беркіта, множинну мієлому, саркому Капоші, колоректальну карциному, панкреатичну карциному, назофарингеальну карциному, злоякісний гістіоцитоз, паранеопластичний синдром (гіперкальцемія при злоякісних новоутвореннях), солідну пухлину, аденокарциному, саркому, злоякісну меланому, гемангіому, метастазуючу пухлину, ракозалежну резорбцію кісток, ракозалежний біль у кістках або злоякісні захворювання, який **відрізняється** тим, що пацієнту, який потребує такого лікування, вводять фармацевтичну композицію за п. 9.

18. Спосіб за п. 17, який **відрізняється** тим, що пацієнту одночасно вводять ефективну кількість принаймні однієї мітки або репортера, які можна визначити, антагоніста TNF, антиревматичного засобу, м'язового релаксantu, наркотичного засобу, нестероїдного протизапального засобу (НСПЗЗ), анальгетика, анестетика, седативного препарату, місцевого анестетика, нервово-м'язового блокатора, антимікробного препарату, антипсоріатичного препарату, кортикостероїду, анаболічного стероїду, еритропоєтину, імунізатору, імуноглобуліну, імуносупресивного препарату, гормону росту, гормонзамісного препарату, радіофармацевтичного препарату, антидепресанту, антипсихотичного препарату, стимулятора, протиастматичного препарату, бета-агоніста, інгаляційного стероїду, адреналіну або аналога, цитокіну або цитокінового антагоніста.

19. Спосіб за п. 17, який **відрізняється** тим, що ефективну кількість принаймні однієї мітки або репортера, які можна визначити, антагоніста TNF, антиревматичного засобу, м'язового релаксantu, наркотичного засобу, нестероїдного протизапального засобу (НСПЗЗ), анальгетика, анестетика, седативного препарату, місцевого анестетика, нервово-м'язового блокатора, антимікробного препарату, антипсоріатичного препарату, кортикостероїду, анаболічного стероїду, еритропоєтину, імунізатору, імуноглобуліну, імуносупресивного препарату, гормону росту, гормонзамісного препарату, радіофармацевтичного препарату, антидепресанту, антипсихотичного препарату, стимулятора, протиастматичного препарату, бета-агоніста, інгаляційного стероїду, адреналіну або аналога, цитокіну або цитокінового антагоніста вводять пацієнту після введення фармацевтичної композиції.

20. Спосіб за п. 17, який **відрізняється** тим, що принаймні одну сполуку або протеїн, вибрані принаймні з однієї мітки або репортера, які можна визначити, антагоніста TNF, антиревматичного засобу, м'язового релаксantu, наркотичного засобу, нестероїдного протизапального засобу (НСПЗЗ), анальгетика, анестетика, седативного препарату, місцевого анестетика, нервово-м'язового блокатора, антимікробного препарату,

антипсоріатичного препарату, кортикостероїду, анаболічного стероїду, еритропоетину, імунізатору, імуноглобуліну, імуносупресивного препарату, гормону росту, гормонзамісного препарату, радіофармацевтичного препарату, антидепресанту, антипсихотичного препарату, стимулятора, протиастматичного препарату, бета-агоніста, інгаляційного стероїду, адреналіну або

аналога, цитокіну або цитокінового антагоніста вводять перед введенням фармацевтичної композиції.

21. Продукт виробництва, який включає пакувальний матеріал та контейнер, що містить розчин або ліофілізовану форму антитіла людини за будь-яким з пп. 1-7.

Ця заявка частково ґрунтується, і має пріоритет за, U.S. Provisional 60/223,363 від 7 серпня 2000 року, що включено тут у вигляді посилання.

Даний винахід відноситься до антитіл, включаючи конкретні частини або варіанти, які специфічні по принаймні одному білку альфа- ν -бета3, альфа- ν -бета5 подвійного інтегрину (подвійного інтегрину) або його фрагментам, а також по нуклеїновим кислотам, що кодують такі анти-подвійні інтегринові антитіла, додатковим нуклеїновим кислотам, векторам, клітинам господаря та методам виробництва і його використання, включаючи терапевтичні формулювання, призначення та пристрої.

Існують суттєві дані про те, що прогресуючий ріст пухлин залежить від ангиогенезу, утворенню нових судин, що забезпечують пухлини поживними речовинами та киснем, виводять продукти розпаду і забезпечують метастазування пухлинних клітин у віддалені зони [Gastl et al., *Oncol.*54:177-184]. Нещодавні дослідження дали подальше визначення ролі інтегринів в процесі ангиогенезу. Інтегрини є гетеродимерними трансмембранними білками, що відіграють критичну роль в адгезії клітин до екстрацелюлярного матриксу (ЕЦМ), який, у свою чергу, сприяє виживанню, проліферації та міграції клітин через міжклітинне з'єднання. Під час ангиогенезу, кількість інтегринів, що виділяється на поверхні активованих ендотеліальних клітин, регулює критичну адгезивну взаємодію з різноманітними білками ЕЦМ, що забезпечує регуляцію певних біологічних подій, таких як клітинна міграція, проліферація і диференціація. Було показано, що тісно споріднені, але відмінні, інтегрини $\alpha V\beta 3$ та $\alpha V\beta 5$ медіують незалежні шляхи розвитку процесу ангиогенезу. Антитіла проти $\alpha V\beta 3$ блокують основний фактор росту фібробластів (оФРФ), що індукує ангиогенез, тоді як антитіла до $\alpha V\beta 5$ пригнічують судинний ендотеліальний фактор росту (СЕФР), що індукує ангиогенез [Eliceri, et al., *J. Clin. Invest.* 103: 1227-1230 (1999); Friedlander et al., *Science* 270: 1500-1502(1995)].

Химеричні, поліклональні (напр., антисывороткові) та/або моноклональні антитіла (Мат) і фрагменти (напр., продукти протеолітичного травлення або зливні білки), що отримані не від людей, а від інших ссавців є потенційними терапевтичними препаратами, які досліджувалися у деяких випадках для лікування певних захворювань. Однак, такі антитіла або фрагменти можуть спричинити імунну відповідь при перизначенні лю-

дям. Така імунна відповідь може призвести до медіованого імунними комплексами виведення антитіл або фрагментів з кровообігу та унеможливити повторне введення препарату для лікування, таким чином зменшуючи лікувальний ефект для пацієнта і обмежуючи можливість повторного введення антитіл або фрагментів. Наприклад, повторне введення антитіл або фрагментів, що складаються з нелюдських частин, може призвести до сывороткової хвороби та/або анафілаксії. Для того, щоб уникнути цих і інших проблем, було запропоновано декілька підходів зі зменшення імунногеності таких антитіл і їхніх частин, включаючи химеризацію і гуманізацію. Однак, ці та інші підходи все ще можуть призводити до певної імунногеності антитіл та їх фрагментів, їхньої низької афіності або до проблем з клітинними культурами, посиленню, продукції та/або низького виходу. Отже, такі антитіла або фрагменти можуть бути не досить добрими для виробництва або використання в якості терапевтичних протеїнів.

Відповідно, існує потреба в розробці анти-подвійних інтегринових антитіл або фрагментів, що долають більшість цих проблем, а також є удосконаленням щодо відомих антитіл та їх фрагментів.

Даний винахід описує ізольовані отримані у людей, приматів, гризунів, ссавців химеричні, гуманізовані та/або CDR-трансплантовані анти-подвійні інтегринові антитіла, імуноглобуліни, продукти розщеплення та інші їхні специфічні частини і варіанти, а також склад анти-подвійних інтегринових антитіл, кодування або додаткові нуклеїнові кислоти, вектори, клітини господаря, склад, формулювання, пристрої, трансгенні тварини, трансгенні рослини та методи їхнього виробництва і використання, в комбінації з тим, що відомо сучасній науці.

В даному винаході також представлено принаймні одне ізольоване анти-подвійне інтегринове антитіло, як буде тут описано. До антитіл, згідно даного винаходу, належать будь-які білки або пептид-вміщуючі молекули, що складаються принаймні з частини імуноглобулінової молекули, такою як, але не обмежуючись, принаймні один допоміжний визначальний регіон (ДВР) важких або легких ланцюгів або їхня ліганд-зв'язуюча частина, важких або легких ланцюгів варіабельного регіону, важких або легких ланцюгів постійного регіону, каркасного регіону, або будь-якої їх частини, що можуть бути включені до складу антитіла в даному

винаході. Антитіло винаходу може включати або походити від будь-якого ссавця, включаючи, але не обмежуючись, людину, мишу, кроля, щура, гризуна, примата або будь-якої їхньої комбінації, і таке подібне.

Даний винахід описує в одному аспекті молекули ізольованих нуклеїнових кислот, що складають шляхом сполучення або гібридизування полі-нуклеотиди, котрі кодують специфічні анти-подвійні інтегринові антитіла, які складаються принаймні з однієї специфічної їхньої послідовності, домена, частини або варіанта. Даний винахід далі описує рекомбінантні вектори, що складають вищезгадані молекули нуклеїнових кислот анти-подвійних інтегринових антитіл, клітини господаря, що містять такі нуклеїнові кислоти та/або рекомбінантні вектори, а також методи виробництва та/або використання таких нуклеїнових кислот антитіл, векторів та/або клітин господаря.

Принаймні одне антитіло винаходу зв'язується з принаймні одним визначеним епітопом специфічним до принаймні одного подвійного інтегринового білка, субодиниці, фрагмента, порції або будь-якої їхньої комбінації. Принаймні один епітоп може складатися з принаймні одного регіону, що зв'язує антитіло, котрий складається з принаймні однієї частини вищезгаданого білка, епітоп якого переважно складається з принаймні 1-5 амінокислот принаймні однієї частини подвійного інтегрину, такого як, але не обмежуючись, (a) 29-48, 58-63, 69-79, 82-85, 88-134, 140-157, 161-183, 186-190, 192-198, 202-212, 215-217, 223-237, 240-244, 248-255, 259-268, 287-301, 313-322, 326-328, 332-344, 348-351, 354-365, 376-387, 393-401, 407-414, 417-419, 422-433, 443-451, 458-461, 465-469, 472, (b) 32-41, 46-47, 53-55, 58-69, 72-74, 77-79, 85-88, 91-94, 96-105, 110-113, 117-125, 129-142, 145-153, 155-159, 161-163, 166-170, 172-174, 184-197, 200-209, 215-218, 221-225, 184-197, 200-209, 215-218, 221-225, 227-250, 259-261, 263-267, 269-270, 275-281; та (c) 29-35, 43-45, 48-63, 67-69, 72-74, 80-82, 84-87, 95-105, 108-113, 117-142, 145-163, 166-170, 172-176, 184-186, 191-201, 204-206, 216-219, 224-226, 229-251, 260-262, 264-268, 276-282, 286-288, 294-299, 301-318, 323-325, 328-330, 338-342, 345-349, 353-358, SEQ ID NO:9, 16 і 17, відповідно, або такого як, але не обмежуючись, принаймні одного функціонального, екстрацелюлярного, розчинного, гідрофільного, зовнішнього або цитоплазматичного домена вищезгаданого подвійного інтегринового білка, субодиниці або будь-якої їхньої частини.

Принаймні одне антитіло може також складатися з принаймні однієї певної частини принаймні одного допоміжного визначального регіону (CDR) (напр., CDR1, CDR2 або CDR3 важких або легких ланцюгів варіабельного регіону) та/або принаймні одного постійного або варіабельного каркасного регіону або будь-якої їхньої частини. Принаймні одна амінокислотна послідовність антитіла може також містити принаймні одну певну заміну, вставку або вилучення, як це описано тут або як це відомо науці.

Даний винахід також описує принаймні одне ізольоване анти-подвійне інтегринове антитіло, як це описано тут, де антитіло має принаймні одну дію, таку як, але не обмежуючись, інгібіція вітрон-

ктинового зв'язування, інгібіція зв'язування альфа-v бета-3 з принаймні одним лігандом або рецептором альфа-v бета-3, інгібіція зв'язування альфа-v бета-5 з принаймні одним лігандом або рецептором альфа-v бета-5, модуляція ангиогенеза, зв'язування з подвійним інтегрином або клітинами, що виділяють простий інтегрин. Анти-подвійне інтегринове антитіло таким чином може бути перевірене на відповідну дію згідно з відомими методиками такими як, але не тільки, принаймні одна біологічна дія щодо подвійного інтегринового білка.

Даний винахід далі описує принаймні одне подвійне інтегринове анти-ідіотипне антитіло до принаймні одного подвійного інтегринового антитіла даного винаходу. Анти-ідіотипне антитіло включає будь-які білки або пептид-вміщуючі молекули, що складаються з принаймні частини імунноглобулінової молекули, такої як, але не тільки, принаймні один допоміжний визначальний регіон (CDR) важкого або легкого ланцюга або їхньої ліганд-зв'язуючої частини, важкого ланцюга або легкого ланцюга варіабельного регіону, важкого ланцюга або легкого ланцюга постійного регіону, каркасного регіону або будь-якої їхньої частини, що можуть бути включені до антитіла даного винаходу. Антитіло винаходу може включати або походити від ссавців таких як, але не тільки, людина, миша, кінь, щури, гризуни, примати та інші.

Даний винахід описує в одному аспекті молекули ізольованих нуклеїнових кислот, що складають шляхом сполучення або гібридизування полі-нуклеотиди, котрі кодують специфічні анти-подвійні інтегринові антитіла, які складаються принаймні з однієї специфічної їхньої послідовності, домена, частини або варіанта. Даний винахід далі описує рекомбінантні вектори, що складають вищезгадані молекули нуклеїнових кислот анти-подвійних інтегринових антитіл, клітини господаря, що містять такі нуклеїнові кислоти та/або рекомбінантні вектори, а також методи виробництва та/або використання таких нуклеїнових кислот антитіл, векторів та/або клітин господаря.

Даний винахід також описує принаймні один метод експресії принаймні одного анти-подвійного інтегринового антитіла або подвійного інтегринового анти-ідіотипного антитіла в клітині господаря, що складається з культивування клітин господаря, як описано тут, за умов коли принаймні одне анти-подвійне інтегринове антитіло виділяється у кількостях, що можна визначити та/або відновити.

Даний винахід також описує принаймні одну комбінацію, що складається з (a) нуклеїнових кислот, що кодують ізольоване анти-подвійне інтегринове антитіло, та/або антитіла, що описується тут; та (b) належного носія або розчинника. Носій або розчинник може інколи бути фармацевтично прийнятним згідно з відомими носіями або розчинниками. Комбінація може інколи складатися з принаймні одного додаткового компонента, білка або суміші.

Даний винахід також описує принаймні методику або склад одного анти-подвійного антитіла для введення терапевтично ефективної кількості для модуляції або лікування стану, залежного принаймні від одного подвійного інтегрину, у клітинах, тканинах, органах, тваринах або пацієнтах

та/або до, після або під час відповідного стану, що відомий науці та/або описаний тут.

Даний винахід також описує принаймні один склад, пристрій та/або метод доставки терапевтично або профілактично ефективної кількості принаймні одного анти-подвійного інтегринового антитіла, згідно з даним винаходом.

Даний винахід далі описує метод або склад принаймні одного анти-подвійного антитіла для діагностики стану в клітині, тканині, органі, тварині або пацієнтів, залежного від принаймні одного подвійного інтегрина, та/або до, після або під час залежного стану, що відомі науці та/або описуються тут.

Даний винахід також описує принаймні один склад, пристрій та/або метод постачання для діагностики принаймні одного анти-подвійного інтегринового антитіла, згідно з даним винаходом.

На рисунку 1 показано графік подвійного розведення анти- $\alpha\text{V}\beta 3$ Мат, які інкубуються на пластинах, покритих $\alpha\text{V}\beta 3$, протягом 1 години при RT. Пластини були потім промиті, оброблені субстратом OPD і OD вимірювався на 490nm.

На рисунку 2 показано графік кальцеїн-мічених клітин M21, які попередньо інкубувалися зі зразками антитіл за відсутності або присутності P1F6, анти- $\alpha\text{V}\beta 5$ протягом 30 хвилин, а потім були внесені на пластини покриті вібронектином на 45 хвилин. Незв'язані клітини M21 були видалені двома промивками по 150 $\mu\text{л}$ /лунку HBSS з кальцієм. Пластинка досліджувалася на флуорометрі на 485-538nm.

На рисунку 3 показано графік клітинної адгезії, де клітини MDAMB435L2 були збагачені і попередньо інкубовані з різними концентраціями GenO95 протягом 10 хвилин.

Пухлинні клітини потім було додано до пластин Linbro, покритих вібронектином, і інкубовані при 37°C протягом 1 години. Лунки були промиті тричі і в кожному лунку було додано фарбник MTT на основі Cell Titer AQ. Адгезія клітин була визначена на реєстраторі пластин типу ELISA, де OD490nm прямопропорційно клітинній адгезії. Клітинна адгезія в лунках, покритих BSA, слугувала негативним контролем (дані не представлено). Кожна точка даних є середньою трьох визначень.

На рисунках 4A-D представлено графік зв'язування антитіл з $\alpha\text{V}\beta 3$, де цей ліганд преінкубувався у подвійному розведенні, починаючи при 10г/мл з 50mM EDTA в 1% BSA-HBSS (за відсутності Ca^{++}) або з 1% BSA-HBSS (з Ca^{++}) протягом 30 хвилин, 37°C. Суміші додавалися до пластин покритих CNTO 95, C372, c7E3 або LM609 IgG та інкубувалися протягом 1 години, 37°C. LM609 або CNTO 95 додавалися при 20г/мл у відповідний буфер (+/- Ca^{++}) на 30хв, 37°C. Пластини досліджувалися мишиними антитілами IgG Fc, HRP або людськими антитілами IgG Fc, HRP.

На рисунках 4E-G представлено графік зв'язування антитіл з $\alpha\text{V}\beta 5$, де цей ліганд преінкубувався у подвійному розведенні, починаючи при 10г/мл з 50mM EDTA в 1% BSA-HBSS (за відсутності Ca^{++}) або з 1% BSA-HBSS (з Ca^{++}) протягом 30 хвилин, 37°C. Суміші додавалися до пластин покритих CNTO 95, C372, c7E3 або LM609 IgG та інкубувалися протягом 1 години, 37°C. VNR139

додавався при 10г/мл у відповідний буфер (+/- Ca^{++}) на 30хв, 37°C. Пластини досліджувалися мишиними антитілами IgG Fc, HRP.

На рисунках 5A-B показано графік сатурації кривих зв'язування GenO.95 (рис.5A) та ReoPro (рис.5B) на пластинах, покритих $\alpha\text{V}\beta 3$.

НЕ НАДАНО (стор.7) НА МОМЕНТ УКЛАДАННЯ

Імунофлуоресценція і проаналізовано за допомогою флуориметрії. Гістограма ліворуч відображає базову флуоресценцію за присутності антитіл мічених ізотопами. Гістограма праворуч відображає позитивне зафарбовування. A, D, G, LM609 (Мат до $\alpha\text{V}\beta 3$, 10 $\mu\text{г}$ /мл); B, E, H, PIF6 (Мат до $\alpha\text{V}\beta 5$, 10 $\mu\text{г}$ /мл); і C, F, I, GenO95 (10 $\mu\text{г}$ /мл).

Рисунок 13. Адгезія HUVECS до пластин, покритих матриксним протеїном. Аналіз адгезії було виконано так, як це описано в Методах у Прикладі 5. Пластини досліджувалися на флуорометрі на 485-538nm. Адгезія клітин до лунок, покритих BSA, слугувала негативним контролем. На рисунку 13 ступінь клітинної адгезії за присутності різних концентрацій антитіл було відображено в якості відсотку від клітинної адгезії за відсутності антитіл, яка була прийнята за 100%. Кожна точка даних є середньою трьох визначень (+/-SD).

Рисунок 14. Адгезія клітин людської меланоми до пластин, покритих матриксним протеїном. Аналіз адгезії було виконано як це описано в Методах. Адгезія клітин до лунок, покритих BSA, слугувала негативним контролем. На рисунку 14 ступінь клітинної адгезії за присутності різних концентрацій антитіл було відображено в якості відсотку від клітинної адгезії за відсутності антитіл, яка була прийнята за 100%. Кожна точка даних є середньою трьох визначень (+/- SD).

Рисунок 15. Адгезія клітин людської карциноми товстого кишковика HT29 до вібронектину. Аналіз адгезії було виконано так, як це описано в Методах. Адгезія клітин до лунок, покритих BSA, слугувала негативним контролем. Дані на рисунку 15 відображені як відсоток максимального зв'язування (за відсутності антитіл) і є середнім потрійного визначення (+/- SD).

Рисунок 16A-D. Міграція HUVECS у напрямку вібронектину 2 $\mu\text{г}$ /мл. Аналіз було виконано так, як це описано в Методах, і клітинам дозволялося мігрувати протягом 6 год. Фотомікрографії репрезентативних полів (лінза об'єктиву 10x) клітинної міграції на рисунку 16A, відсутність антитіл, (16B), GenO95 (5 $\mu\text{г}$ /мл), (16C), GenO95 (40 $\mu\text{г}$ /мл). Рисунок 16D є графічним відображенням клітинної міграції за присутності різноманітних концентрацій GenO95. Дані нормалізовано до відсотку від контролю (без антитіл), який розглядався як 100%, і кожна точка даних є середньою трьох транслункових фільтрів (+/- SD).

Рисунок 17. Міграція HUVECS у напрямку до вібронектину 2 $\mu\text{г}$ /мл за присутності антитіл до $\alpha\text{V}\beta 3$ і $\alpha\text{V}\beta 5$. Аналіз міграції виконувався так, як це описано в Методах, а клітинам дозволялося мігрувати протягом 6 год. LM609 і P1F6 є Мат до $\alpha\text{V}\beta 3$ і $\alpha\text{V}\beta 5$, відповідно. Дані представлені на рисунку 17

були нормалізовані до відсотків від контролю (без антитіл), який розглядався як 100%, і кожний стовпчик є середнім трьох транслункових фільтрів (+/- SD). BSA, мишиний IgG і людський IgG слугували негативним контролем. LM609-P1F6 відображає комбінацію обох антитіл. Антитіла і BSA використовувалися в концентраціях 10μг/мл.

Рисунки 18A-E. Міграція HUVECS у напрямку до 2% FBS. Аналіз міграції дозволялося проводити протягом 4 год, а дані отримувалися так, як це описано в Методах. Рисунок 18(A) є графічним відображенням клітинної міграції за присутності LM609, P1F6, комбінації LM609+P1F6, контрольних антитіл мічених ізотопами (людських і мишиних). Антитіла і протеїни використовувалися в концентрації 10μг/мл. Рисунок 18(B) є графічним відображенням клітинної міграції за присутності ReoPro і Gen095. Фотомікрографії є репрезентативними полями (лінза об'єктиву 10x) клітинної міграції на рисунку 18(C), відсутність антитіл, рисунку 18(D), Gen095 (5μг/мл), і рисунку 18(E), Gen095 (20μг/мл). Дані було нормалізовано до відсотка від контролю (без антитіл), який розглядався як 100%, і кожна точка є середньою трьох транслункових фільтрів (+/- SD).

Рисунки 19A-E. Міграція клітин A375S.2 у напрямку до 10% FBS. Аналіз міграції дозволялося проводити протягом 4 год, а дані отримувалися так, як це описано в Методах. Антитіла використовувалися в концентраціях 10μг/мл. Рисунок 19(A) є графічним відображенням клітинної міграції за присутності різноманітних концентрацій Gen095. Рисунок 19(B) є графічним відображенням клітинної міграції за присутності LM609, P1F6, комбінації LM609+P1F6, контрольних антитіл мічених ізотопом (людських і мишиних). Дані було нормалізовано до відсотка від контролю, який розглядається як 100%, і кожна точка даних є середньою трьох транслункових фільтрів (+/- SD). Фотомікрографії є репрезентативними полями (об'єктив лінзи 10x) клітинної міграції на рисунку 19(C), відсутність антитіл, рисунку 19(D), Gen095 (5μг/мл), і рисунку 19(E), Gen095 (20μг/мл).

Рисунки 20A-E. Міграція HUVECS у напрямку до вібронектину за присутності bFGF. Нижня частина фільтрів міграційної камери була покрита 2μг/мл вібронектину, а аналіз виконувався так, як це описано в Методах. Клітинам дозволялося мігрувати протягом 6 год.

На рисунках 20A-E кожна точка даних є середнім 3 транслункових фільтрів (+/- SD). Рисунок 20(A), bFGF; рисунок 20(B), Gen095 (5μг/мл); рисунок 20(C), Gen095 (40μг/мл); рисунок 20 (D), без bFGF. Рисунок 20 (E), пригнічення клітинної міграції за присутності різноманітних антитіл показана графічно.

Рисунки 21A-D. Інвазія клітин A375S.2 через фібриновий гелі (5мг/мл). Аналіз інвазії дозволялося виконувати протягом 24 год і дані отримувалися так, як це було описано в Методах. Фотомікрографії репрезентативних полів (об'єктив лінзи 4x) клітинної інвазії на рисунку 21 (A) за відсутності антитіл, рисунок 21 (B) Gen095 (10 цг/мл), рисунки 21(C) і (D) є графічним відображенням клітинної інвазії за присутності Gen095, 10E5 F(ab')₂, LM609,

P1F6, LM-P1F6 (LM609+P1F6), людських та мишиних IgG (H-IgG та M-IgG). Графік на рисунку 21(D): концентрація всіх антитіл та протеїнів становить 10μг/мл. Дані нормалізовано до відсотку від контролю (без антитіл), який розглядається як 100%, і кожна точка є середнім трьох транслункових фільтрів (+/- SD).

Даний винахід описує ізолювані, рекомбінантні та/або синтетичні анти-подвійні інтегринові, отримані від людини, приматів, гризунів, ссавців, химеричні, гуманізовані або CDR-шунтовані антитіла та подвійні інтегринові анти-ідіотипні антитіла, а також склад та кодування молекул нуклеїнових кислот, що містять принаймні один полінуклеотидний код принаймні одного анти-подвійного інтегринового антитіла або анти-ідіотипного антитіла. Даний винахід також включає, але не обмежується, методи виробництва та використання таких нуклеїнових кислот та антитіл і анти-ідіотипних антитіл, включаючи діагностичні та терапевтичні складки, методи та пристрої.

Використовувані тут терміни "анти-альфа-в-бета-3, альфа-в-бета-5 подвійні інтегринові антитіла", "анти-подвійні інтегринові антитіла", "частина анти-подвійного інтегринового антитіла" або "фрагмент анти-подвійного інтегринового антитіла" та/або "варіант анти-подвійного інтегринового антитіла" тощо включають будь-який протеїн- або пептид-вміщуючу молекулу, що складається принаймні з частини імунноглобулінової молекули, таких як, але не тільки, принаймні один допоміжний визначальний регіон (CDR) важкого або легкого ланцюга або їх лагнд-зв'язуючу частину, варіабельний регіон важкого ланцюга або легкого ланцюга, постійний регіон важкого ланцюга або легкого ланцюга, каркасний регіон або будь-яку їх частину, або принаймні одну частину подвійного інтегринового рецептора або зв'язуючого протеїна, які можуть бути включені в антитіло даного винаходу. Такі антитіла можуть також інколи впливати на специфічні ліганди, такі як, але не тільки, антитіла модулюють, зменшують, збільшують, антагонізують, агонізують, послаблюють, блокують, пригнічують та/або взаємодіють принаймні з однією дією чи зв'язуванням подвійного інтегрину або з дією чи зв'язуванням рецептора подвійного інтегрину, *in vitro*, *in situ* та/або *in vivo*. В якості одного з прикладів, відповідне анти-подвійне інтегринове антитіло, певна частина або варіант даного винаходу можуть зв'язувати принаймні один подвійний інтегрин або його певну частину, варіант або домен. Відповідне анти-подвійне інтегринове антитіло, певна частина або варіант можуть також додатково впливати принаймні на одну дію або функцію подвійного інтегрину, такі як, але не тільки, синтез РНК, ДНК або протеїнів, вивільнення подвійного інтегрину, передача інформації рецептором подвійного інтегрину, розщеплення мембранного подвійного інтегрину, дія подвійного інтегрину, продукція та/або синтез подвійного інтегрину. Термін "антитіло" вживається щодо антитіл, їх фрагментів травлення, певних частин та варіантів, включаючи міметики антитіл або складові частини антитіл, що нагадують структуру та/або функцію антитіла або його певного фрагмента чи частини, включаючи одно-ланцюгові антиті-

ла та їх фрагменти. Функціональні фрагменти включають антиген-зв'язуючі фрагменти, що зв'язують подвійний інтегрин ссавців. Наприклад, фрагменти антитіл, що спроможні зв'язуватись з подвійним інтегрином або його частиною, включаючи, але не тільки, Fab' (напр., при папаїновому травленні), Fab' (напр., при пепсиновому травленні та частковій редукції) і F(ab')₂ (напр., при пепсиновому травленні), fab' (напр., при плазміновому травленні), pFc' (напр., при пепсиновому або плазміновому травленні), Fd (напр., при пепсиновому травленні, частковій редукції та реакції), Fv або scFv (напр., методи молекулярної біології) фрагменти, описуються винаходом (див. напр., Colligan, Immunology, вище).

Такі фрагменти можуть бути вироблені при ензиматичному розщепленні або за допомогою рекомбінантних методик, що відомі науці та/або описуються тут. Антитіла також можуть бути вироблені в різноманітних обмежених формах, з використанням генів антитіл, у котрих один або більше зупиняючих кодонів були вставлені до природнього зупиняючого локуса. Наприклад, комбінація гена кодуєчого частину важкого ланцюга F(ab')₂ може бути розроблена з включенням ДНК послідовності, що кодує домен CH₁ та/або поворотний регіон важкого ланцюга. Різнорганні частини антитіл можуть сполучатися хімічно за допомогою традиційних методик або можуть готуватися в якості прилеглого протеїна з використанням методик генетичної інженерії.

Термін "людське антитіло", що використовується тут, відноситься до антитіла, в якому в значному ступені кожна частина протеїна (напр., CDR, каркасний, C_L, C_H домени (напр., C_{H1}, C_{H2}, C_{H3}), поворот (V_L, V_H)) є переважно неімунногенними у людей, з тільки незначними змінами або варіаціями послідовності. Так само, антитіла визначені як такі, що отримані від приматів (мави, бабуїни, шимпанзе тощо), гризунів (миші, щури, кролі, гвінейські свинки, хом'ячки тощо) та від інших ссавців означають антитіла, що специфічні для таких видів, підвидів, підродів, родин. Далі, химеричні антитіла включають будь-яку комбінацію вищеприказаного. Такі зміни або варіації додатково і переважно зберігають або зменшують імунногенність щодо немодифікованих антитіл у людей або інших видів. Отже, людські антитіла відрізняються від химеричних або гуманізованих антитіл. Наголошується, що людські антитіла можуть продукуватися тваринами або прокаріотичними чи еукаріотичними клітинами, що спроможні експресувати функціонально змінений ген людського імунноглобуліну (напр., важкий ланцюг та/або легкий ланцюг). Далі, коли людське антитіло є одно-ланцюговим антитілом, воно може включати зв'язуючий пептид, що не виявляється у нативних людських антитілах. Наприклад, Fv може включати зв'язуючий пептид, такий як від 2 до приблизно 8 гліцинових або інших амінокислотних залишків, який з'єднує варіабельний регіон важкого ланцюга і варіабельний регіон легкого ланцюга. Такий зв'язуючий пептид вважається людського походження.

Біспецифічні, гетероспецифічні, гетерокон'югантні або однакові антитіла також можуть використовуватися, якщо вони є моноклональними, пер-

важно людськими або гуманізованими антитілами, що мають зв'язуючі характеристики для принаймні двох різних антигенів. В даному випадку, одна зі зв'язувальних особливостей стосується принаймні одного протеїна подвійного інтегрина, а інша - будь-якого іншого антигена. Методи виробництва біспецифічних антитіл відомі науці. Традиційно, рекомбінантна продукція біспецифічних антитіл ґрунтувалася на ко-експресії двох імунноглобулінових важколанцюгових-легколанцюгових пар, де два важкі ланцюги мають різні особливості [Milstein and Cuello, Nature 305:537 (1983)]. Через випадковий розподіл імунноглобулінових важких і легких ланцюгів, ці гібриди (квадри) продукували потенційну суміш 10 різних молекул антитіл, серед яких тільки одна мала правильну біспецифічну структуру. Очищення правильної молекули, яке зазвичай проводиться за допомогою хроматографічних етапів афіності, є досить складним, і рівень виходу продукту низький. Такі процедури описані, напр., в WO 93/08829, Патенти США №6210668, 6193967, 6106833, 6060285, 6037453, 6010902, 5989530, 5959084, 5959083, 5932448, 5833985, 5821333, 5807706, 5643759, 5601819, 5582996, 5496549, 4676980, WO 91/00360, WO 92/00373, EP 03089, Trautnecker et al., EMBO J. 10:3655 (1991), Suresh et al., Methods in Enzymology 121:210 (1986), кожний з них тут повністю включено у посиланнях.

Анти-подвійні інтегринові антитіла (також називаються подвійними інтегриновими антитілами) використані в методиках та складах даного винаходу можуть також додатково характеризуватися високою афіністю зв'язування з подвійним інтегрином та додатково чи переважно мати низьку токсичність. Зокрема, антитіло, певний фрагмент або варіант винаходу, де індивідуальні компоненти, такі як варіабельний регіон, постійний регіон та каркас, індивідуально та/або у поєднанні, додатково та переважно мають низьку імунногенність, використовуються в даному винаході. Антитіла, що можуть бути використані у винаході додатково характеризуються їхньою здатністю виліковувати пацієнтів на тривалий період з вимірюваним полегшенням симптоматики і низькою та/або прийнятною токсичністю. Низька або прийнятна імунногенність та/або висока афіність, а також інші відповідні властивості, можуть робити свій внесок у досягнення терапевтичного результату. "Низька імунногенність" тут визначається як зростаючі достовірні НАНА, НАСА або НАМА відповіді у менш, ніж 75%, або бажано менше, ніж 50% пацієнтів, що лікуються, та/або зростаючі низькі титри у лікованих пацієнтів (менше, ніж приблизно 300, бажано менше, ніж приблизно 100, що вимірюється за допомогою імуноферментного аналізу на подвійний антиген) [Elliott et al, Lancet 344:1125-1127 (1994), цілком включено тут у посилання].

Ізольовані нуклеїнові кислоти даного винаходу можуть використовуватися для виробництва принаймні одного анти-подвійного інтегринового антитіла або його певних варіантів, які можуть використовуватися для вимірювання або впливу у клітинах, тканинах, органах або тваринах (включаючи ссавців і людей) для діагностики, моніторингу, модулювання, лікування, полегшення, для

допомоги у попередженні виникнення або зменшення симптоматики стану, залежного від принаймні одного подвійного інтегрину, обраного з, але не тільки, принаймні одного імунного порушення або захворювання, серцево-судинного розладу або захворювання, інфекційного, злоякісного та/або неврологічного розладу або захворювання, або інших відомих чи специфічних станів, залежних від подвійного інтегрину.

Такий метод може включати введення ефективної кількості складу або фармацевтичного складу, що включає принаймні одне анти-подвійне інтегринове антитіло, в клітину, тканину, орган, тварину або пацієнта для потреб модуляції, лікування, полегшення, профілактики або зменшення симптоматики, впливів чи механізмів. Ефективна кількість може включати приблизно від 0,001 до 500мг/кг на шприць (напр., болюс), багаторазове або постійне введення чи досягнення сивороткової концентрації 0,01-5000μг/мл на шприць, багаторазове або постійне введення, або будь-яке ефективний діапазон чи значення, як це зроблено і описано з використанням відомих методів, як це описано тут або відомо з відповідних джерел.

Всі публікації або патенти, що цитуються тут, повністю включені тут у посилання наскільки вони відображають стан проблеми на час представлення винаходу та/або надають опис та уможливають даний винахід. Публікації стосуються будь-яких наукових або патентних публікацій або будь-якої іншої доступної інформації у будь-якому медіа-форматі, включаючи всі записані, електронні чи друковані формати. Наступні посилання є цілком включеними тут у посиланнях: Ausubel, et al., ed., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., NY, NY (1987-2001); Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor, NY (1989); Harlow and Lane, *antibodies, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY (1989); Colligan, et al., eds., *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, Inc., NY (1994-2001); Colligan et al., *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2001).

Принаймні одне анти-подвійне інтегринове антитіло даного винаходу може бути додатково вироблене за допомогою клітинної лінії, змішаної клітинної лінії, безсмертних клітин або клональної популяції безсмертних клітин, як це відомо науці. Див., напр., Ausubel, et al., ed., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., NY, NY (1987-2001); Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor, NY (1989); Harlow and Lane, *antibodies, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY (1989); Colligan, et al., eds., *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, Inc., NY (1994-2001); Colligan et al., *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2001), кожне джерело повністю вказується тут у посиланнях.

Людські антитіла, що є специфічними для людських подвійних інтегринових протеїнів або їхніх фрагментів, можуть реагувати з певними імунногенними антигенами, такими як ізолюваний та/або подвійний інтегриновий протеїн або його

частина (включаючи синтетичні молекули, такі як синтетичні пептиди). Інші специфічні або загальні антитіла ссавців також можуть реагувати. Підготовка імунногенних антигенів та виробництво моноклональних антитіл може бути проведена з використанням будь-яких належних методик.

В одному підході гібридома виробляється за допомогою поєднання відповідної лінії безсмертних клітин (напр., лінія мієломних клітин таких як, але не тільки, Sp2/0, Sp2/0-AG14, NSO, NS1, NS2, AE-1, L.5, >243, P3X63Ag8.653, Sp2 SA3, Sp2 MAI, Sp2 SSI, Sp2 SA5, U937, MLA 144, ACT IV, MOLT4, DA-1, JURKAT, WEHI, K-562, COS, RAJI, NIH 3T3, HL-60, MLA 144, NAMA1WA, NEURO 2A тощо, або гетеромієломи, їхні продукти поєднання, або будь-які клітини або поєднальні клітини, що від них походять, або будь-які відповідні клітинні лінії, що відомі науці. Див., напр., www.atcc.org, www.lifetech.com тощо, з клітинами, що продукують антитіла, такі як, але не тільки, ізолювані або клоновані клітини селезінки, клітини периферичної крові, лімфи, мигдаликів або інші клітини, що містять імунні чи В-клітини, або інші клітини, що експресують важкий або легкий ланцюг постійної або варіабельної або каркасної або CDR послідовності, або такі як ендogenousні чи гетерogenousні нуклеїнові кислоти, або такі як рекомбінантні чи ендogenousні, вірусні, бактеріальні, водоростеві, прокаріотичні, амфібіальні, комашині, рептилійові, рибні, отримані від ссавців, гризунів, кінські, овечі, козяки, баранячі, приматові, еукаріотичні, геномні ДНК, цДНК, рДНК, мітохондріальні ДНК або РНК, хлоропластна ДНК або РНК, hnРНК, мРНК, tРНК, одинарного, подвійного або потрійного скручення, гібридизовані тощо або будь-яка їхня комбінація. Див., напр., Ausubel, вище, та Colligan, *Immunology*, вище, розділ 2, повністю включено тут у посиланнях.

Клітини, що продукують антитіла, можуть також бути отримані з периферичної крові або, бажано, з селезінки чи лімфатичних вузлів, людей або інших відповідних тварин, що були імунізовані зацікавленими антигенами. Будь-які інші відповідні клітини господаря також можуть використовуватися для експресії гетерологічних або ендogenousних нуклеїнових кислот, що кожують антитіла, певні їхні фрагменти або частини даного винаходу. Зливні клітини (гібридоми) або рекомбінантні клітини можуть бути ізолюваними з використанням певних станів культури або інших відповідних відомих методів та клонуватися при обмеженому розведенні або сортуванні клітин, або іншими відовими методами. Клітини, які продукують антитіла с бажаною специфічністю можуть бути відібрані при відповідному аналізі (напр., ELISA).

Можуть використовуватися інші відповідні методи продукування або ізоляції антитіл необхідної специфічності, включаючи, але не обмежуючись, методами, що відбирають рекомбінантні антитіла з пептидної або протеїнової бібліотеки (напр., але не обмежуючись, бактеріофаги, рибосоми, олігонуклеотиди, РНК, цДНК тощо, подані бібліотеки; напр., доступні у Cambridge antibody Technologies, Cambridgeshire, UK; MorphoSys, Martinsreid/Planegg, DE; Biovation, Aberdeen, Scotland, UK; Biolnvent, Lund, Sweden; Dyax Corp.,

Enzon, Affymax/Biosite; Xoma, Berkeley, CA; Ixsys. Див., напр., EP 368,684, PCT/GB91/01134; PCT/GB92/01755; PCT/GB92/002240; PCT/GB92/00883; PCT/GB93/00605; US 08/350260(5/12/94); PCT/GB94/01422; PCT/GB94/02662; PCT/GB97/01835; (CAT/MRC); WO90/14443; WO90/14424; WO90/14430; PCT/US94/1234; WO92/18619; WO96/07754; (Scripps); EP 614 989 (MorphoSys); WO95/16027 (BioInvent); WO88/06630; WO90/3809 (Dyax); US 4,704,692 (Enzon); PCT/US91/02989 (Affymax); WO89/06283; EP 371 998; EP 550 400; (Xoma); EP 229 046; PCT/US91/07149 (Ixsys); або стохастично згенеровані пептиди чи протеїни - US 5723323, 5763192, 5814476, 5817483, 584514, 5976862, WO 86/05803, EP 590 689 (Ixsys, тепер Applied Molecular Evolution (AME), кожний повністю включений тут в якості посилання) або, що залежать від імунізації трансгенних тварин (напр., миші SCID, Nguyen et al., Microbiol. Immunol. 41:901-907 (1997); Sandhu et al., Crit. Rev. Biotechnol. 16:95-118 (1996); Eren et al., Immunol. 93:154-161 (1998), кожна повністю включена тут у посиланнях, а також у відповідних патентах і застосуваннях), що спроможні продукувати асортимент людських антитіл, як це відомо науці та/або описано тут. Такі методики включають, але не обмежуються, виявлення рибосом [Hanes et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:4937-4942 (May 1997); Hanes et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:14130-14135 (Nov. 1998)]; методики однієї клітини, що продукує антитіла (напр., метод антитіл відібраних лімфоцитів ("SLAM") [патент США №5,627,052, Wen et al., J. Immunol. 17:887-892 (1987); Babcook et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7843-7848 (1996)]; релева мікрокап-линна і потокова цитометрія [Powell et al., Biotechnol. 8:333-337 (1990); One Cell Systems, Cambridge, MA; Gray et al., J. Imm. Meth. 182:155-163 (1995); Kenny et al., Bio/Technol. 13:787-790 (1995)]; вибір В-клітин [Steenbakkers et al., Molec. Biol. Reports 19:125-134 (1994); Jonak et al., Progress Biotech, Vol. 5, In Vitro Immunization in Hybridoma Technology, Borrebaeck, ed., Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, Netherlands (1988)].

Методи інженерингу та гуманізації нелюдських та людських антитіл також можуть використовуватися і вони є добре відомими науці. Загалом, гуманізовані або модифіковані антитіла мають один або більше амінокислотний залишок, що походить з джерела, яке є нелюдським, напр., але не обмежуючись, від мишей, щурів, кролів, приматів або інших ссавців. Ці людські амінокислотні залишки часто називаються як "імпортовані" залишки, які зазвичай отримуються з "імпортованих" варіабельних, постійних або інших доменів відомої людської послідовності. Відомі послідовності Ig людини описано, напр., www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi; www.atcc.org/phage/hdb.html, www.sciquest.com/; www.abcam.com/; www.antibodyresource.com/onlinecomp.html; www.public.iastate.edu/~pedro/research_tools.html; www.mgen.uni-heidelberg.de/SD/IT/IT.html; www.whfreeman.com/immunology/CH05/kuby05.htm;

www.library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html;
www.hhmi.org/grants/lectures/1996/Mab;
www.path.cam.ac.uk/~mrc7/mikeimages.html;
www.antibodyresource.com/;
mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html;
www.immunologylink.com/;
pathbox.wustl.edu/~hcenter/index.html;
www.biotech.ufl.edu/~hcl/;
www.pebio.com/pa/340913/340913.html;
www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/;
www.m.ehime-u.ac.jp/~yasuhito/Elisa.html;
www.biodesign.com/table.asp;
www.icnet.uk/axp/facs/davies/links.html; www.biotech.ufl.edu/~fccl/protocol.html; www.isac-net.org/sites_geo.html; aximtl.imt.unimarburg.de/~rek/AEPStart.html;
baserv.uci.kun.nl/~jraats/links1.html;
www.recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwu.edu/;
www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html;
www.ibt.unam.mx/vir/V_mice.html;
imgt.cnusc.fr: 8104/;
www.biochem.ud.ac.uk/~martin/abs/index.html;
antibody.bath.ac.uk/; ab-
gen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html;
www.unizh.ch/~honegger/AHOseminar/Slide01.html;
www.cryst.bbk.ac.uk/~ubcg07s/;
www.nimr.mrc.ac.uk/CC/ccaewg.htm;
www.path.cam.ac.uk/~mrc7/humanisation/TAHH.P.html;
www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat_aim.html;
www.biosci.missouri.edu/smithgp/index.html;
www.cryst.bioc.cam.ac.uk/~frnolina/Web-pages/Pept/spottech.html;
www.ierini.de/fr_products.htm;
www.patents.ibm.com/yibm.html. Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Dept. Health (1983), все повністю включено тут у посиланнях.

Такі імпортовані послідовності можуть використовуватися для зменшення імунногеності або зменшення, покращення чи модифікування зв'язування, афіності, швидкості зв'язування, швидкості звільнення, специфічності, часу напівжиття або будь-яких інших відповідних характеристик, що відомі науці. Загалом частина або всі нелюдські чи людські CDR послідовності зберігаються, тоді як нелюдські послідовності варіабельних та постійних регіонів замінюються людськими або іншими амінокислотами. Антитіла також можуть бути додатково гуманізовані зі збереженням високої афіності до антигенів та інших сприятливих біологічних властивостей. Для досягнення цієї мети, гуманізовані антитіла можуть додатково приготовлені за допомогою процесу аналізу батьківської послідовності та різноманітних концептуальних гуманізованих продуктів з використанням тривимірних моделей батьківських та гуманізованих послідовностей. Тривимірні імунноглобулінові моделі є широкодоступними і добре знайомі тим, хто володіє цією проблемою. Доступні комп'ютерні програми, які ілюструють і демонструють можливі тривимірні конформаційні структури обраних можливих імунноглобулінових послідовностей. Вивчення цих зображень дозволяє аналізувати ймовірну роль залишків у функціонуванні можливих

імуноглобулінових послідовностей, тобто, проводити аналіз залишків, що впливають на здатність можливих імуноглобулінів зв'язуватися з їхніми антигенами. За такого методу, можуть бути відібрані FR залишки і скомбіновані з узгодженими та імпортованими послідовностями, таким чином, щоб досягти бажаних характеристик антитіла, таких як підвищена афіність до цільового антигена(ів). Загалом, CDR залишки є безпосередньої найбільш істотно залученими до впливу на антигенне зв'язування. Гуманізація або інжиніринг антитіл даного винаходу може бути виконана з використанням будь-якого відомого методу, таких як, але не тільки, що описані у Winter (Jones et al, Nature 321:522 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323 (1988); Verhoyen et al., Science 239:1534 (1988))? Sims et al., J. Immunol. 151: 2296 (1993); Chotnia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901 (1987), Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sei. U.S.A. 89:4285 (1992); Presta et al., J.Immunol. 151:2623 (1993), патент США М»: 5723323, 5976862, 5824514, 5817483, 5814476, 5763192, 5723323, 5,766886, 5714352, 6204023, 6180370, 5693762, 5530101, 5585089, 5225539, 4816567, PCT/; US98/16280, US96/18978, US91/09630, US91/05939, US94/01234, GB89/01334, GB91/01134, GB92/01755; WO90/14443, WO90/14424, WO90/14430, EP 229246, всі включені тут у посиланнях, включаючи цитовані там посилання.

Анти-подвійне інтегринове антитіло також може бути згенеровано за допомогою імунізації трансгенних тварин (напр., мишей, щурів, хом'ячків, нелюдських приматів тощо) спроможних продукувати набір людських антитіл, як це описано тут та/або відомо науці. Клітини, що продукують людські анти-подвійні інтегринові атитіла можуть бути ізольовані з таких тварин і приведені до стану безсмерття з використанням відповідних методів, такі як описані тут методи.

Трансгенні миші, які можуть виробляти набір людських антитіл, які зв'язуються з людськими антигенами, можуть продукуватися за допомогою відомих методів [напр, але не обмежуючись, патенти США №№ 5,770,428, 5,569,825, 5,545,806, 5,625,126, 5,625,825, 5,633,425, 5,661,016 та 5,789,650 опубліковані Lonberg et al; Jakobovits et al. WO 98/50433, Jakobovits et al. WO 98/24893, Lonberg et al. WO 98/24884, Lonberg et al. WO 97/13852, Lonberg et al. WO 94/25585, Kucherlapate et al. WO 96/34096, Kucherlapate et al. EP 0463 151 B1, Kucherlapate et al. EP 0710 719 A1, Surani et al. Патент США № 5,545,807, Bruggemann et al. EP 0438 474 B1, Lonberg et al. EP 0814 259 A2, Lonberg et al. GB 2 272 440 A, Lonberg et al. Nature 368:856-859 (1994), Taylor et al, Immunol. 6(4):579-591 (1994), Green et al, Nature Genetics 7:13-21 (1994), Mendez et al, Nature Genetics 15:146-156 (1997), Taylor et al, Nucleic Acids Research 20(23):6287-6295 (1992), Tuailon et al, Proc Natl Acad Sei USA 90(8):3720-3724 (1993), Lonberg et al, Int Rev Immunol 13(1):65-93 (1995) та Fishwald et al, Nat Biotechnol 14(7):845-851 (1996), кожен з яких повністю включений тут у посиланнях). Загалом, ці миші мають принаймні один трансген, що містить ДНК від принаймні одного людського імуноглобулінового локуса, що функціонально переналашто-

ваний або який може проходити функціональне переналаштування. Ендогенні імуноглобулінові локуси у таких мишей можуть бути порушені або видалені для того, щоб прибрати здатність тварин продукувати антитіла, що кодуються ендогенними генами.

Скринінг антитіл для специфічного зв'язування з однаковими протеїнами або фрагментами можуть бути переконливо виконаним з використанням бібліотек зображень пептидів. Цей метод включає перегляд великих колекцій пептидів з метою виявлення тих, що мають бажану функцію або структуру. Скринінг антитіл в бібліотеках зображень пептидів добре відомий науці. Зображені пептидин послідовності можуть бути завдовжки від 3 до 5000 або більше амінокислот, часто завдовжки 5-100 амінокислот, і досить часто від приблизно 8 до 25 амінокислот завдовжки. До того ж було описано методи безпосереднього хімічного синтезу для створення бібліотек пептидів, декілька методів рекомбінантної ДНК. Один з них включає зображення пептидної послідовності на поверхні бактеріофага або клітини. Кожний бактеріофаг або клітина містять нуклеотидну послідовність, що кодує окрему зображену пептидну послідовність. Такі методи описані в патентних публікаціях PCT №№91/17271, 91/18980, 91/19818 та 93/08278. Інші системи для генерації бібліотек пептидів мають властивості як хімічного синтезу, так і рекомбінантних методик. Див., патентні публікації PCT №№ 92/05258, 92/14843 та 96/19256. Див. також, патенти США №№ 5,658,754; та 5,643,768. Бібліотеки пептидних зображень, вектори та скринінгові набори є комерційно доступними від таких постачальників, як Invitrogen (Carlsbad, CA) та Cambridge antibody Technologies (Cambridgeshire, UK). Див., напр., патента США №№ 4704692, 4939666, 4946778, 5260203, 5455030, 5518889, 5534621, 5656730, 5763733, 5767260, 5856456, що належать Enzon; 5223409, 5403484, 5571698, 5837500, що належать Duax, 5427908, 5580717, що належать Affymax; 5885793, що належать Cambridge antibody Technologies; 5750373, що належать Genentech, 5618920, 5595898, 5576195, 5698435, 5693493, 5698417, що належать Xoma, Colligan, вище; Ausubel, вище; або Sambrook, вище, кожен з патентів та публікацій повністю включені тут у посиланнях.

Антитіла даного винаходу можуть також бути виготовлені з використанням нуклеїнових кислот, що кодують принаймні одне анти-подвійне антитіло, у трансгенних тварин або ссавців, таких як кози, корови, коні, вівці тощо, що продукують такі антитіла в їхньому молоці. Такі тварини можуть бути отримані з використанням відомих методик. Див., напр., але не обмежуючись, патенти США №№ 5,827,690; 5,849,992; 4,873,316; 5,849,992; 5,994,616; 5,565,362; 5,304,489 тощо, кожен з котрих повністю включений тут у посиланнях.

Антитіла даного винаходу можуть бути додатково вироблені з використанням нуклеїнових кислот, що кодують принаймні одне анти-подвійне інтегринове антитіло, у трансгенних рослинах та культивованих клітинах рослин (напр., але не обмежуючись, тютюн і кукурудза), що продукують такі антитіла, певні частини або варіанти в части-

нах рослин або їхніх культивованих клітинах. В якості одного з прикладів, листки трансгенного тютюна виробляють рекомбінантні протеїни успішно використовувалися для отримання великих кількостей рекомбінантних протеїнів, напр., при використанні індукованих промотерів. Див., напр., Cramer et al., Curr. Top. Microbiol. Immunol. 240:95-118 (1999) і цитовані там посилання. Також, трансгенна кукурудза використовувалася для вироблення протеїнів ссавців в комерційних кількостях продукції, з біологічними діями, що еквівалентні тим, що продукуються в інших рекомбінантних системах або очищені з природних джерел. Див., напр., Hood et al., Adv. Exp. Med. Biol. 464:127-147 (1999) та цитовані там посилання. Антитіла також виготовлялися у великих кількостях з насіння трансгенних рослин, включаючи фрагменти антитіл, такі як однокланові антитіла (scFVs), включаючи насіння тютюна та клубні картоплі. Отже, антитіла даного винаходу можуть також продукуватися з використанням трансгенних рослин, згідно з відомими методиками. Див. також, напр., Fischer et al., Biotechnol. Appl. Biochem. 30:99-108 (Oct., 1999), Ma et al., Trends Biotechnol. 13:522-7 (1995); Ma et al., Plant Physiol. 109:341-6 (1995); Whitelam et al., Biochem. Soc. Trans. 22:940-944 (1994); і цитовані тут поєднання. Див., також загальною експресію антитіл рослинами, але не тільки. Кожне з вищенаведених посилань повністю включене тут у посиланнях.

Антитіла винаходу можуть зв'язувати людський подвійний інтегрин з широким спектром афіності (K_D). При бажаному поєднанні принаймні одне людське Мат даного винаходу може додатково зв'язувати людський подвійний інтегрин з високою афіністю. Наприклад, людське Мат може зв'язувати людський подвійний інтегрин з K_D , що дорівнює або менше, ніж приблизно 10^{-7} М, таким як, але не тільки, $0,1-9,9$ (або будь-який спектр чи значення там) $\times 10^{-7}$, 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} , 10^{-12} , 10^{-13} , або з будь-яким спектром або значенням.

Афіність антитіла або спорідненість антитіла до антигену може бути визначена експериментально з використанням будь-якого відповідного методу. (Див., наприклад, Berzofsky, et al, "Antibody-Antigen Interactions", в Fundamental Immunology, Paul, W. E., Ed., Raven Press: New York, NY (1984); Kubly, Janis Immunology, W. H. Freeman and Company: New York, NY (1992); та методи описані тут). Вимірювана афіність окремої взаємодії антитіло-антиген може змінюватися, якщо вимірювання проводиться в різних умовах (напр., концентрація солі, рН). Отже, вимірювання афіності та інших антиген-зв'язуючих параметрів (напр., K_D , K_a , K_d) переважно виконується стандартизованим розведеннями антитіла та антигена і стандартизованим буфером, таким як описаний тут буфер.

При використанні наданої тут інформації, такої як кодуєча послідовність нуклеотидів з принаймні

70-100% прилеглими амінокислотами принаймні одного з SEQ ID NOS:1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, певних фрагментів, варіантів або їхніх консенсусних послідовностей або депозитних векторів, що містять принаймні одну з цих послідовностей, молекула нуклеїнової кислоти даного винаходу, що кодує принаймні одне анти-подвійне інтегринове антитіло, може бути отримана при використанні описаних тут методик або так, як це відомо науці.

Молекули нуклеїнових кислот даного винаходу можуть бути у формі РНК, такі як мРНК, hnРНК, tРНК або у будь-якій іншій формі, або у формі ДНК, включаючи, але не обмежуючись, цДНК та геномну ДНК, що отримані клонуванням або вироблені синтетично, або будь-які їхні комбінації. ДНК може бути три-ниткова, подвійно-ниткова або одно-ниткова або будь-які їхні комбінації. Будь-яка частина принаймні однієї нитки ДНК або РНК може бути кодуєчою ниткою, що також відома як чутлива нитка, або може бути некодуєчою ниткою, що також називається античутливою ниткою.

Ізольовані нуклеїновоокислотні молекули даного винаходу можуть включати нуклеїновоокислотні молекули, що складаються з каркасу відкритого читання (ORF), додатково з одним або більше інтронами, напр., але не обмежуючись, принаймні з однією певною частиною CDR, в якості CDR1, CDR2 та/або CDR3 принаймні одного важкого ланцюга (напр., SEQ ID NOS:1-3) або легкого ланцюга (напр., SEQ ID NOS:4-6); нуклеїновоокислотні молекули, що містять кодуєчу послідовність для анти-подвійного інтегринового антитіла або варіабельного регіона (напр., SEQ ID NOS:7,8); і нуклеїновоокислотні молекули, які містять нуклеотидну послідовність, що істотно відрізняється від тих, що описані вище, але які, внаслідок дегенерації генетичного коду, все ще кодуєть принаймні одне анти-подвійне інтегринове антитіло, як це описано тут та/або відомо науці. Звісно, генетичний код є добре відомим науці. Отже, для того, хто має достатні знання в даній ділянці, буде рутинним отримати такі дегенеративні нуклеїновоокислотні варіанти, що кодуєть специфічні анти-подвійні інтегринові антитіла даного винаходу. Див., напр., Ausubel, et al., вище, і такі нуклеїновоокислотні варіанти включені в даний винахід. Один з прикладів ізольованих нуклеїновоокислотних молекул даного винаходу включає SEQ ID NOS:10, 11, 12, 13, 14, 15, що відповідають деяким прикладам нуклеїновоокислотного кодування, відповідно, HC CDR1, HC CDR2, HC CDR3, LC CDR1, LC CDR2, LC CDR3, варіабельний регіон HC та варіабельний регіон LC.

В іншому аспекті, винахід описує ізольовані нуклеїновоокислотні молекули, що кодуєть анти-подвійне інтегринове антитіло, і які мають амінокислотну послідовність, що кодується нуклеїновою кислотою, яка міститься в плазмідах, що відкладені в якості визначених назв клонів

i ATCC Deposit №№

, відповідно, відкладений на

Як тут вказується, нуклеїнові кислотні молекули даного винаходу, які містять нуклеїновокислотне кодування анти-подвійного інтегринового антитіла, можуть включати, але не обмежуватись, ті, що самі по собі кодують амінокислотну послідовність фрагменту антитіла; кодуючу послідовність для всього антитіла або його частини; кодуючу послідовність для антитіла, фрагмента або частини, а також додаткові послідовності, такі як кодуюча послідовність принаймні одного сигнального лідера або зливного пептида, з або без вищезгаданих додаткових кодуючих послідовностей, таких як принаймні один інтрон, разом з додатковими, некодуючими послідовностями, включаючи, але не обмежуючись, некодуючі 5' та 3' послідовності, такі як транскрибовані, нерозширофані послідовності, що відіграють роль у транскрипції, обробці мРНК, включаючи сигнали склеювання та поліаденіляції (наприклад - рибосомне зв'язування та стабілізація мРНК); додаткова кодуюча послідовність, що кодує додаткові амінокислоти, такі як ті, що забезпечують додаткові властивості. Отже, послідовність кодуюча антитіло може бути поєднана з маркером послідовності, таким як послідовність кодуюча пептид, що покращує очищення зливного антитіла, яка містить фрагмент або частину антитіла.

Полінуклеотиди, що селективно гібридизовані до полінуклеотида як це описано тут

Даний винахід описує ізолювані нуклеїнові кислоти, що гібридизовані за допомогою селективної гібридизації до полінуклеотидів, описаних тут. Отже, полінуклеотиди даного впровадження можуть бути використані для ізоляції, визначення та/або квантифікації нуклеїнових кислот, що містять такі полінуклеотиди. Наприклад, полінуклеотиди даного винаходу можуть бути використані для ідентифікації, ізолювання або посилення часткових чи повномасштабних клонів у депонованій бібліотеці. В деяких впровадженнях, полінуклеотиди є геномними або цДНК послідовностями ізолюваними або якимось іншим чином допоміжними щодо цДНК з бібліотеки нуклеїнових кислот людей або ссавців.

Бажано, щоб бібліотека цДНК містила принаймні 80% послідовностей повної довжини, краще принаймні 85% або 90% послідовностей повної довжини, і ще краще - 95% послідовностей повної довжини. Бібліотеки цДНК можуть бути нормалізовані для підвищення репрезентативності рідкісних випадків. Низька або помірна строгість умов гібридизації типово, але не ексклюзивно, застосовується з послідовностями, що мають знижену ідентичність послідовності відносно допоміжних послідовностей. Умови помірної або високої строгості можуть додатково застосовуватися для послідовностей більшої ідентичності. Умови низької строгості дозволяють селективно гібридизувати послідовності, що мають приблизно 70% ідентичності послідовності, і можуть застосовуватися для визначення ортологічних або паралогічних послідовностей.

Додатково, полінуклеотиди даного винаходу кодуватимуть принаймні частину антитіла, що кодується полінуклеотидами, які описані тут. Поліну-

клеотиди даного винаходу включають послідовності нуклеїнових кислот, що можуть застосовуватися для селективної гібридизації до полінуклеотидів кодуючих антитіло даного винаходу. Див., напр., Ausubel, вище; Colligan, вище, кожний повністю включений тут у посиланнях.

Конструкція нуклеїнових кислот

Ізолювані нуклеїнові кислоти даного винаходу можуть бути вироблені з використанням (а) рекомбінантних методів, (b) синтетичних методик, (c) методик очищення або їхньої комбінації, що добре відомі науці.

Нуклеїнові кислоти можуть включати послідовності на додаток до полінуклеотида даного винаходу. Наприклад, мульти-клонуючий сайт, що містить один або більше ендонуклеазний обмежувальний сайт, може бути вставлений в нуклеїнову кислоту для допомоги в ізоляції полінуклеотида. Також, транслбовані послідовності можуть бути вставлені для допомоги в ізоляції транслбованого полінуклеотида даного винаходу. Наприклад, гекса-гістидинова маркерна послідовність надає зручний спосіб очищення протеїнів даного винаходу. Нуклеїнова кислота даного винаходу - за винятком кодуючої послідовності - додатково є вектором, адаптером або поєднувачем для клонування та/або експресії полінуклеотида даного винаходу.

Додаткові послідовності можуть бути додані до таких послідовностей клонування та/або експресії для оптимізації їхньої функції в клонуванні та/або експресії, для допомоги в ізоляції полінуклеотида або для покращення введення полінуклеотида в клітину. Використання клонованих векторів, експресованих векторів та поєднувачів добре відомо науці. [Див., напр., Ausubel, вище; або Sambrook, вище]

Рекомбінантні методики конструювання нуклеїнових кислот

Склад ізолюваних нуклеїнових кислот даного винаходу, таких як РНК, цДНК, геномна ДНК або будь-які їхні комбінації, можуть бути отримані з біологічних джерел з використанням будь-якої кількості методик клонування відомих тим, хто є фахівцем в цій галузі. В деяких впровадженнях, олігонуклеотидні зразки, що селективно гібридизуються, за строгих умов, до полінуклеотидів даного винаходу використовуються для ідентифікації бажаної послідовності в цДНК та геномних бібліотеках, що добре відомо тим, хто є фахівцем в цій галузі [Див., напр., Ausubel, вище; або Sambrook, вище]

Методи скринінгу та ізоляції нуклеїнових кислот

Бібліотеки цДНК або геномні бібліотеки можуть бути переглянуті з використанням зразків, що ґрунтуються на послідовності полінуклеотида даного винаходу, таких як описані тут. Зразки можуть використовуватися для гібридизації з послідовностями геномної ДНК або цДНК для ізоляції гомологічних генів в тому ж чи різних організмах. Ті, хто є фахівцями в даній галузі, усвідомлюють, що в аналізах можуть застосовуватися різноманітні ступені жорсткості гібридизації. Якщо умови гібридизації стануть більш жорсткими, то мусить бути бі-

льший ступінь доповнюваності між зразком та ціллю для виникнення дуплексного утворення. Ступінь жорсткості може контролюватися одним або декількома факторами температури, іонної сили, рН та наявності частково денатуруючого розчинника, такого як формамід. Наприклад, жорсткість гібридизації зручно змінювати змінюючи полярність розчину реактанта, наприклад, за допомогою маніпулювання концентрацією формаміда у межах від 0% до 50%. Ступінь доповнюваності (ідентичність послідовності), що потрібна для визначеного зв'язування, буде варіювати згідно з жорсткістю гібридизаційних засобів та/або засобів відмивання.

Методи посилення РНК або ДНК добре відомі в науці і можуть використовуватися згідно з даним винаходом без неналежного експериментування, ґрунтуючись на керівництвах, що представлені тут.

Відомі методи посилення ДНК або РНК включають, але не обмежуються, полімеразну ланцюгову реакцію (PCR) та відповідні процеси посилення [див., напр., патент США №№ 4,683,195, 4,683,202, 4,800,159, 4,965,188, що належать Mullis et al; 4,795,699 та 4,921,794, що належать Tabor, et al; 5,142,033, що належить Innis; 5,122,464, що належить Wilson, et al.; 5,091,310, що належить Innis; 5,066,584, що належить Gyllensten, et al; 4,889,818, що належить Gelfand, et al; 4,994,370, що належить Silver, et al; 4,766,067, що належить Biswas; 4,656,136, що належить Ringold] та РНК-медіоване посилення, що використовує анти-чутливу РНК для цільової послідовності, в якості шаблону для синтезу подвійно-ланцюгової ДНК [патент США № 5,130,238, що належить Malek, et al, під торговою назвою NASBA], повний зміст посилань яких включений тут у посиланнях [Див., напр., Ausubel, вище; або Sambrook, вище].

Наприклад, технологія полімеразної ланцюгової реакції (PCR) може використовуватися для посилення послідовності полінуклеотидів даного винаходу та залежних генів безпосередньо з бібліотек геномної ДНК або цДНК. PCR та інші методи посилення *in vitro* також можуть бути корисними, наприклад, для клонування послідовностей нуклеїнових кислот, що кодують протеїни, які будуть експресовані, для виробництва нуклеїнових кислот для використання в якості зразків для визначення наявності бажаних мРНК у зразках, для послідовності нуклеїнових кислот або для інших цілей. Приклади методик, яких достатньо, щоб скерувати осіб, котрі мають відповідні навички, у методиках посилення *in vitro* знаходяться у Berger, вище, Sambrook, вище та Ausubel, вище, а також Mullis, et al., [патент США № 4,683,202 (1987); та Innis, et al., PCR Protocols A Guide to Methods and Applications, Eds., Academic Press Inc., San Diego, CA (1990)]. Комерційно доступні набори для геномного PCR посилення є відомими науці. Див., напр., Advantage-GC Genomic PCR Kit (Clontech). Додатково, напр., протеїн T4 гену 32 (Boehringer Mannheim) може використовуватися для покращення виходу продуктів довгої PCR.

Синтетичні методи конструювання нуклеїнових кислот

Ізольовані нуклеїнові кислоти даного винаходу також можуть бути підготовленими безпосереднім

хімічним синтезом за допомогою відомих методів [див., напр., Ausubel, et al., вище]. Хімічний синтез загалом продукує одно-нитковий олігонуклеотид, який може бути конвертований в дво-ниткову ДНК за допомогою гібридизації з допоміжною послідовністю або за допомогою полімеризації з ДНК полімеразою з використанням однієї нитки в якості шаблону. Ті, хто мають відповідну кваліфікацію в цій галузі, розуміють, що в той час як хімічний синтез ДНК може бути обмеженим до послідовностей з приблизно 100 або більше основ, довші послідовності можуть бути отримані за допомогою зв'язування коротших послідовностей.

Касети рекомбінантної експресії

Даний винахід у подальшому описує касети рекомбінантної експресії, що містять нуклеїнову кислоту даного винаходу. Послідовність нуклеїнової кислоти даного винаходу, наприклад цДНК або геномна послідовність, що кодує антитіло даного винаходу, може використовуватися для конструювання касети рекомбінантної експресії, що може впроваджуватися безпосередньо в. принаймні одну бажану клітину господаря. Касета рекомбінантної експресії зазвичай містить полінуклеотид даного винаходу, що реально зв'язаний з транскрипційними ініціюючими регуляторними послідовностями, що спрямовують транскрипцію полінуклеотида в заплановану клітину господаря. Обидва гетерологічні та негетерологічні (тобто, ендегенні) промотери можуть застосовуватися для безпосередньої експресії нуклеїнових кислот даного винаходу.

В деяких впровадженнях, ізольовані нуклеїнові кислоти, що слугують як промотери, покращувачі або інші елементи можуть впроваджуватися у відповідну позицію (вище, нижче або в інтрон) негетерологічної форми полінуклеотида даного винаходу, для того щоб зменшувати або збільшувати експресію полінуклеотида даного винаходу. Наприклад, ендегенні промотери можуть бути змінені *in vivo* або *in vitro* за допомогою мутації, видалення та/або заміни.

Вектори та клітини господаря

Даний винахід також стосується векторів, що включають ізольовані нуклеїновокислотні молекули даного винаходу, клітин господаря, що є модифіковані з рекомбінантними векторами методами генетичної інженерії, та методи продукції принаймні одного анти-подвійного інтегринового антитіла за допомогою рекомбінантних методик, що відомі науці. Див., напр., Sambrook, et al., вище; Ausubel, et al., вище, кожні з них внесена тут у посиланнях.

Полінуклеотиди можуть бути додатково поєднаними з вектором, що містить відібраний маркер для проникнення в господаря. Загалом, плазмідний вектор вводиться в преципітат, такий як кальцієвий фосфатний преципітат, або в комплекс із зарядженим ліпідом. Якщо вектор є вірусом, то він може бути спактованим *in vitro* з використанням відповідних ліній пакувальних клітин і потім можуть бути перетворені в клітини господаря.

ДНК вставка має бути реально поєднана з належним промотером. Конструкція експресії в подальшому міститиме обмежувальні сайти для ініціації транскрипції, припинення та, в транскрибованому регіоні, рибосом-зв'язуюче міс-

це для трансляції. Кодуюча частина зрілих транскриптів експресується за допомогою конструкцій, що бажано має включати кодон, який ініціює трансляцію, на початку і припиняючий кодон (напр., UAA, UGA або UAG), який належно розташований в кінці мРНК, яка має бути трансльована, при перевазі UAA та UAG для клітинної експресії у ссавців чи еукаріот.

Вектори експресії бажано, але не обов'язково, мають включати принаймні один обраний маркер. Такі маркери включають, напр., але не обмежуються, метотрексат (MTX), дигідрофолат редуктазу [DHFR, патент США №№ 4,399,216; 4,634,665; 4,656,134; 4,956,288; 5,149,636; 5,179,017], резистентність по ампіциліну, неоміцину (G418), мікофенолової кислоти або глютамін синтетазі [GS, патент США №№ 5,122,464; 5,770,359; 5,827,739] для еукаріотичних клітинних культур та тетрациклін- або ампіцилін-резистентні гени для культивування в *E.coli* та інших бактеріях або прокаріотах (вищенаведені патенти повністю включено тут у посиланнях). Відповідні культурні середовища і умови для вищеписаних клітин господаря відомі науці. Відповідні вектори є знайомими для кваліфікованих фахівців. Введення векторної конструкції у клітину господаря може бути здійснено за допомогою трансфекції фосфатом кальцію, DEAE-декстран-медіованою трансфекцією, катіонною ліпідно-медіованою трансфекцією, електропорацією, трансдукцією, інфікуванням або іншими відомими методами. Такі методи описані в роботах, таких як Sambrook, вище, розділи 1-4 та 16-18; Ausubel, вище, розділи 1, 9, 13, 15, 16.

Принаймні одне антитіло даного винаходу може бути експресоване у модифікованій формі, такий як зливний протеїн, і може включати не тільки сигнали секреції, але також додаткові гетерологічні функціональні регіони. Наприклад, регіон додаткових амінокислот, зокрема заряджені амінокислоти, може додаватися до N-закінчення антитіла для покращення стабільності та персистенції в клітині господаря, під час очищення або під час подальшого захоплення і зберігання. Також, пептидні молекули можуть додаватися до антитіла даного винаходу для поліпшення очищення. Такі регіони можуть прибиратися до остаточного приготування антитіла або принаймні одного його фрагмента. Такі методи описані у багатьох стандартних лабораторних керівництвах, таких як Sambrook, вище, розділи 17.29-17.42 та 18.1-18.74; Ausubel, вище, розділи 16, 17 та 18.

Ті, хто мають належні навички в цій галузі, знають численні системи експресії, що доступні для експресії нуклеїнової кислоти, яка кодує протеїн даного винаходу.

Альтернативно, нуклеїнові кислоти даного винаходу можуть експресуватися в клітині господаря за допомогою вмикання (маніпуляційно) і клітині господаря, що містить ендегенну ДНК, яка кодує антитіло даного винаходу. Такі методи добре відомі науці, напр., як це описано в [патенті США №№ 5,580,734, 5,641,670, 5,733,746 та 5,733,761], що повністю включені тут у вигляді посилань.

Ілюстрацією клітинних культур, що є корисними для продукування антитіл, певних їхніх частин або варіантів, є клітини ссавців. Системи клітин ссав-

ців часто бувають в формі моношарових клітин, хоча суспензії або біореактори клітин ссавців також можуть використовуватися. Наукою розроблено багато належних ліній клітин господаря спрможних експресувати інтактні глікозильовані протеїни, і вони включають клітинні лінії COS-1 (напр., ATCC CRL 1650), COS-7 (напр., ATCC CRL 1651), HEK293, BHK21 (напр., ATCC CRL-10), CHO (напр., ATCC CRL 1610) та BSC-1 (напр., ATCC CRL-26), клітини Cos-7, клітини CHO, клітини her G2, клітини P3X63Ag8.653, SP2/0-Ag14, 293, клітини HeLa тощо, які доступні від, наприклад, American Type Culture Collection, Manassas, Va [www.atcc.org]. Бажані клітини господаря включають клітини лімфоїдного походження, такі як клітини мієломи і лімфоми. Зокрема бажаними клітинами господаря є клітини P3X63Ag8.653 (ATCC Accession Number CRL-1851) та клітини SP2/0-Ag14 (ATCC Accession Number CRL-1851). В окремих бажаних впровадженнях рекомбінантною клітинами є клітини P3X63Ag8.653 або SP2/0-Ag14.

Вектори експресії для цих клітин можуть включати одну або більше з наступних послідовностей контролю експресії, таких як, але не обмежуючись походженням реплікації; промоутер (напр., пізній або ранній промоутер SV40, промоутер CMV [патент США №№ 5,168,062; 5,385,839], промоутер HSV tk, промоутер pgk (фосфогліцерат кіназа), промоутер EF-1 альфа [патент США № 5,266,491], принаймні один людський іміноглобуліновий промоутер; сайти покращувача та/або інформаційної обробки, такі як рибосомо-зв'язуючі сайти, поліаденилаційні сайти (напр., додатковий сайт SV40 великого T Ag полі A) та транскрипційні припиняючі послідовності. Див., напр., Ausubel et al., вище; Sambrook, et al., вище. Інші клітини корисні для продукування нуклеїнових кислот або протеїнів даного винаходу відомі та/або доступні, наприклад, від American Type Culture Collection Catalogue of Cell Lines and Hybridomas [www.atcc.org] або інших відомих чи комерційних джерел.

Коли використовуються еукаріотичні клітини господаря, то поліаденилаційні або припиняючі послідовності зазвичай включені до вектора. Прикладом припиняючої послідовності є поліаденилаційна послідовність з гена коров'ячого гормону роста. Послідовності для акуратного зклеювання транскриптів також можуть бути включеними. Прикладом зклеєної послідовності є інтрон VP1 з SV40 [Sprague, et al., J.Virol. 45:773-781 (1983)]. Додатково, генні послідовності для контролю реплікації в клітинах господаря можуть бути включеними до вектора, як це відомо науці.

Очищення антитіла

Анти-подвійне інтегроване антитіло може бути відновлене і очищене з культур рекомбінантних клітин добровідними методами включаючи, але не обмежуючись, очищення протеїном А, преципітація аммонією сульфатом або етанолом, кислотна екстракція, аніонна або катіонна обміна хроматографія, фосфоцелюлозна хроматографія, хроматографія гідрофобічної взаємодії, афінна хроматографія, гідроксилапатитна хроматографія та лектинова хроматографія. Високотовиробнича рідинна хроматографія ("HPLC") також може вико-

ристовуватися для очищення. Див., напр., Colligan, Current Protocols in Immunology, або Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2001), напр., розділи 1, 4, 6, 8, 9, 10, кожний з яких включений тут у посиланнях.

Антитіла даного винаходу включають природні очищенні продукти, продукти хімічного синтезу та продукти, що вироблені за допомогою рекомбінантних методик, з еукаріотичних господарів, включаючи, наприклад, кітини дріжджів, вищих рослин, комах та ссавців. Залежно від використаного господаря в процедурах рекомбінантної продукції, антитіло даного винаходу може бути глікозильоване або може бути неглікозильоване, надається перевага глікозильованому. Такі методи описані в багатьох стандартних лабораторних керівництвах, таких як Sambrook, вище, розділи 17.37-17.42; Ausubel, вище, розділи 10, 12, 13, 16, 18 та 20, Colligan, Protein Science, вище, розділи 12-14, всі вони повністю включені тут у посиланнях.

Анти-подвійні інтегринові антитіла

Ізольовані антитіла даного винаходу складаються з описаних тут амінокислотних послідовностей антитіла, що кодуються будь-яким відповідним полінуклеотидом, або будь-яке ізольоване і приготовлене антитіло. Бажано, щоб людське антитіло або антиген-зв'язуючий фрагмент зв'язував людський подвійний інтегрин та, таким чином частково або суттєво нейтралізував принаймні одну біологічну дію протеїна. Антитіло або певна його частина чи варіант, що частково і переважно істотно нейтралізує принаймні одну біологічну дію принаймні одного подвійного інтегринового протеїна або фрагмента може зв'язувати протеїн або фрагмент і таким чином пригнічувати дію, що медіюється через зв'язування подвійного інтегрин з рецептором подвійного інтегрин або через інші подвійні інтегрин-залежні або медіювані механізми. Термін "нейтралізуюче антитіло", що використовується тут, відноситься до антитіла, яке може пригнічувати подвійну інтегрин-залежну активність на приблизно 10-120%, бажано на принаймні приблизно 10, 20, 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100% або більше залежно від аналізу. Спроможність анти-подвійних інтегринових антитіл пригнічувати подвійну інтегрин-залежну активність переважно оцінюється за допомогою аналізу принаймні одного відповідного інтегринового протеїна або рецептора, як це описано тут та/або як це відомо науці. Людське антитіло винаходу може бути будь-якого класу (IgG, IgA, IgM, IgE, IgD тощо) або ізотипу і може містити каппа або ламбда ланцюги. В одному впровадженні, людське антитіло містить важкий ланцюг або певний фрагмент IgG, наприклад, принаймні один ізотип IgG1, IgG2, IgG3 або IgG4. Антитіла цього типу можуть бути приготовлені за допомогою застосування трансгенних мишей або інших трансгенних нелюдських ссавців, що містять трансгени принаймні одного людського легкого ланцюга (напр., IgG, IgA та IgM (напр., $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$, $\gamma 4$), як це описано тут та/або як це відомо науці. В іншому впровадженні, анти-людське подвійне інтегринове людське антитіло містить важкий ланцюг IgG1 та легкий ланцюг IgG1.

Принаймні одне антитіло винаходу зв'язує принаймні один певний епітоп специфічний до принаймні одного подвійного інтегринового протеїна, субодиниці, фрагмента, частини або будь-якої комбінації. Принаймні один епітоп може містити принаймні один антитіло-зв'язуючий регіон, що містить принаймні одну частину вищезгаданого протеїну, епітоп котрого переважно складається з принаймні однієї позаклітинної, розчинної, гідрофільної, зовнішньої або цитоплазматичної частини вищезгаданого протеїна. Принаймні один певний епітоп може містити будь-яку комбінацію принаймні однієї амінокислотної послідовності з принаймні 1-3 амінокислот до повної певної частини прилеглих амінокислот SEQ ID NOS:9,16 або 17.

Загалом, людське антитіло або антитіло-зв'язуючий фрагмент даного винаходу міститиме антиген-зв'язуючий регіон, що має принаймні один людський допоміжний визначальний регіон (CDR1, CDR2 та CDR3) або варіант принаймні одного важколанцюгового варіабельного регіона та принаймні один людський допоміжний визначальний регіон (CDR1, CDR2 та CDR3) або варіант принаймні одного легколанцюгового варіабельного регіона. В якості одного з прикладів, антитіло або антиген-зв'язуюча частина або варіант може містити принаймні один важколанцюговий CDR3, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO:3 та/або легколанцюговий CDR3, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO:6. В окремому впровадженні, антитіло або антиген-зв'язуючий фрагмент можуть мати антиген-зв'язуючий регіон, що містить принаймні частину принаймні одного важколанцюгового CDR (тобто, CDR1, CDR2 та/або CDR3), що мають амінокислотну послідовність, яка відповідає CDR 1, 2 та/або 3 (напр., SEQ ID NOS:1, 2 та/або 3). В іншому окремому впровадженні, антитіло або антиген-зв'язуюча частина або варіант можуть мати антиген-зв'язуючий регіон, що містить принаймні частину принаймні одного легколанцюгового CDR (тобто, CDR1, CDR2 та/або CDR3), який має амінокислотну послідовність, що відповідає CDR 1, 2 та/або 3 (напр., SEQ ID NOS: 4, 5 та/або 6). У виділеному впровадженні три важколанцюгових CDR та три легколанцюгових CDR антитіла або антиген-зв'язуючого фрагмента мають амінокислотну послідовність відповідних CDR принаймні одного з Мат Gen095, Gen0101, CNTO 95, C372A, як це описано тут. Такі антитіла можуть бути виготовлені за допомогою хімічного з'єднання з різноманітними частинами (напр., CDR, каркас) антитіла з використанням традиційних методик, за допомогою приготування і експресування (тобто, однієї або більше) нуклеїнових кислотних молекул, що кодує антитіло з використанням традиційних методик технології рекомбінантної ДНК або за допомогою використання будь-яких інших належних методів.

Анти-подвійне інтегринове антитіло може містити принаймні один важко- або легколанцюговий варіабельний регіон, що має визначену амінокислотну послідовність. Наприклад, у виділеному впровадженні, анти-подвійне інтегринове антитіло містить принаймні один з принаймні одного важколанцюгового варіабельного регіону, що додатково може мати амінокислотну послідовність SEQ ID

№7 та/або принаймні один легколанцюговий варіабельний регіон, що може додатково мати амінокислотну послідовність SEQ ID №8. Антитіла, що зв'язують людський подвійний інтегрин та, що містять певний важко- або легколанцюговий варіабельний регіон, можуть бути приготовлені з використанням належних методів, таких як бактеріофагова проява [Katsube, Y., et al, Int J Mol Med, 1(5):863-868 (1998)] або методів, що використовують трансгенні тварин, які відомі в науці та/або описані тут. Наприклад, трансгенні миші, що містять функціонально переналаштований людський імунноглобуліновий важколанцюговий трансген та трансген, який містить ДНК з людського імунноглобулінового легколанцюгового локуса, що може проходити функціональне переналаштування, можуть бути імунізовані людським подвійним інтегрином або його фрагментом для запуску продукції антитіл. При бажанні, клітини продукуючі антитіла можуть бути ізольовані та можуть бути приготовлені гібридами або інші безсмертні клітини, що продукують антитіла, як це описано тут та/або відомо в науці. Альтернативно, антитіло, певна частина або варіант можуть експресуватися з використанням кодуєчих нуклеїнових кислот або їх частин в належній клітині господаря.

Винахід також відноситься до антитіл, антиген-зв'язуючих фрагментів, імунноглобулінових ланцюгів та CDR, що містять амінокислоти в послідовності, яка є практично такою ж, як і амінокислотна послідовність, описана тут. Бажано, щоб антитіла

або антиген-зв'язуючі фрагменти та антитіла, які містять такі ланцюги або CDR, могли зв'язувати людський подвійний інтегрин з високою афінністю (напр., K_D менше або дорівнює приблизно $10^{-9}M$). Амінокислотна послідовність, що є практично такою ж, як і послідовність описана тут, містить консервативні амінокислотні заміни, а також амінокислотні видалення та/або вставки. Консервативною амінокислотою заміною називається заміна першої амінокислоти другою амінокислотою, що має хімічні та/або фізичні властивості (напр., заряд, структуру, полярність, гідрофобність/гідрофільність), які є такими ж, як і у першій амінокислоті. Консервативні заміни включають заміну однієї амінокислоти іншою в таких групах: лізин (K), аргінін (R) та гістидин (H); аспартат (D) і глютамат (E); аспаригін (N), глютамін (Q), серин (S), треонін (T), тирозин (Y), K, R, H, D та E; аланін (A), валін (V), лейцин (L), ізолейцин (I), пролін (P), фенілаланін (F), триптофан (W), метіонін (M), цистеїн (C) та гліцин (G); F, W та Y; C, S та T.

Коди амінокислот

Амінокислоти, що складають анти-подвійні інтегринові антитіла даного винаходу, часто скорочуються у вигляді аббревіатури. Амінокислотні позначення можуть бути сформовані з позначень амінокислот у вигляді однобуквенного коду, їх трибуквенного коду, імені або тринуклеотидного коду, так як це часто робиться в наукових роботах [див. Alberts, B., et al., Molecular Biology of The Cell, Third Ed., Garland Publishing, Inc., New York, 1994]:




Анти-подвійне інтегринове антитіло даного винаходу може включати одну або більше амінокислоту заміну, видалення або додавання, або наслідок природної мутації або людських маніпуляцій, як це визначено тут.

Звісно, кількість амінокислотних заміни залежатиме від багатьох факторів, включаючи ті, що описані вище. Взагалі кажучи, кількість амінокислотних заміни, вставок або видалень для будь-якого даного інтегринового антитіла буде не більше, ніж 40, 30, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8,

7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, такою як 1-30 або будь-який діапазон чи значення, як вказано тут.

Амінокислоти в анти-подвійному інтегриновому антитілі даного винаходу, що є обов'язковими для функції, можна ідентифікувати за допомогою методів, що відомі в науці, таких як спрямований мутагенез чи аланін-скануючий мутагенез [напр., Ausubel, вище, розділ 8, 15; Cunningham and Wells, *Science* 244:1081-1085 (1989)]. Остання процедура включає тільки аланінову мутацію кожного залишку молекули. Результуючі мутантні молекули потім перевіряються на біологічну дію, таку як, але не тільки, принаймні одна нейтралізуюча дія щодо подвійного інтегрину. Місця, що є критичними для зв'язування антитіла, можуть також бути ідентифіковані за допомогою структурного аналізу, такого як кристалізація, ядерно-магнітний резонанс або фотоафінне мічення [Smith, et al., *J. Mol. Biol.* 224:899-904 (1992) та de Vos, et al., *Science* 255:306-312 (1992)].

Анти-подвійні інтегринові антитіла даного винаходу можуть включати, але не обмежуватись, принаймні одну частину, послідовність або комбінацію, обрану з 5 до всіх прилеглих амінокислот принаймні одного SEQ ID №:1, 2, 3, 4, 5, 6.

Анти-подвійне інтегринове антитіло може також додатково містити поліпептид з принаймні однієї з 70-100% прилеглих амінокислот принаймні однієї SEQ ID №:7, 8.

В одному впровадженні, амінокислотна послідовність імунноглобулінового ланцюга або його частини (напр., варіабельний регіон, CDR) має приблизно 70-100% ідентичність (напр., 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 або будь-який діапазон або значення) до амінокислотної послідовності відповідного ланцюга принаймні одного з SEQ ID №№7, 8. Наприклад, амінокислотна послідовність важколанцюгового CDR може порівнюватися з SEQ ID №7. Бажано, щоб 70-100% амінокислотна ідентичність (тобто, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 або будь-який діапазон чи значення) визначалися за допомогою належного комп'ютерного алгоритма, як це відомо науці.

Показові послідовності важколанцюгових та легколанцюгових варіабельних регіонів забезпечені в SEQ ID №№7, 8. Антитіла даного винаходу або його певні варіанти можуть містити будь-яку кількість прилеглих амінокислотних залишків з антитіла даного винаходу, де кількість вибирається з групи цілих чисел, що складаються з 10-100% кількості прилеглих залишків в анти-подвійному інтегриновому антитілі. Додатково, ця послідовність прилеглих амінокислот є завдовжки в принаймні приблизно 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250 або більше амінокислот, або будь-який діапазон чи значення. Далі, кількість таких послідовностей може бути будь-яким цілим числом обраним з групи чисел від 1 до 20, таких як принаймні 2, 3, 4 або 5.

Як зрозуміло фахівцям в даній галузі, даний винахід включає принаймні одне біологічно активне антитіло даного винаходу. Біологічно активні антитіла мають певну активність на рівні 20%, 30%

або 40%, та бажано принаймні 50%, 60% або 70% та ще бажаніше принаймні 80%, 90% або 95-100% від активності природного (несинтетичного), ендогенного і відомого антитіла. Методи аналізу та заходи визначення ферментної активності та субстратної специфічності добре відомі тим, хто має відповідну кваліфікацію в даній галузі науки.

В іншому аспекті, винахід стосується людських антитіл та антиген-зв'язуючих фрагментів, як це описано тут, які модифікуються за допомогою ковалентного приєднання органічних молекул. Така модифікація може продукувати антитіло або антиген-зв'язуючий фрагмент з поліпшеними фармакокінетичними властивостями (напр., збільшений сировотковий час півжиття *in vivo*). Органічна молекула може бути лінійною або розгалуженою гідрофільною полімерною групою, жирнокислотною групою або жирнокислотною ефірною групою. В окремому впровадженні, гідрофільна полімерна група може мати молекулярну вагу приблизно від 800 до приблизно 120000 Дальтон і може бути поліалкангліколем (напр., поліетиленгліколь (PEG), поліпропіленгліколь (PPG)), карбогідратним полімером, амінокислотним полімером або полівініловим піролідом, а жирнокислотні або жирнокислотні ефірні групи можуть містити від приблизно 8 до приблизно 40 атомів вуглецю.

Модифіковані антитіла та антиген-зв'язуючі фрагменти винаходу можуть містити одну або більше органічних молекул, що є ковалентно зв'язаними, прямо або непрямо, з антитілом. Кожна органічна молекула, що зв'язана з антитілом або антиген-зв'язуючим фрагментом винаходу може незалежно бути гідрофільною полімерною групою, жирнокислотною групою або жирнокислотною ефірною групою. Термін, що тут використовується, "жирна кислота" охоплює монокарбоксильні кислоти і дикарбоксильні кислоти. "Гідрофільна полімерна група", в якості терміну, що використовується тут, відноситься до органічного полімера, що є більш розчинним у воді, ніж в октані. Отже, антитіло модифіковане ковалентним приєднанням полілізіна охоплюється винаходом. Гідрофільні полімери, що підходять для модифікації антитіл винаходу, можуть бути лінійними або розгалуженими і включати, наприклад, поліалкалінгліколи (напр., PEG, монометокси-поліетиленгліколь (mPEG), PPG тощо), карбогідрати (напр., декстран, целюлоза, олігосахариди, полісахариди тощо), полімери гідрофільних амінокислот (напр., полілізін, поліаргінін, поліаспартат тощо), поліакаліноксиди (напр., поліетиленоксид, поліпропіленоксид тощо) та полівініл піролідон. Бажано, щоб гідрофільний полімер, який модифікує антитіло винаходу, мав молекулярну масу від приблизно 800 до 150000 Дальтон, в якості окремої молекули. Наприклад може використовуватися PEG5000 і PEG20000, де нижній індекс є середньою молекулярною вагою полімера в Дальтонах. Гідрофільна полімерна група може бути замінена від 1 до 6 алкільними, жирнокислотними та жирнокислотною ефірними групами. Гідрофільні полімери, що замінені жирнокислотною або жирнокислотною ефірною групою, можуть бути приготовлені за допомогою застосування належних методів. Наприклад, полімер, що містить амінну групу може

бути зпареним з карбоксилатом жирної кислоти або жирнокислотного ефіру та активованим карбоксилатом (напр., активований за допомогою N, N-карбоніл димідазола) на жирній кислоті або ефірі жирної кислоти може бути зпареним з гідроксильною групою на полімері.

Жирні кислоти та ефіри жирної кислоти, які підходять для модифікації антитіл винаходу, можуть бути сатуровані або можуть містити одну або більше одиницю несатурації. Жирні кислоти, що підходять для модифікації антитіл винаходу, включають, наприклад, n-додеканат (C_{12} , лаурат), n-тетрадеканат (C_{14} , мірістат), n-октадеканат (C_{18} , стеарат), n-ейкозаноат (C_{20} , арахідат), n-докозаноат (C_{22} , бегенат), n-триаконтаноат (C_{30}), n-тетрактантоат (C_{40}), цис- Δ^9 -октадеканат (C_{18} , олеат), всі цис- $\Delta^{5,8,11,14}$ -ейкозатетраеноат (C_{20} , арахідонат), октанедіоїєва кислота, тетрадеканедіоїєва кислота, октадеканедіоїєва кислот тощо. Відповідні ефіри жирних кислот включають моно-ефіри дикарбоксильних кислот, що містять лінійну або розгалужену нижню алкілову групу. Нижня алкілова група може містити від 1 до приблизно 12, бажано від 1 до 6, атомів вуглецю.

Модифіковані людські антитіла та антиген-зв'язуючі фрагменти можуть бути приготовлені з використанням належних методів, таких як реакція з одним або більше модифікованим агентом. "Модифікований агент", в якості використовуваного тут терміну, стосується належної органічної групи (напр., гідрофільний полімер, жирна кислота, ефір жирної кислоти), що містить активуючу групу. "Активуюча група" є хімічною молекулою або функціональною групою, що може, за певних умов, реагувати з другою хімічною групою, таким чином формуючи ковалентний зв'язок між модифікуючим агентом та другою хімічною групою. Наприклад, аміно-реактивні активуючі групи включають електрофільні групи, такі як тозилат, мезилат, гало (хлоро, бромо, фторо, йодо), N-гідроксисукцинімідолові ефіри (NHS) тощо. Активуючі групи, що можуть реагувати з тіолами, включають, наприклад, малеїмід, йодоацетил, акрилол, піридил дисульфід, тіол 5-тіол-2-нітробензоєвої кислоти (TNB-тіол) тощо. Альдегідна функціональна група може бути зв'язана з аміно- або гідрозид-вміщуючими молекулами, а азидна група може реагувати з тривалентною фосфорною групою для формування фосфорамідатних або фосфорімідинових зв'язків. Належні методи для введення активуючих груп в молекулу відомі науці [див. наприклад, Hemanson, G.T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press: San Diego, CA (1996)]. Активуюча група може бути зв'язана безпосередньо з органічною групою (напр., гідрофільний полімер, жирна кислота, ефір жирної кислоти) або через зв'язуючу молекулу, наприклад дивалентну групу C_{1-12} , де один або більше атомів вуглецю можуть бути замінені гетероатомом, таким як кисень, азот або сірка. Належні зв'язуючі молекули включають, наприклад, тетраетилєнглїколь, $-(CH_2)_3-$, $-NH-(CH_2)_6-NH-$, $-(CH_2)_2-NH$ та $-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH-NH-$. Модифікуючі агенти, що містять зв'язуючу молекулу, можуть бути виготовлені, наприклад, за допомогою реакції моно-Вос-алкілдіаміна (напр., моно-Вос-етилєнєдіаміна,

моно-Вос-діаміногексана) з жирною кислотою за присутності 1-етил-3-(3-діетиламінопропіл) карбодіміда (EDC) для формування амідного зв'язку між жирним аміном та карбоксилатом жирної кислоти. Захисна група Вос може бути видалена з продукту за допомогою обробки трифтороацетовою кислотою (TFA), що впливає на первинний амін, який може бути зв'язаний з іншим карбоксилатом, як це описано, або може реагувати з малеїковим ангідридом, а результуючий продукт циклізується для продукування активованого малеїмідового похідного жирної кислоти. [Див. наприклад, Thompson, et al., WO 92/16221, повний виклад якого вміщено тут у посиланнях].

Модифіковані антитіла винаходу можуть бути виготовлені за допомогою реакції людського антитіла або антиген-зв'язуючого фрагмента з модифікуючим агентом. Наприклад, органічні молекули можуть бути зв'язані з антитілом у несайтоспецифічним спосіб за допомогою застосування амін-реактивного модифікуючого агента, наприклад, NHS ефіра PEG. Модифіковані людські антитіла або антиген-зв'язуючі фрагменти можуть також бути виготовлені за допомогою зменшення дисульфідних зв'язків (напр., міжланцюгові дисульфідні зв'язки) антитіла або антиген-зв'язуючого фрагмента. Редуковане антитіло або антиген-зв'язуючий фрагмент може потім реагувати з тіол-реактивним модифікуючим агентом для вироблення модифікованого антитіла винаходу. Модифіковані людські антитіла та антиген-зв'язуючі фрагменти, що містять органічну молекулу, яка може бути зв'язана зі специфічними місцями антитіла даного винаходу, може бути приготовлене з використанням належних методів, таких як реверсивний протеоліз [Fisch et al, *Bioconjugate Chem.*, 3:147-153 (1992); Werlen et al, *Bioconjugate Chem.*, 5:411-417 (1994); Kumaran et al, *Protein Sci.* 6(10):2233-2241 (1997); Itoh et al, *Bioorg. Chem.*, 24(1):59-68 (1996); Capellas et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 56(4):456-463 (1997)] та методи описані в Hemanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press: San Diego, CA (1996).

Склад анти-ідіотипних антитіл до анти-подвійних штегринових антитіл

На додаток до моноклональних та химеричних анти-подвійних антитіл, даний винахід також стосується анти-ідіотипічного (анти-Id) антитіла специфічних до антитіл винаходу. Анти-Id антитіло є антитілом, яке розпізнає унікальні детермінанти, що загалом пов'язані з антиген-зв'язуючим регіоном іншого антитіла. Анти-Id можуть бути вироблені за допомогою імунізації тварин такого ж виду та генетичного типу (напр., миші), як і ті, що є джерелом Id антитіла, антитілом або його CDR-вміщуючим регіоном. Імунізована тварина розпізнає та відповідає на ідіотипічні детермінанти імунізуючого антитіла і продукує анти-Id антитіло. Анти-Id антитіло може також використовуватися в якості "імуногена" для індукції імунної відповіді у ще однієї тварини, продукуючи так зване анти-анти-Id антитіло.

Препарат анти-подвійного штегринового антитіла

Даний винахід також описує препарат принаймні одного анти-подвійного інтергенового антитіла,

що містить принаймні одне, принаймні два, принаймні три, принаймні чотири, принаймні п'ять, принаймні шість або більше анти-подвійних інтегринових антитіл, як це описано тут та/або відомо в галузях науки, що описують неприродно виниклі склади, суміші або форми. Такі препарати містять неприродно виниклі склади, що містять принаймні 1 або 2 повної довжини, C- та/або N-термінально видалені варіанти, домени, фрагменти або певні варіанти амінокислотної послідовності анти-подвійного інтегринового антитіла, що обрана з групи, яка містить 70-100% прилеглих амінокислот SEQ ID №№: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 або певні їхні фрагменти, домени чи антитіла. Бажано, щоб препарат анти-подвійного інтегринового антитіла включав принаймні 1 або 2 повної довжини фрагменти, домени або варіанти принаймні однієї CDR-або LDR-вміщуючої частини послідовності анти-подвійного інтегринового антитіла з 70-100% SEQ ID №№: 1, 2, 3, 4, 5, 6 або їхні певні фрагменти, домени чи варіанти. Подальші бажані композиції вміщують 40-99% принаймні одного з 70-100% SEQ ID №№: 1, 2, 3, 4, 5, 6 або певних їхніх фрагментів, доменів чи варіантів. Такі відсотки складу є за вагою, об'ємом, концентрацією, молярністю або молярністю такими ж як рідкі або сухі розчини, суміші, суспензії, емульсії або колоїди, як це відомо науці або описано тут.

Препарат анти-подвійного інтегринового антитіла даного винаходу може містити принаймні одне з будь-якої відповідної та ефективної кількості складу або фармацевтичного препарату, що містить принаймні одне анти-подвійне інтегринове антитіло до клітини, тканини, органу, тварини або пацієнта при потребі такої модуляції, лікування або терапії, що далі додатково містить принаймні одне обране з принаймні одного антагоніста TNF (напр., але не тільки, антитіло або фрагмент антитіла до TNF, розчинний рецептор або його фрагмент до TNF, їхні зливинні протеїни або малу молекулу антагоніста TNF), антиревматичного препарату (напр., метотрексат, ауранофін, ауротіоглюкоза, азатіоприн, етанерсепт, натрієвий тіомалат золота, сульфат гідроксихлорохіна, лефлуномід, сульфасалазин), м'язового релаксанта, наркотика, нестероїдного протизапального препарату (НПЗП), анальгетика, анестетика, седативного, місцевого анестетика, нервово-м'язового блокатора, антимікробного препарату (напр., аміноглікозид, антигрибковий препарат, антипаразитарний препарат, антивірусний препарат, карбапенем, цефалоспорин, фторхінолон, макролід, пеніцилін, сульфонамід, тетрациклін, інші антимікробні препарати), антипсоріатичного препарату, кортикостероїда, анаболічного стероїда, діабетичних препаратів, мінералів, харчових додатків, тиреоїдних препаратів, вітамінів, гормонів, що регулюють обмін кальція, антидіарейних, проти кашльових, антиеметиків, противиразкових препаратів, послаблюючих, антикоагулянтів, еритропоетину (напр., епоетин альфа), філгастима (напр., G-CSF, Нейподжен), сарграмостиму (напр., GM-CSF, Лейкін), імунізації, імуносупресивного засобу (напр., базиліксимаб, циклоспорин, даклізумаб), гормону роста, гормону-замісної терапії, модулятора естрогенових рецепторів, мудріатич-

них, циклоплегічних, алкілюючих засобів, антитаболітиків, інгібіторів мітозу, радіоізотопних засобів, антидепресантів, антиманічних препаратів, антипсихотиків, анксиолітиків, снодійних, симпатоміметиків, стимуляторів, донезепілу, такрину, астматичних препаратів, бета-агоністів, інгаляційних стероїдів, інгібіторів лейкоїну, метилксантину, кромоліну, адреналіну або аналогу, дорнази альфа (Пульмозим), цитокіна або цитокінового антагоніста або антитіла. Деякі приклади таких цитокінів включають, але не обмежуються, будь-які антитіла до IL-1 - IL-23, IL-6, антипухлинні антитіла, хіміотерапевтичні препарати або радіоактивні препарати. Відповідні дози добре відомі в науці. Див., напр., Wells et al., eds., *Pharmacotherapy Handbook*, 2nd Edition/ Appleton and Lange, Stamford, CT (2000); *PDR Pharmacopoeia*, Tarascon Pocket Pharmacopoeia 2000, Deluxe Edition, Tarascon Publishing, Loma Linda, CA (2000), посилання з кожної з цих робіт повністю включені тут у посиланнях.

Такі анти-пухлинні та анти-інфекційні препарати можуть також включати токсинові молекули, що поєднані, пов'язані, сполучені або призначаються разом з принаймні одним антитілом даного винаходу. Токсин може додатково селективно знищувати патологічні клітини або тканини. Патологічна клітина може бути раковою або іншою клітиною. Такі токсини можуть бути, але не тільки, очищеними або рекомбінантними токсинами або фрагментами токсинів, що містять принаймні один функціональний цитотоксичний домен або токсин, напр., обраний принаймні з одного з наступного - рицин, дифтерійний токсин, зміїний токсин або бактеріальний токсин. Термін токсина також включає як ендотоксини, так і екзотоксини, що виробляються будь-якими природно виниклими, мутантними або рекомбінантними бактеріями чи вірусами, які можуть спричинити будь-який патологічний стан у людей та інших ссавців, включаючи токсини шок, що може призвести до смерті. Такі токсини можуть включати, але не обмежуються, ентеротоксигенний тепло-лабільний ентеротоксин *E.coli* (LT), тепло-стійкий ентеротоксин (ST), цитотоксин *Shigella*, ентеротоксини *Aeromonas*, токсин токсичного шокowego синдрому - 1 (TSST-1), ентеротоксин стафілококовий типу А (SEA), В (SEB) або С (SEC), стрептококові ентеротоксини тощо. Такі бактерії включають, але не обмежуються, штами родів ентеротоксигенних *E.coli* (ETEC), ентерогеморрагічних *E.coli* (напр., штами серотипу O157:H7), стафілококові штами [напр., *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus pyogenes*], штами *Shigella* (напр., *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii* та *Shigella sonnei*), штами *Salmonella* (напр., *Salmonella typhi*, *Salmonella cholerae-suis*, *Salmonella enteritidis*), штами *Clostridium* (напр., *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, *Clostridium botulinum*), штами *Campylobacter* (напр., *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter fetus*), штами *Helicobacter* (напр., *Helicobacter pylori*), штами *Aeromonas* (напр., *Aeromonas sobria*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*), *pleisomonas shigelloides*, *Yersinia enterocolitica*, штами *Vibrios* (напр., *Vibrios cholerae*, *Vibrios parahemolyticus*), штами *Klebsiella*,

Pseudomonas aeruginosa та *Streptococci*. Див., на-
пр., Stein, ed., INTERNAL MEDICINE, 3rd ed., pp 1-
13, Little, Brown and Co., Boston, (1990); Evans et
al., eds., Bacterial Infections of Humans:
Epidemiology and Control, 2d. Ed., pp 239-254,
Plenum Medical Book Co., New York (1991); Mandell
et al, Principles and Practice of Infectious Diseases,
3d. Ed., Churchill Livingstone, New York (1990);
Berkow et al, eds., The Merck Manual, 16th edition,
Merck and Co., Rahway, N.J., 1992; Wood et al,
FEMS Microbiology Immunology, 76:121-134 (1991);
Marrack et al, Science, 248:705-711 (1990), список
посилань котрих повністю відображено тут у поси-
ланнях.

Компоненти, препарати або комбінації анти-
подвійного інтегринового антитіла даного винахо-
ду можуть в подальшому містити принаймні один з
будь-якої відповідної допоміжної речовини, такої
як, але не тільки, розчинник, зв'язувач, стабіліза-
тор, буфери, солі, ліпофільні розчинники, консер-
ванти, ад'юванти тощо. Надається перевага фар-
мацевтично прийнятним допоміжним речовинам.
Деякі з прикладів та методів приготування таких
стерильних розчинів добре відомі науці, такі як,
але не обмежуючись, у [Gennaro, Ed., Remington's
Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, Mack
Publishing Co. (Easton, PA) 1990]. Фармацевтично
прийнятні носії можуть бути рутинно обиратися
серед тих, що відповідають способу введення,
розчинності та/або стабільності анти-подвійного
інтегринового антитіла, фрагмента або варіанта
складу, як це добре відомо в науці або описано
тут.

Фармацевтичні добавки корисні у даному
складі включають, але не обмежуються, протеїни,
пептиди, амінокислоти, ліпіди та карбогідрати (на-
пр., цукри, включаючи моносахариди, ді-, три-,
тетра та олігосахариди; похідні цукрів такі як алди-
толи, алдонієві кислоти, естерифіковані цукри то-
що; і полісахариди або полімери цукрів), які мо-
жуть бути присутніми самостійно чи в комбінації,
що містить одне або в комбінації 1-99,99% за ва-
гою або об'ємом. Типові протеїни включають си-
воротковий альбумін, такі як людський сировотко-
вий альбумін (HSA), рекомбінантний людський
альбумін (rHA), желатин, казеїн тощо. Репрезента-
тивні компоненти амінокислот/антитіла, які також
функціонують в буферних станах, включають ала-
нін, гліцин, аргинін, бетаїн, гістидин, глютамову
кислоту, аспартову кислоту, цистеїн, лізин, лей-
цин, ізолейцин, валін, метіонін, фенілаланін, ас-
партам тощо. Однією з бажаних амінокислот є
гліцин.

Карбогідрати, що підходять до використання в
даному винаході включають, наприклад, моноса-
хариди, такі як фруктоза, мальтоза, галактоза,
глюкоза, D-маноза, сорбоза тощо; дисахариди,
такі як лактоза, сахароза, трегалоза, целобіоза
тощо; полісахариди, такі як рафіноза, мелезитоза,
мальтодекстрини, декстрини, крохмалі тощо; та
альдитоли, такі як маннітол, ксилітол, мальтитол,
лактитол, ксилітол сорбітол (глюцитол), міоїнози-
тол тощо. Бажаними карбогідратами для викорис-
тання в даному винаході є манітол, трегалоза та
рафіноза.

Склади анти-подвійного інтегринового антиті-
ла також можуть включати буфер або pH-
коригуючий агент; зазвичай, буфером є сіль, що
виготовлена з органічної кислоти або луга. Репре-
зентативні буфери включають органічні кислотні
солі, такі як солі лимонної кислоти, аскорбінової
кислоти, глюконієвої кислоти, карбонієвої кислоти,
тартарової кислоти, сукцинової кислоти, ацетової
кислоти або фталієвої кислоти; Tris, трометаміна
гідрохлорид або фосфатні буфери. Бажаними бу-
ферами для використання в даному винаході в
даних складах є солі органічних кислот, такі як
цитрат.

Додатково, склад анти-подвійного інтегрино-
вого антитіла винаходу можуть включати полімер-
ні добавки, такі як полівінілпіролідони, фіколи (по-
лімерний цукор), декстрати (напр.,
циклодекстрини, такі як 2-гідроксипропіл-β-
циклодекстрин), поліетилен гліколі, ароматичні
засоби, антимікробні засоби, посолоджувачі, анти-
оксиданти, антистатичні засоби, сурфактанти (на-
пр., полісорбати, такі як "TWEEN 20" та "TWEEN
80"), ліпіди (напр., фосфоліпіди, жирні кислоти),
стероїди (напр., холестерин) та хелатні засоби
(напр., ЕДТА).

Ці та інші фармацевтичні добавки, що підхо-
дять до використання в складах анти-подвійного
інтегринового антитіла, частинах або варіантах,
згідно з винаходом є відомими в науці, напр., як це
наводиться у "Remington: The Science & Practice of
Pharmacy", 19th ed., Williams & Williams, (1995) та у
"Physician's Desk Reference", 52nd ed., Medical
Economics, Montvale, NJ (1998), що повністю вмі-
щені тут у посиланнях. Бажаними носіями є кар-
богідрати (напр., сахариди та альдитоли) та буфе-
ри (напр., цитрат) або полімерні засоби.

Склад

Як зазначалося вище, винахід описує стабільні
склади, які переважно містять фосфатний буфер з
фізіологічним розчином або обраною сіллю, а та-
кож консервуючі розчини та складі, що містять
консервант, а також консервуючі складі багатора-
зового використання для фармацевтичного чи
ветеринарного використання, що містять принай-
мні одне анти-подвійне інтегринове антитіло або
додатково обрані речовини з групи, що складаєть-
ся з одного фенола, m-крезола, p-крезола, о-
крезола, хлорокрезола, бензил алкоголю, нітрату
фенілртуті, феноксиетанола, формальдегіда, хло-
робутанола, магнія хлорида (напр., гексагідрат),
алкілпарабена (метил, етил, пропіл, бутіл тощо),
бензалконія хлорида, бензетоніума хлорида, на-
трія дегідроацетата та тримеросала або їх суміші у
водному розчиннику. Може використовуватися
будь-яка відповідна концентрація або суміш, як це
відомо в науці, такі як 0,001-5%, або будь-який
діапазон чи значення у вказаних межах, такі які,
але не обмежуючись, 0,001, 0,003, 0,005, 0,009,
0,01, 0,02, 0,03, 0,05, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6,
0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8,
1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0,
3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,3, 4,5,
4,6, 4,7, 4,8, 4,9, або будь-які діапазони або зна-
чення у вказаних межах. Деякі приклади включа-
ють, без консервантів, 0,1-2% m-крезол (напр., 0,2,
0,3, 0,4, 0,5, 0,9, 1,0%), 0,1-3% бензил алкоголь

(напр., 0,5, 0,9, 1,1, 1,5, 1,9, 2,0, 2,5%), 0,001-0,5% тимеросал (напр., 0,005, 0,01), 0,001-2,0% фенол (напр., 0,05, 0,25, 0,28, 0,5, 0,9, 1,0%), 0,0005-1,0% алкілпарабен(и) (напр., 0,00075, 0,0009, 0,001, 0,002, 0,005, 0,0075, 0,009, 0,01, 0,02, 0,05, 0,075, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,5, 0,75, 0,9, 1,0%) тощо.

Як вказувалося вище, винахід описує предмети виробництва, що містять пакувальні матеріали та принаймні одну ампулу, що містить розчин принаймні одного анти-подвійного інтегринового антитіла з відповідним буфером та/або консервантами, додатково у водному розчиннику, де вказаний пакувальний матеріал містить позначку, що вказує, що такий розчин може зберігатися протягом періоду 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12, 18, 20, 24, 30, 36, 40, 48, 54, 60, 66, 72 і більше годин. Даний винахід окрім того містить предмети виробництва, що містять пакувальні матеріали, першу ампулу, яка містить принаймні одне ліофілізоване анти-подвійне інтегринове антитіло та другу ампулу, що містить водний розчинник відповідного буфера або консерванта, де вказаний пакувальний матеріал містить позначку, яка інструктує пацієнта розчинити принаймні одне анти-подвійне інтегринове антитіло у водному розчиннику для утворення розчину, що може зберігатися протягом періоду 24 годин або більше.

Принаймні одне анти-подвійне інтегринове антитіло використовуване згідно з даним винаходом може вироблятися за допомогою рекомбінантних заходів, включаючи клітини ссавців та трансгенні препарати, або можуть бути очищені з інших біологічних джерел, як це описано тут або відомо в науці.

Діапазон принаймні одного анти-подвійного інтегринового антитіла в продукті даного винаходу включає кількості, що утворюються при розведенні, якщо в вологій/сухій системі, концентрації від приблизно 1,0μг/мл до приблизно 1000мг/мл, хоча нижчі чи вищі концентрації також використовуються і залежать від способу планованого введення, напр., склади розчинів відрізнятимуться від трансдермальних пластрів, легенвих, трансслизових або осмотичних чи мікропомпових методів.

Бажано, щоб водні розчинники додатково містили фармацевтично прийнятні консерванти. Бажані консерванти включають ті, що обираються з групи, яка складається з фенола, m-крезола, p-крезола, o-крезола, хлорокрезола, бензил алкоголя, алкілпарабена (метил, етил, пропіл, бутіл тощо), бензалконіума хлорида, бензетоніума хлорида, натрія дегідроацетата і тимезорала або їхніх сумішей. Концентрація консерванта, що використовується в даному складі є такою, яка достатня для антимікробного ефекта. Такі концентрації залежать від обраного консерванта та добре визначаються підготовленими фахівцями.

Інші добавки, напр., ізотонічні засоби, буфери, антиоксиданти, покращуючі консерванти, можуть додатково і бажано додаватися у розчинник. Ізотонічний засіб, такий як гліцерин, часто використовуються у відомих концентраціях. Бажано додавати фізіологічно толерований буфер для забезпечення поліпшеного контролю рН. Склади можуть покривати широкий спектр рН, такий як від рН 4 до приблизно рН 10, а бажаний діапазон ста-

новить від приблизно рН 5 до приблизно рН 9, а найбільш бажаний діапазон становить від приблизно рН 6,8 до приблизно 7,8. Бажані буфери включають фосфатні буфери, найбажаніше натрія фосфат, зокрема фосфатний буферний фізіологічний розчин (PBS).

Інші добавки, такі як фармацевтично прийнятні розчинники по типу Tween 20 (поліоксиетилен (20) сорбітан монолаурат), Tween 40 (поліоксиетилен (20) сорбітан монопальмітат), Tween 80 (поліоксиетилен поліоксипропілен блокovanі кополімери) та PEG (поліетилен гліколь) або неіонні сурфактанти, такі як полісорбат 20 або 80 або поллоксамер 184 чи 188, полілілі Pluronic®, інші блокovanі кополімери та хелатори, такі як EDTA та EGTA можуть додатково додаватися до складів для зменшення агрегації. Ці добавки зокрема корисні, якщо для введення засобу використовується помпа або пластиковий контейнер. Наявність фармацевтично прийнятного сурфактанта зменшує схильність протеїнів до агрегації.

Препарати даного винаходу можуть бути приготовлені за допомогою процесу, який містить принаймні одне анти-подвійне інтегринове антитіло та консервант обраний з групи, яка складається з фенола, m-крезола, p-крезола, o-крезола, хлорокрезола, бензил алкоголя, алкілпарабена (метил, етил, пропіл, бутіл тощо), бензалконіума хлорида, бензетоніума хлорида, натрія дегідроацетата і тимезорала або їхніх сумішей у водному розчиннику. Змішування принаймні одного анти-подвійного інтегринового антитіла та консерванта у водному розчиннику виконується з використанням стандартних процедур розчинення та змішування. Для приготування відповідного препарату, наприклад, відміряна кількість принаймні одного анти-подвійного інтегринового антитіла в буферному розчині комбінується з бажаним консервантом в кількості, що достатня для забезпечення бажаних концентрацій протеїна та консерванта. Варіації цього процесу можуть визначатися тим, хто є фахівцем у цій галузі. Наприклад, порядок додавання компонентів, чи додатуються додаткові засоби, температура та рН при яких готується препарат, всі ці фактори можуть бути оптимізовані по використуванню концентрації та засобам введення.

Заявлені препарати можуть надаватися пацієнтам у вигляді чистих розчинів або в якості двох ампул, що містять ампулу ліофілізованого принаймні одного анти-подвійного інтегринового антитіла, яке розчиняється в другій ампулі, що містить воду, консервант та/або добавки, бажано фосфатний буфер та/або фізіологічний розчин і обрану сіль, у водному розчиннику. Як одна ампула з розчином, так і дві ампули, що потребують розчинення, можуть використовуватися багато разів та можуть бути достатнім для одноразового чи багаторазового циклів лікування пацієнта та, отже, можуть забезпечити зручніший режим лікування, ніж натеper доступні.

Дані заявлені предмети виробництва є корисними для призначення протягом періоду від негайного до 24-годинного або більше. Відповідно, дані заявлені предмети виробництва надають значні переваги пацієнтам. Препарати винаходу можуть

додатково безпечно зберігатися при температурах від приблизно 2 до приблизно 40°C та утримувати біологічну дію протеїна на тривалі періоди часу, отже, дозволяють вказувати на пакувальних показниках, що розчин може зберігатися та/або використовуватися протягом періоду 6, 12, 18, 24, 36, 48, 72 або 96 годин чи більше. Якщо використано консервуючий розчинник, такі позначки можуть включати використання до 1-12 місяців, половини, півтора та/або двох років.

Розчини принаймні одного анти-подвійного інтегринового антитіла в винаході можуть бути приготувані за допомогою процесу, що містить змішування принаймні одного антитіла у водному розчиннику. Змішування здійснюється з використанням традиційних процедур розчинення та змішування. Для приготування належного розчинника, наприклад, вимірювана кількість принаймні одного антитіла у воді або буфері комбінується в кількостях, що достатні для забезпечення бажаних концентрацій протеїна та додатково консерванта або буфера. Варіації цього процесу можуть визначатися тим, хто є фахівцем у цій галузі. Наприклад, порядок додавання компонентів, чи додаються додаткові засоби, температура та pH при яких готується препарат, всі ці фактори можуть бути оптимізовані по використуванню концентрації та засобам введення.

Заявлені препарати можуть надаватися пацієнтам у вигляді чистих розчинів або в якості двох ампул, що містять ампулу ліофілізованого принаймні одного анти-подвійного інтегринового антитіла, яке розчиняється в другій ампулі, що містить воду, консервант та/або добавки, бажано фосфатний буфер та/або фізіологічний розчин і обрану сіль, у водному розчиннику. Як одна ампула з розчином, так і дві ампули, що потребують розчинення, можуть використовуватися багато разів та можуть бути достатніми для одноразового чи багаторазового циклів лікування пацієнта та, отже, можуть забезпечити зручніший режим лікування, ніж натеper доступні.

Заявлені продукти можуть бути надані пацієнтам безпосередньо через забезпечення аптек, клінік або інших таких інституцій та закладів чистими розчинами або подвійними ампулами, що складаються з ампули з ліофілізованого принаймні одного анти-подвійного інтегринового антитіла, яке розчиняється за допомогою другої ампули, що містить водний розчин. Чистий розчин у даному випадку може бути розміром до одного літра або навіть більше, що забезпечує великий резервуар з якого можуть одноразово чи багаторазово відбиратися менші частини розчину принаймні одного антитіла для перенесення у менші ампули та забезпечення аптек чи клінік для їхніх покупців та/або пацієнтів.

Визнані пристрої, що містять ці одноампульні системи включають такі ручко-інжекторні пристрої для введення розчину, як BD Pens, BD Autojector®, Humaject®, NovoPen®, B-D®Pen, AutoPen® та OptiPen®, GenotropinPen®, Genotonom Pen®, Humatro Pen®, Reco-Pen®, Roferon Pen®, Biojector®, iject®, J-tip Needle-Free Injector®, Intraject®, Medi-Ject®, напр. такі як розроблені або створені Becton Dickenson [Franklin Lakes, NJ,

www.bectondickenson.com], Disetronic [Burgdorf, Швейцарія, www.disetronic.com; Bioject, Портленд, Орегон (www.bioject.com)]; National Medical Products, Weston Medical [Пітерборо, UK, www.weston-medical.com]. Medic-Ject Corp [Міннеаполіс, MN, www.mediject.com]. Визнані пристрої, що містять подвійно-ампульну систему включають такі ручко-інжекторні системи для розведення ліофілізованого препарату в картриджі для введення розведеного розчину, як HumatroPen®.

Продукти, що заявляються, включають пакувальний матеріал. Пакувальний матеріал надає, на додаток до інформації, яка вимагається регуляторними органами, умови за яких продукт має використовуватися. Пакувальний матеріал даного винаходу надає інструкції пацієнту по розведенню принаймні одного анти-подвійного інтегринового антитіла у водному розчиннику для утворення розчину та використання розчину протягом періоду 2-24 годин та більше для двох ампул, волога/суха, продукта. Для однієї ампули, розчинений продукт, показчик вказує, що такий розчин може використовуватися протягом періоду 2-24 години або більше. Даний продукт, що заявляється, є корисним для використання в якості людського фармацевтичного продукту.

Препарати даного винаходу можуть бути приготувані за допомогою процесу, що містить принаймні одне анти-подвійне інтегринове антитіло та обраний буфер, бажано фосфатний буфер, який містить фізіологічний розчин або обрану сіль. Змішування принаймні одного антитіла та буфера у водному розчиннику здійснюється з використанням традиційних процедур розчинення та змішування. Для приготування належного розчинника, наприклад, вимірювана кількість принаймні одного антитіла у воді або буфері комбінується в кількостях, що достатні для забезпечення бажаних концентрацій протеїна та додатково консерванта або буфера. Варіації цього процесу можуть визначатися тим, хто є фахівцем у цій галузі. Наприклад, порядок додавання компонентів, чи додаються додаткові засоби, температура та pH при яких готується препарат, всі ці фактори можуть бути оптимізовані по використуванню концентрації та засобам введення.

Заявлені стабільні або законсервовані препарати можуть надаватися пацієнтам в якості чистих розчинів або в якості подвійних ампул, що містять ампулу ліофілізованого принаймні одного анти-подвійного інтегринового антитіла, яке розводиться другою ампулою, що містить консервант або буфер та добавки у водному розчиннику. Як одна ампула з розчином, так і дві ампули, що потребують розчинення, можуть використовуватися багато разів та можуть бути достатніми для одноразового чи багаторазового циклів лікування пацієнта та, отже, можуть забезпечити зручніший режим лікування, ніж натеper доступні.

Принаймні одне анти-подвійне інтегринове антитіло як в стабільних, так і у законсервованих препаратах або розчинах, що описані тут, можуть бути призначені пацієнтові згідно з даними винаходом за допомогою різноманітних методів введення таких як підшкірні або внутрішньом'язові ін'єкції; траньдермальні, легеневі, трансмукозаль-

ні, імплантовані, осмотичні помпи, картриджі, мікропомпи або інші засоби, що оцінені кваліфікованими фахівцями, як це добре відомо науці.

Терапевтичне застосування

Даний винахід також надає метод модуляції або лікування принаймні одного захворювання залежного від подвійного інтегрину в клітинах, тканинах, органах, тваринах або пацієнтах, як це відомо в науці або описано тут, з використанням одного подвійного інтегринового антитіла даного виходу.

Даний винахід також надає метод модуляції або лікування принаймні одного захворювання залежного від подвійного інтегрину в клітинах, тканинах, органах, тваринах або пацієнтах включаючи, але не обмежуючись, принаймні одне з такого - ожиріння, імунно-залежні захворювання, серцево-судинні захворювання, інфекційні захворювання або неврологічні захворювання.

Даний винахід також надає метод модуляції або лікування принаймні одного захворювання залежного від подвійного інтегрину в клітинах, тканинах, органах, тваринах або пацієнтах включаючи, але не обмежуючись, принаймні одне з такого - ревматоїдний артрит, ювенільний ревматоїдний артрит, системний початок, псоріатичний артрит, анкілозуючий спондиліт, виразка шлунка, серонегативні артропатії, остеоартрит, запальні захворювання кишечника, виразковий коліт, системний червоний вовчак, антифосфоліпідний синдром, іридоцикліт/uveїт/неврит зорового нерву, ідіопатичний легеневий фіброз, системний васкуліт/гранулематоз Вегенера, саркоїдоз, орхіт/процедури зворотньої вазектомії, алергічні/атопічні захворювання, астма, алергічні риніти, екзема, алергічний контактний дерматит, алергічний кон'юнктивіт, гіперчутливий пневмоніт, трансплантанти, відторгнення трансплантованого органу, захворювання по типу шунт-проти-господаря, синдром системної запальної відповіді, септичний синдром, грам-позитивний сепсис, грам-негативний сепсис, культуронегативний сепсис, грибковий сепсис, нейтропенічна лихоманка, уросепсис, менінгококемія, травма/кровотеча, опіки, опромінення іонізуючою радіацією, гострий панкреатит, гострий респіраторний дистрес-синдром у дорослих, ревматоїдний артрит, алкоголь-індукований гепатит, хронічні запальні процеси, саркоїдоз, хвороба Крона, серповидно-клітинна анемія, діабет, нефрози, атопічні захворювання, реакції гіперчутливості, алергічний риніт, сінна лихоманка, переніальний риніт, кон'юнктивіт, ендометріоз, астма, кропивниця, системна анафілаксія, дерматит, перніциозна анемія, гемолітичні захворювання, тромбоцитопенія, відторгнення трансплантата або будь-якого органа чи тканини, реакції відторгнення трансплантованих нирок, реакція відторгнення трансплантованого серця, реакція відторгнення трансплантованої печінки, реакція відторгнення трансплантованої підшлункової залози, реакція відторгнення трансплантованих легень, реакція відторгнення трансплантованого кісткового мозку (BMT), відторгнення шкірного трансплантата, відторгнення хрящового трансплантата, відторгнення кісткового

тонкого кишечника, відторгнення імплантованого тимуса плода, відторгнення паратиреоїдного трансплантата, відторгнення ксенотрансплантата будь-якого органа або тканини, відторгнення алотрансплантата, реакції антирецепторної гіперчутливості, хвороба Грейвса, хвороба Рейно, інсуліно-резистентний діабет типу В, астма, *myasthenia gravis*, антитіло-опосередкована цитотоксичність, реакції гіперчутливості типу III, системний червоний вовчак, синдром POEMS (полінейропатія, органоменгальна, ендокринопатія, моноклональна гамопатія та синдром змін шкіри), полінейропатія, органоменгальна, ендокринопатія, моноклональна гамопатія, змішане захворювання сполучної тканини, ідіопатична хвороба Аддісона, цукровий діабет, хронічний активний гепатит, первинний біліарний цирроз, вітіліго, васкуліт, синдром постінфарктної кардіотомії, гіперчутливість типу IV, контактний дерматит, пневмоніт гіперчутливості, відторгнення алотрансплантату, гранульома внаслідок внутріклітинних організмів, медикаментозна чутливість, метаболічна/ідіопатична, хвороба Вільсона, гемохроматоз, дефіцит альфа-1-антитрипсина, діабетична ретинопатія, тиреоїдит Гашимото, остеопороз, дослідження гіпоталамо-гіпофізо-аренальної осі, первинний біліарний цирроз, тиреоїдит, енцефаломієліт, кахексія, кістозний фіброз, хронічні легеневі захворювання новонароджених, хронічні обструктивні захворювання легень (ХОЗЛ), сімейний гепатофагоцитарний лімфогістіоцитоз, дерматологічні стани, псоріаз, алопеція, нефротичний синдром, нефрит, гломерулярний нефрит, гостра ниркова недостатність, гемодіаліз, уремія, токсичність, преєкамписія, окт3 терапія, анти-ccc3 терапія, лікування цитокинами, хіміотерапія, радіаційна терапія (напр., включаючи, але не обмежуючись, тоастенія, анемія, кахексія тощо), хронічна інтоксикація саліцилатами тощо. Див., напр., Merck Manual, 12th-17th Editions, Merck & Company, Rahway, NJ (1972, 1977, 1982, 1987, 1992, 1999), *Pharmacotherapy Handbook*, Wells et al., eds., Second Edition, Appleton and Lange, Stamford, Conn. (1998, 2000), кожний з яких повністю включений тут у посиланнях.

Даний винахід також надає метод модуляції або лікування принаймні одного серцево-судинного захворювання в клітинах, тканинах, органах, тваринах або пацієнтах включаючи, але не обмежуючись, принаймні одне з такого - синдром кардіального оглушення, інфаркт міокарда, застійна серцева недостатність, інсульт, ішемічний інсульт, кровотеча, артеріосклероз, атеросклероз, рестеноз, діабетичне атеросклеротичне захворювання, гіпертензія, артеріальна гіпертензія, реноваскулярна гіпертензія, синкопе, шок, сифіліс серцево-судинної системи, серцева недостатність, легеневе серце, первинна легенева гіпертензія, аритмії серця, передсердні ектопічні скорочення, тріпотіння передсердь, фібриляція передсердь (стійка або пароксизмальна), постперфузійний синдром, запальна відповідь на серцево-легеневе шунтування, хаотична або мультифокальна передсердна тахікардія, звичайна тахікардія з вузькими комплексами QRS, певні аритмії, фібриляція шлуночків, аритмії з пучка Гіса, атріовентрикулярна блокада, блокада ніжок пучка Гіса, ішемічні міо-

кардіальні порушення, ішемічна хвороба серця, стабільна стенокардія, інфаркт міокарда, кардіоміопатія, дилатаційна застійна кардіоміопатія, рестриктивна кардіоміопатія, клапанні захворювання серця, ендокардит, захворювання перикарда, пухлини серця, аортальні та периферичні аневризми, розшарування аорти, запалення аорти, оклюзія абдомінальної аорти та її гілок, периферичні судинні розлади, оклюзивні артеріальні розлади, атеросклеротичне захворювання периферичних судин, облітеруючий тромбоемболіт, функціональні розлади периферичних артерій, феномен і захворювання Рейно, акроціаноз, еритромегалія, венозні захворювання, венозний тромбоз, варикозні вени, артеріо-венозна фістула, лімфодерма, ліпедема, нестабільна стенокардія, реперфузійне пошкодження, пост-насосний синдром, ішемічно-реперфузійне пошкодження тощо. Такий метод може додатково містити введення ефективного кількості складу або фармацевтичного препарату, що містить принаймні одне анти-подвійне інтегринове антитіло, в клітину, тканину, орган, тварину або пацієнта при потребі такої модуляції або лікування.

Даний винахід також надає метод модуляції або лікування принаймні одного інфекційного захворювання в клітинах, тканинах, органах, тваринах або пацієнтах включаючи, але не обмежуючись, принаймні одне з такого - гостра або хронічна бактеріальна інфекція, гострі та хронічні паразитарні або інфекційні процеси, включаючи бактеріальні, вірусні та грибові інфекції, ВІЛ інфекція/ВІЛ нейропатія, менінгіт, гепатит (А, В або С тощо), септичний артрит, перитоніт, пневмонія, епіглотит, *e. coli* 0157:h7, гемолітичний уремичний синдром/тромболоїтична тромбоцитопенічна пурпура, малярія, геморагічна тропічна лихоманка, лейшманіоз, лепра, токсичний шоківий синдром, стрептококовий міозит, газова гангрена, мікобактеріальний туберкульоз, внутрішньоклітинна *mycobacterium avium*, пневмонія *pneumocystis carinii*, запальне захворювання тазових органів, орхіт/епідідиміт, легіонела, хвороба Лайма, грип типу А, вірус Епштейна-Барр, гемафагоцитарний синдром сумісний з життям, енцефаліт/асептичний менінгіт тощо.

Даний винахід також надає метод модуляції або лікування принаймні одного злоякісного захворювання в клітинах, тканинах, органах, тваринах або пацієнтах включаючи, але не обмежуючись, принаймні одне з такого - лейкоз, гостра лейкоз, гостра лімфобластна лейкоз (ALL), В-клітинна, Т-клітинна або FAB ALL, гостра мієлоїдна лейкоз (AML), хронічна мієлоцитарна лейкоз (CML), хронічна лімфоцитарна лейкоз (CLL), волосато-клітинна лейкоз, мієлодиспластичний синдром (MDS), лімфома, хвороба Годжкіна, злоякісна лімфома, не-годжкінська лімфома, лімфома Боркіта, множинна мієлома, саркома Капоші, колоректальна карцинома, панкреатична карцинома, назофарингеальна карцинома, злоякісний гістiocитоз, паранеопластичний синдром/гіперкальцемія злоякісності, безпорожнинні пухлини, аденокарциноми, саркоми, злоякісна меланома, гемангіома, метастатична хвороба, рако-залежна резорпція кісток, рако-залежний біль у кістках тощо.

Даний винахід також надає метод модуляції або лікування принаймні одного злоякісного захворювання в клітинах, тканинах, органах, тваринах або пацієнтах включаючи, але не обмежуючись, принаймні одне з такого - нейродегенеративні захворювання, множинний склероз, мігренозний головний біль, комплекс СНІД деменція, демієлізуючі захворювання, такі як множинний склероз та гострий поперечний мієліт; екстрапірамідні та мозочкові захворювання, такі як пошкодження кортикоспінальної системи; розлади базальних гангліїв або мозочкові порушення; гіперкінетичні рухові порушення, такі як хорея Гантінгтона та сенільна хорея; медикаментозно-індуковані рухові порушення, такі як ті, що індуковані препаратами, котрі блокують допамінові рецептори ЦНС; гіпокінетичні рухові розлади, такі як хвороба Паркінсона; прогресуючий супраядерний параліч; структурні розлади мозочка; спіномозочкові дегенерації, такі як спінальна атаксія, атаксія Фрідрайха, мозочкова кортикальна дегенерація, множинні системні дегенерації [Mencel, Dejerine-Thomas, Shi-Drager та Machado-Joseph]; системні розлади (хвороба Рефсама, абеталіпопротеїнемія, атаксія, телангіектазія та мітохондріальний багатосистемний розлад); демієлізуючі ядерні розлади, такі як множинний склероз, гострий поперечний мієліт; та розлади моторних складових, такі як нейрогенна м'язова атрофія (дегенерація клітин переднього рогу, така як аміотрофічний боковий склероз, спінальна м'язова атрофія немовлят та ювенільна спінальна м'язова атрофія); хвороба Альцгеймера; синдром Дауна у середньому віці; дифузне захворювання Леві; сенільна деменція типу Леві; синдром Верніке-Корсакоффа; хронічний алкоголізм; хвороба Кройтцфельда-Якоба; підгострий склерозуючий паненцефаліт, хвороба Hallerorden-Spatz; і dementia pugilistica тощо. Такий метод може додатково включати введення ефективного кількості складу або фармацевтичного препарату, що містить принаймні одне антитіло до TNF або певної його частини чи варіанта, в клітину, тканину, орган, тварину або пацієнта при потребі такої модуляції або лікування. Див., напр., Merck Manual, 16th Edition, Merck & Company, Rahway, NJ (1992).

Будь-який метод даного винаходу може включати введення ефективного кількості складу або фармацевтичного препарату, що містить принаймні одне анти-подвійне інтегринове антитіло, в клітину, тканину, орган, тварину або пацієнта при потребі такої модуляції або лікування. Такий метод може додатково включати супутнє призначення або комбіновану терапію для лікування таких імунних захворювань, де призначення вищезазначеного принаймні одного анти-подвійного інтегринового антитіла, певної його частини чи варіанта, окрім того містить введення до, одночасно та/або після принаймні одного засобу з принаймні одного антагоніста TNF (напр., але не обмежуючись, антитіло або фрагмент до TNF, розчинний рецептор або фрагмент до TNF, їхні зливі протести або мала молекула антагоніста TNF), антиревматичного засобу (напр., метотрексат, ауранофін, ауротіоглюкоза, азатіоприн, етанерсепт, тіомалат натрія золота, гідроксихлорохіна сульфат, лефлуномід,

сульфасалазин), м'язового релаксанта, наркотичного препарату, нестероїдного протизапального препарату (НПЗП), анальгетичного препарату, анестетичного препарату, седативного препарату, місцевого анестетика, нервово-м'язового блокатора, антимікробного засобу (напр., аміноглікозид, антигрибковий препарат, антипаразитарний препарат, антивірусний препарат, карбапенем, цефалоспорин, фторхінолон, макролід, пеніцилін, сульфонамід, тетрациклін, інший антимікробний препарат), антипсоріатичного засобу, кортикостероїда, анаболічного стероїда, діабетологічного препарату, мінерала, харчового додатку, тиреоїдного препарату, вітаміна, кальцій-залежного гормону, антидіарейного засобу, проти кашльового препарату, антиеметика, противиразкового препарату, послаблюючого, антикоагулянта, еритропоетина (напр., епоетин альфа), філграстима (напр., G-CSF, Нейподжен), сарграмостиму (напр., GM-CSF, Лейкін), імунізації, імуносупресивного засобу (напр., базиліксимаб, циклоспорин, даклізумаб), гормону роста, гормону-замісної терапії, модулятора естрогенових рецепторів, мудріатичних, циклоплегічних, алкілюючих засобів, антиметаболітиків, інгібіторів мітозу, радіоізотопних засобів, антидепресантів, антиманічних препаратів, антипсихотиків, анксиолітиків, снодійних, симпатоміметиків, стимуляторів, донезепілу, такрину, астматичних препаратів, бета-агоністів, інгаляційних стероїдів, інгібіторів лейкоцитів, метилксантину, кромоліну, адреналіну або аналогу, дорнази альфа (Пульмозим), цитокіна або цитокинового антагоніста або антитіла. Відповідні дози добре відомі в науці. Див., напр., [Wells et al., eds., *Pharmacotherapy Handbook*, 2nd Edition, Appleton and Lange, Stamford, CT (2000); *PDR Pharmacopoeia*, Tarascon Pocket Pharmacopoeia 2000, Deluxe Edition, Tarascon Publishing, Loma Linda, CA (2000), посилання з кожної з цих робіт повністю включені тут у посиланнях.

Антагоністи TNF, що підходять для препаратів, комбінованого лікування, супутнього призначення, пристроїв та/або методів даного винаходу (що містять принаймні одне антитіло даного винаходу, певну його частину або варіант), включають, але не обмежуються, анти-TNF антитіла, їхні антиген-зв'язуючі фрагменти і рецепторні молекули, які специфічно зв'язуються з TNF; компоненти, які перешкоджають та/або пригнічують синтез TNF, вивільнення TNF або його дію на цільові клітини, такі як талідомід, тенідап, інгібітори фосфодіестерази (напр., пентоксифілін та роліпрам), агоністи аденозинового рецептора A2b та посилювачі аденозинового рецептора A2b; компоненти, які попереджають та/або пригнічують сигнальну систему рецептора до TNF, такі як інгібітори кінази мітоген активованого протеїна (MAP); компоненти, що блокують та/або пригнічують активність TNF, такі як інгібітори ангіотензину-перетворюючого ферменту (АПФ) (напр., каптоприл); та компоненти, що блокують та/або пригнічують продукцію та/або синтез TNF, такі як інгібітори MAP кінази.

"Антитіло до фактору некрозу пухлини", "антитіло до TNF", "антитіло до TNF α " або фрагменти тощо, як тут використовується, зменшують, блокують, пригнічують, припиняють або перешкоджа-

ють діяльності TNF α *in vitro*, *in situ* та/або бажано *in vivo*. Наприклад, відповідне людське антитіло до TNF даного винаходу може зв'язувати TNF α та включає анти-TNF антитіла, їхні антиген-зв'язуючі фрагменти та певні їхні мутанти або домени, що специфічно зв'язуються з TNF α . Належне антитіло або фрагмент до TNF може також зменшити, блокувати, припиняти, перешкоджати та/або пригнічувати синтез РНК, ДНК або протеїну TNF, вивільнення TNF, сигнальну систему рецептора до TNF, мембранне розщеплення TNF, діяльність TNF, продукцію та/або синтез TNF.

Химеричне антитіло cA2 містить антиген-зв'язуючий варіабельний регіон високо-афінного нейтралізуючого мишиного антилюдського антитіла IgG1 до TNF α , позначений A2, та постійні регіони людського IgG1, каппа імунноглобулін. Fc регіон людського IgG1 покращує аллогенну ефекторну функцію антитіла, підвищує час пів-життя циркуляції у сировотці та зменшує імуногенність антитіла. Спорідненість та епітопна специфічність химеричного антитіла cA2 походить з варіабельного регіону мишиного антитіла A2. В окремому впровадженні, бажаним джерелом нуклеїнових кислот, що кодують варіабельний регіон мишиного антитіла A2, є клітинна лінія гібридами A2.

Химеричне A2 (cA2) нейтралізує цитотоксичний ефект як природного, так і рекомбінантного людського TNF α у дозо-залежний спосіб. З аналізу зв'язування химеричного антитіла cA2 та рекомбінантного людського TNF α , константа афінності химеричного антитіла cA2 була визначена як $1,04 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$. Бажані методи для визначення специфічності та афінності моноклонального антитіла за допомогою конкурентного пригнічення можуть бути знайдені в Harlow, et al, *antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1988; Colligan et al, eds., *Current Protocols in Immunology*, Greene Publishing Assoc. And Wiley Interscience, New York, (1992-2000); Kozbor et al, *Immunol. Today*, 4:12-19 (1983); Ausubel et al, eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience, New York (1987-2000); та Muller, *Meth. Enzymol*, 92:589-601 (1983), посилання котрих повністю включені тут у посиланнях.

В окремому впровадженні, мишине моноклональне антитіло A2 виробляється клітинною лінією, що позначається C134A. Химеричне антитіло cA2 виробляється клітинною лінією, що позначається c168A.

Додаткові приклади моноклональних анти-TNF антитіл, що можуть бути використані в даному винаході, описані в науці [див., напр., патент США № 5,231,024; Möller, A. Et al, *Cytokine* 2(3):162-169 (1990); заявка США № 07/943,852 (zareєстровано 11 вересня 1992); Rathjen et al, міжнародна публікація № WO91/02078 (опубліковано 21 лютого 1991); Rubin et al, патентна публікація EPO №0218 868 (опубліковано 22 квітня 1987); Yone et al, патентна публікація EPO № 0 288 088 (26 жовтня 1988); Liang, et al, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 757:847-854 (1986); Meager, et al, *Hybridoma* 6:305-311 (1987); Fendly et al, *Hybridoma* 6:359-369 (1987); Bringman, et al, *Hybridoma* 6:489-507 (1987); та Hirai, et al, *J. Immunol. Meth.* 96:51-62 (1987),

посилання на котрі повністю включені тут у посиланнях].

Молекули рецептора до TNF

Бажані молекули рецептора до TNF корисні в даному винаході є тими, що зв'язують $\text{TNF}\alpha$ з високою афіністю [див., напр., Feldmann et al, міжнародна публікація № WO 92/07076 (опубліковано 30 квітня 1992); Schall et al, Cell 61:361-310 (1990); та Loetscher et al, Cell 67:351-359 (1990), посилання на котрі повністю включені тут у посиланнях] та додатково мають низьку імуногенність. Зокрема, 55 кДа (p55 TNF-R) та 75 кДа (p75 TNF-R) рецептори до TNF на поверхні клітин є корисними в даному винаході. Обмежені форми цих рецепторів, що містять екстрацелюлярні домени (ECD) рецепторів або їхніх функціональних частин [див., напр., Corcoran et al, Eur. J. Biochem. 225:831-840 (1994)] є також корисними в даному винаході. Обмежені форми рецепторів до TNF, що містять ECD, були виявлені у сечі та сировотці, в якості 30кДа та 40кДа інгібіторно-зв'язуючих протеїнів до $\text{TNF}\alpha$ [Engelmann, H. et al, J. Biol. Chem. 265:1531-1536 (1990)]. Мультимеричні молекули рецептора до TNF та зливні молекули імунорецептора до TNF та їхні похідні і частини є додатковими прикладами молекул рецептора до TNF, які є корисними в методах та препаратах даного винаходу. Молекули рецептора до TNF, які можуть бути використані у винаході характеризовані по їхній здатності лікувати пацієнтів протягом подовженого періода часу з добрим або прекрасним послабленням симптоматики і низькою токсичністю. Низька імуногенність та/або висока афіність, а також інші невизначені властивості, можуть робити внесок до досягнутих терапевтичних результатів.

Мультимеричні молекули рецептора до TNF корисні в даному винаході містять весь або функціональну частину ECD двох або більше рецепторів до TNF пов'язані через один або більше поліпептидний поєднувач або інші непептидні поєднувачі, такі як поліетилен гліколь (PEG). Мультимеричні молекули можуть окрім того містити сиганльний пептид секретованого протеїна для спрямування експресії мультивимірної молекули. Ці мультивимірні молекули та методи їхнього виготовлення були описані у Заявці США № 08/437,533 (zareєстровано 9 травня 1995), зміст якої повністю включений тут у посиланнях.

Зливні молекули імунорецептора до TNF, що є корисними в методах та складах даного винаходу, містять принаймні одну частину однієї або більше імунноглобулінових молекул та всіх або функціональної частини одного або більше рецептора до TNF. Ці зливні молекули імунорецепторів можуть бути мономерами або гетеро- чи гомомультивалентними. Зливні молекули імунорецепторів можуть також бути моновалентними або мультивалентними. Прикладом такої зливної молекули імунорецептора до TNF є рецептор до TNF/зливний протеїн IgG. Зливні молекули імунорецептора до TNF та методи їхнього виробництва були описані в науці [Lesslauer et al, Eur. J. Immunol. 27:2883-2886 (1991); Askenazi et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 55:10535-10539 (1991); Peppel et al, J. Exp. Med. 774:1483-1489 (1991); Kolls et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:215-219 (1994); Butler

et al, Cytokine 6(6):616-623 (1994); Baker et al, Eur. J. Immunol. 24:2040-2048 (1994); Beutler et al, патент США № 5,447,851; та Заявка США № 08/442,133 (zareєстровано 16 травня 1995), посилання на кожне з яких повністю включено тут у посиланнях]. Методи виробництва зливних молекул імунорецептора можуть бути також знайдені у Caron et al, Nature 537:525-531 (1989), посилання на котре повністю включено тут у посиланнях.

Функціональний еквівалент, похідне, фрагмент або регіон молекули рецептора до TNF відноситься до частини молекули рецептора до TNF або частини молекулярної послідовності рецептора до TNF, що кодує молекулу рецептора до TNF, що є достатньої величини та послідовності для відтворення молекул рецептора до TNF, які можуть бути використані в даному винаході (напр., зв'язують $\text{TNF}\alpha$ з високою афіністю та при низькій імуногенності). Функціональний еквівалент молекули рецептора до TNF також включає модифіковані молекули рецептора до TNF, що функціонально схожі на молекули рецептора до TNF, які можуть бути використані в даному винаході (напр., зв'язують $\text{TNF}\alpha$ з високою афіністю та при низькій імуногенності). Напр., функціональний еквівалент молекули рецептора до TNF може містити кодон "SILENT" ("ТИША") або одну чи більше амінокислотних замінів; або заміну одного кодону, що кодує однакові або різні гідрофобні амінокислоти для іншого кодону, який кодує гідрофобні амінокислоти). Див. [Ausubel et al, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience, New York (1987-2000)].

Цитокіни включають будь-який відомий цитокін. Див., напр., CopewithCytokines.com. Антагоністи цитокінів включають, але не обмежуються, будь-яке антитіло, фрагмент або міметик, будь-який розчинний рецептор, фрагмент або міметик, будь-яку малу молекулу антагоніста або будь-яку їхню комбінацію.

Терапевтичне лікування. Будь-який метод даного винаходу може містити метод лікування розладів опосередкованих подвійним інтегрином, що включає введення ефективної кількості складу або фармацевтичного препарату, який містить принаймні одне анти-подвійне інтегринове антитіло в клітину, тканину, орган, тварину або пацієнта, при потребі такої модуляції або лікування. Такий метод може додатково окрім того включати супутне призначення або комбіновану терапію для лікування таких імунних захворювань, де призначення вищевказаного принаймні одного анти-подвійного інтегринового антитіла, певної його частини чи варіанта, окрім того включає призначення до, під час та/або після принаймні одного, що обране з принаймні з одного антагоніста TNF (напр., але не обмежуючись, антитілом до TNF або фрагментом, розчинний рецептор до TNF або фрагмент, їхні зливні протеїни або малу молекулу антагоніста TNF), антиревматичного засоба (напр., метотрексат, ауранофін, ауруглюкоза, азатіоприн, етанерсепт, натрія тіомалат золота, гідроксихлорохіна сульфат, лефлуномід, сульфасалазин), м'язового релаксанта, наркотиків, нестероїдних протизапальних препаратів (НПЗП), анальгетиків, анестетиків, седативного препарату, місцевого анестетика,

нервово-м'язового блокатора, антимікробного засобу (напр., аміноглікозид, антигрибковий препарат, антипаразитарний препарат, антивірусний препарат, карбапенем, цефалоспорин, фторхінолон, макролід, пеніцилін, сульфонамід, тетрациклін, інший антимікробний препарат), антипсоріатичного засобу, кортикостероїда, анаболічного стероїда, діабетологічного препарату, мінерала, харчового додатку, тиреоїдного препарату, вітаміна, кальцій-залежного гормону, антидіарейного засобу, протикашльового препарату, антиеметика, противиразкового препарату, послабляючого, антикоагулянта, еритропоетина (напр., епоетин альфа), філграстима (напр., G-CSF, Нейподжен), сарграмостиму (напр., GM-CSF, Лейкін), імунізації, імуносупресивного засобу (напр., базиліксимаб, циклоспорин, даклізумаб), гормону росту, гормоно-замісної терапії, модулятора естрогенових рецепторів, мудріатичних, циклоплегічних, алкілюючих засобів, антиметаболітиків, інгібіторів мітозу, радіоізотопних засобів, антидепресантів, антиманічних препаратів, антипсихотиків, анксиолітиків, снодійних, симпатоміметиків, стимуляторів, донезепілу, такрину, астматичних препаратів, бета-агоністів, інгаляційних стероїдів, інгібіторів лейкотриєну, метилксантину, кромоліну, адреналіну або аналогу, дорнази альфа (Пульмозим), цитокіна або цитокинового антагоніста або антитіла.

Зазвичай, лікування патологічних станів здійснюється за допомогою введення ефективної кількості або дози препарату принаймні одного антиподвійного інтегринового антитіла, що всього, в середньому, в діапазоні від принаймні приблизно 0,01 до 500 міліграм принаймні одного антиподвійного інтегринового антитіла на кілограм ваги пацієнта на дозу, та бажано від принаймні приблизно 0,1 до 100 міліграм антитіла/кілограм ваги пацієнта на одноразове або багаторазове введення, залежно від певної активності, що міститься в даному препараті. Альтернативно, ефективна сироваткова концентрація може містити 0,1-5000 μг/мл сироваткової концентрації на одноразове чи багаторазове введення. Належні дози відомі практикуючим медпрацівникам та, звісно, залежатимуть від окремого хворобливого стану, певної активності препарату, що вводиться, та окремого пацієнта, якому проводиться лікування. В деяких випадках, для досягнення бажаної терапевтичної кількості може бути необхідним повторне введення, тобто, повторні індивідуальні введення окремо дози, що моніторується чи вимірюється, де індивідуальні введення повторюються доки не буде досягнуто бажана добова доза або ефект.

Бажані дози можуть додатково включати 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 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, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 та/або 100-500 мг/кг/введення або будь-який їхній діапазон, значення або фракція, або до досягнення сироваткової концентрації 0,1, 0,5, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,5, 1,9, 2,0, 2,5, 2,9, 3,0, 3,5, 3,9, 4,0, 4,5, 4,9, 5,0, 5,5, 5,9, 6,0, 6,5, 6,9, 7,0,

7,5, 7,9, 8,0, 8,5, 8,9, 9,0, 9,5, 9,9, 10, 10,5, 10,9, 11, 11,5, 11,9, 20, 12,5, 12,9, 13,0, 13,5, 13,9, 14,0, 14,5, 4,9, 5,0, 5,5, 5,9, 6,0, 6,5, 6,9, 7,0, 7,5, 7,9, 8,0, 8,5, 8,9, 9,0, 9,5, 9,9, 10, 10,5, 10,9, 11, 11,5, 11,9, 12, 12,5, 12,9, 13,0, 13,5, 13,9, 14, 14,5, 15, 15,5, 15,9, 16, 16,5, 16,9, 17, 17,5, 17,9, 18, 18,5, 18,9, 19, 19,5, 19,9, 20, 20,5, 20,9, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 96, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500 та/або 5000 цг/мл сироваткової концентрації на одноразове або багаторазове введення, або будь-який їхній діапазон, значення або фракцію.

Альтернативно, доза, що призначається, може змінюватися залежно від відомих факторів, таких як фармакодинамічні характеристики окремих препаратів та їх способи і шляхи введення; вік, здоров'я та вага реципієнт; природа та вираженість симптомів, тип супутнього лікування, частота лікування та бажаний ефект. Зазвичай доза активного інгредієнта може бути від приблизно 0,1 до 100 міліграм на кілограм ваги тіла. Як правило 0,1-50, та бажано 0,1-10 міліграм на кілограм на введення або у формах з уповільненим вивільненням є ефективними для досягнення бажаних результатів.

Як один із прикладів, лікування людей та тварин може бути забезпечено в якості одноразового або періодичного введення принаймні одного антитіла даного винаходу у дозі від 0,1 до 100 мг/кг, такий як 0,5, 0,9, 1,0, 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 або 100 мг/кг, на добу в принаймні один із днів 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 або 40, або альтернативно чи додатково у принаймні один із тижнів 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, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51 або 52, або альтернативно чи додатково, у принаймні один із 1,2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 або 20 років, або будь-яка їхня комбінація, з використанням одноразового, інфузійного або повторного введення.

Форми дозування (препарату), що підходять для внутрішнього введення, загалом містять від приблизно 0,1 міліграма до приблизно 500 міліграм активної речовини на одиницю або контейнер. В цих фармацевтичних препаратах активний інгредієнт зазвичай буде присутнім у кількості від приблизно 0,5-99,999% ваги ґрунтуючись на загальній вазі препарату.

Для парентерального введення антитіла може бути виготовлене в якості розчину, суспензії, емульсії або ліофілізованого порошка у поєднанні, або окремо, з фармацевтично прийнятним парентеральним розчинником. Прикладами таких розчинників є вода, фізіологічний розчин, розчин Рінгера, розчин декстрази та 1-10% людський сироватковий альбумін. Можуть також використовуватися ліпосоми та неводні розчинники, такі як фіксовані масла. Розчинник або ліофілізований порошок може містити добавки, що підтримують ізотонічність (напр., натрія хлорид, маннітол) та хімічну стабільність (напр., буфери та консерванти). Пре-

парат стерилізується за допомогою відомих або належних методик.

Належні фармацевтичні носії описані у більшості останніх видань Remington's Pharmaceutical Sciences, A. Osol, стандартному базовому підручнику в цій галузі. Альтернативне введення

Згідно з даними винаходом можуть використовуватися багато відомих та розроблених способів для введення фармацевтично ефективних кількостей принаймні одного анти-подвійного інтегринового антитіла. В той час як в даному винаході використано легеневе введення, інші способи введення можуть використовуватися згідно з даним винаходом з належними результатами.

Подвійні інтегринові антитіла даного винаходу можуть бути доставлені за допомогою носія, в якості розчину, емульсії, колоїда або суспензії, або в якості сухого порошка, з використанням будь-якого з різноманітних пристроїв та методів, що підходять для введення за допомогою інгаляції або інших способів, описаних тут або відомих науці.

Парентеральні препарати та введення

Препарати для парентерального введення можуть містити в якості звичайних додатків воду або фізіологічний розчин, поліалкілен гліколь, такий як поліетилен гліколь, масла рослинного походження, гідрогеновані нафталіни тощо. Водні або масляні суспензії для ін'єкцій можуть бути приготовлені при використанні відповідних емульгаторів або зволожувачів та суспендуючих засобів, згідно з відомими методами. Препарати для ін'єкцій можуть бути нетоксичними, такими, що не призначаються перорально, розчинними засобами, такими як водний розчин або стерильний розчин для ін'єкцій або суспензія у розчиннику. В якості придатного для вжитку розчинника дозволено використовувати воду, розчин Рінгера, фізіологічний розчин тощо; в якості звичайного розчинника, або суспендуючого розчинника, може бути використане стерильне масло, що швидко не випаровується. З цією метою, може використовуватися будь-який тип нелетючого масла та жирної кислоти, включаючи природні або синтетичні або напівсинтетичні жирні масла чи жирні кислоти; природні або синтетичні або напівсинтетичні моно- чи ди- чи тригліцериди. Парентеральне введення відомо в науці і включає, але не обмежується, стандартні засоби ін'єкційного введення, газопресові безголкові ін'єкційні пристрої, як це [описано в Патенті США № 5,851,198, та лазерний перфораторний пристрій, як це описано в Патенті США № 5,839,446], що повністю включені тут у посиланнях.

Альтернативний пристрій

Винахід окрім того відноситься до введення принаймні одного анти-подвійного інтегринового антитіла за допомогою парентерального, підшкірного, внутрішньом'язового, внутрішнього, внутрішньоглобового, інтрабронхіального, інтраабдомінального, інтракапсулярного, інтрахрящового, інтракавітарного, інтрацеліального, інтрамозочкового, інтрацеребровентрикулярного, в товстий кишечник, інтрацервікального, інтрагастрального, внутріпечінкового, внутріміокардіального, інтраостеального, внутрітазового, інтраплеврального, інтрапростатного, внутрілегеневого, інтраректального, внутрініркового, інтраспінального, інтра-

синовіального, інтраторакального, внутріматкового, інтравезикального, болісного, вагінального, ректального, букального, сублінгвального, інтраназального або трансдермального шляхів. Препарат принаймні одного анти-подвійного інтегринового антитіла може бути приготовлений для використання для парентерального (підшкірного, внутрім'язового або внутрішнього) чи будь-якого іншого введення, зокрема у формі рідинних розчинів або суспензії; для використання при вагінальному або ректальному введенні, зокрема у напівтвердих формах, таких як, але не обмежуючись, форма порошка, назальних крапель чи аерозолі, або певних препаратів; або трансдермально, таких як, але не обмежуючись, гель, мазь, лосьйон, суспензія або система пластирного введення з хімічними поліпшувачами, такими як диметил сульфоксид, для того щоб модифікувати структуру шкіри, чи збільшити концентрацію препарату у трансдермальному пластині [Junginger, et al. В "Drug Permeation Enhancement"; Hsieh, D. S., Eds., pp. 59-90 (Marcel Dekker, Inc. New York 1994, повністю включений тут у посиланнях), або з окислюючими препаратами, що дають змогу нанесення препарату, який містить протеїни та пептиди, на шкіру (WO 98/53847), або нанесення електричних полів для створення тимчасового шляху транспортування, таких як електропорація, або для підвищення проникнення заряджених препаратів через шкіру, таких як іонтофорез, або нанесення ультразвуку, такий як сонофорез [Патенти США №№ 4,309,989 та 4,767,402] (вищенаведені публікації та патенти повністю включені тут у посиланнях).

Пульмональне/назальне введення

Для пульмонального введення, бажано, щоб препарат принаймні одного анти-подвійного інтегринового антитіла, подавався з розміром частинок, який ефективний для досягнення нижніх дихальних шляхів легенів або синусів. Згідно з даними винаходом, принаймні одне анти-подвійне інтегринове антитіло може бути доставлене за допомогою різноманітних інгаляційних або назальних пристроїв, що відомі в науці для введення терапевтичних препаратів за допомогою інгаляції. Ці пристрої, що спроможні відкладати аерозольні препарати у порожнині синуса або альвеолах пацієнта, включаючи інгалятори, які відмірюють дозу, небулайзери, сухопорошкові генератори, спреєри тощо. Інші пристрої, що підходять для проведення пульмонального або назального введення антитіла, також відомі в науці. Всі такі пристрої можуть використовувати препарати, які підходять для введення диспенсованого антитіла в аерозолі. Такі аерозолі можуть складатися як з розчинів (як водних, так і неводних), таких із твердих частинок. Інгалятори, що відмірюють дозу, по типу дозуючого інгалятора Ventolin®, зазвичай використовують пропелентний газ а потребують запуску під час вдиху [Див., напр., WO 94/16970, WO 98/35888]. Сухопорошкові інгалятори по типу Turbuhaler™ (Astra), Rotahaler® (Glaxo), Diskus® (Glaxo), інгалятор Spiros™ (Dura), пристрої, що продаються Inhale Therapeutics, та порошковий інгалятор Spinhaler® (Fisons), використовують дихальний запуск змішанного порошка [US 4668218 Astra, EP 237507 Astra, WO 97/25086 Glaxo, WO 94/08552

Dura, US 5458135 Inhale, WO 94/06498 Fisons, повністю включені тут у посиланнях]. Небулайзери (розпилювачі) по типу AERx™ Aradigm, небулайзер Ultravent® (Mallinckrodt) та небулайзер Acorn II® (Marquest Medical Products) (US 5404871 Aradigm, WO 97/22376), вищенаведенні посилання повністю включені тут у посиланнях, продукують аерозолі з розчинів, тоді як дозуючі інгалятори, сухопорошкові інгалятори тощо генерують аерозолі з малих частинок. Ці специфічні приклади комерційно доступних пристроїв призначені бути представниками специфічних пристроїв, що підходять для застосування даного винаходу, та не є обмеженням рамок даного винаходу. Бажано, щоб препарат, який містить принаймні одне анти-подвійне інтегринове антитіло поставлявся у вигляді сухопорошкового інгалятора або спреєра. Існують декілька бажаних характеристик інгаляційного пристрою для введення принаймні одного антитіла даного винаходу. Наприклад, введення за допомогою інгаляційного пристрою має переваги в плані надійності, відтворюваності та акуратності. Інгаляційний пристрій може додатково доставляти малі сухі частинки, напр. менші, ніж приблизно 10µM, бажано приблизно 1-5µM, для хорошого проникнення через дихальні шляхи.

Введення подвійного інтегринового антитіла. Препарати у вигляді спрею

Спрей, що включає препарат протеїна подвійного інтегринового антитіла, може бути виготовлений за допомогою прогонки під тиском суспензії чи розчину принаймні одного анти-подвійного інтегринового антитіла через сопло. Розмір та конфігурація сопла, тиск та швидкість поставки рідини можуть підбиратися для досягнення бажаного виходу та розмірів часток. Електроспрей може бути виготовлений, наприклад, за допомогою електричного поля у поєднанні з прогонкою через капіляр або сопло. Частинки препарату протеїна принаймні одного анти-подвійного інтегринового антитіла, що доставляються спреєм, переважно мають розмір менше, ніж приблизно 10µm, бажано у діапазоні від приблизно 1µm до приблизно 5µm, і найбажаніше від приблизно 2µm до приблизно 3µm.

Препарати протеїну принаймні одного анти-подвійного інтегринового антитіла, що підходять для використання зі спреєм, зазвичай включають протеїновий склад антитіла у водному розчині в концентрації від приблизно 0,1мг до приблизно 100мг протеїнового складу принаймні одного анти-подвійного інтегринового антитіла на мл розчину або мг/г, або будь-який їхній діапазон чи значення, напр., але не обмежуючись, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 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, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 або 100мг/мл чи мг/г. Препарат може включати такі компоненти, як добавки, буфер, ізотонічний компонент, консервант, сурфактант та, бажано, цинк. Препарат також може включати додаток або компонент для стабілізації протеїнового складу антитіла, такий як буфер, пом'якшувачий компонент, основний протеїн або карбогідрат. Основний протеїн, що корисний при підготовці протеїнового складу антитіла, включає альбумін, протамін то-

що. Типові карбогідрати, які корисні при приготуванні протеїнового складу антитіла, включають сахарозу, маннітол, лактозу, трегалозу, глюкозу тощо. Протеїновий склад антитіла препарату також може включати сурфактант, який може зменшувати або попереджати поверхне-індуковану агрегацію протеїнового складу антитіла, що спричинена атомізацією розчину при утворенні аерозолі. Можуть застосовуватися різноманітні традиційні сурфактанти, такі як ефіри та алкоголі поліоксиетиленових жирних кислот і ефіри поліоксиетилен сорбітолових жирних кислот. Кількості загалом перебувають у діапазоні від 0,001 до 14% від ваги препарату. Особливо бажаними сурфактантами для мети даного винаходу є поліоксиетилен сорбітан моноолеат, полісорбат 80, полісорбат 20 тощо. Додаткові компоненти відомі науці для утворення протеїна, такого як подвійні інтегринові антитіла, або певні їхні частини чи варіанти, можуть також включатися в препарат.

Введення препарату подвійного інтегринового антитіла за допомогою небулайзера

Протеїновий склад антитіла може бути введено за допомогою небулайзера, такого як потоковий небулайзер або ультразвуковий небулайзер. Зазвичай, в потоковому небулайзері, використовується джерело скомпресованого повітря для створення високошвидкісного потоку повітря через отвір. По тому як газ поширюється за соплом, створюється ділянка низького тиску, який витягує розчин протеїнового складу антитіла через капілярну трубку, що під'єднана до резервуара з рідиною. Струмінь рідини з капілярної трубки розбивається на нестабільні частинки та краплі, що створює аерозоль. Можуть застосовуватися цілий діапазон конфігурацій, швидкості потоку та типу дефлектора для досягнення бажаних характеристик в даному потоковому небулайзері. В ультразвуковому небулайзері, для створення вібраційної, механічної енергії використовується високочастотна електроенергія, що зазвичай потребує використання п'єзоелектричного трансдюсера. Ця енергія передається на препарат протеїнового складу антитіла або безпосередньо, або через сполучену рідину, що створює аерозоль, який включає протеїновий склад антитіла. Переважно, частинки протеїнового складу антитіла, які поступаються за допомогою небулайзера, мають бути розміром менше, ніж 10µm, бажано в діапазоні від приблизно 1µm до приблизно 5µm, і ще бажаніше від приблизно 2µm до приблизно 3µm.

Препарати принаймні одного анти-подвійного інтегринового антитіла, що підходять для використання з небулайзером, як поточковим, так і ультразвуковим, зазвичай включають концентрацію від приблизно 0,1мг до приблизно 100мг протеїна принаймні одного анти-подвійного інтегринового антитіла на мл розчину. Препарат може включати такі компоненти, як добавки, буфер, ізотонічний компонент, консервант, сурфактант та, бажано, цинк. Препарат також може включати додаток або компонент для стабілізації протеїнового складу антитіла, такий як буфер, пом'якшувачий компонент, основний протеїн або карбогідрат. Основний протеїн, що корисний при підготовці протеїнового складу антитіла, включає альбумін, протамін то-

що. Типові карбодірати, які корисні при приготуванні протеїнового складу антитіла, включають сахарозу, маннітол, лактозу, трегалозу, глюкозу тощо. Протеїновий склад антитіла препарату також може включати сурфактант, який може зменшувати або попереджати поверхне-індуковану агрегацію протеїнового складу антитіла, що спричинена атомізацією розчину при утворенні аерозолі. Можуть застосовуватися різноманітні традиційні сурфактанти, такі як ефіри та алкоholes поліоксиетиленових жирних кислот і ефіри поліоксиетилен сорбітолових жирних кислот. Кількості загалом перебувають у діапазоні від 0,001 до 14% від ваги препарату. Особливо бажаними сурфактантами для мети даного винаходу є поліоксиетилен сорбітан моноолеат, полісорбат 80, полісорбат 20 тощо. Додаткові компоненти відомі науці для утворення протеїна, такого як подвійні інтегринові антитіла, або певні їхні частини чи варіанти, можуть також включатися в препарат.

Введення препаратів подвійного інтегринового антитіла за допомогою дозуючих інгаляторів

У дозуючому інгаляторі (MDI), пропелент, принаймні одне анти-подвійне інтегринове антитіло та будь-які добавки містяться у балончику, в якості суміші, що включає зріджений скомпресований газ. Запуск дозуючого клапану вивільняє суміш у вигляді аерозолі, що бажано має містити частинки в діапазоні розміру від менше, ніж приблизно 10 μm, бажано від приблизно 1 μm до приблизно 5 μm, та ще бажаніше від приблизно 2 μm до приблизно 3 μm. Бажаний розмір частинок аерозолі може бути отриманий при застосуванні препарату протеїнового складу антитіла, що отриманий за допомогою різноманітних методів, відомих тим, хто є фахівцем в даній галузі, включаючи потрібнення струменя, висушення спрею, конденсацію в критичній точці тощо. Бажані дозуючі інгалятори включають ті, що вироблені 3M або Glaxo та використовують гідрофторовуглецевий пропелент.

Препарати принаймні одного анти-подвійного інтегринового антитіла для використання у пристроях дозуючих інгаляторів загалом включатимуть чітко розділений порошок, що містить принаймні одне анти-подвійне інтегринове антитіло, в якості суспензії у неводному середовищі, наприклад, суспендований у пропеленті за допомогою сурфактанта. Пропелентом може бути будь-який традиційний матеріал, що використовується для цієї мети, такий як хлорофторвуглець, гідрохлорофторвуглець, гідрофторовуглець або гідровуглець, включаючи трихлорофторометан, дихлородифторометан, дихлоротетрафтороетанол та 1,1,1,2-тетрафтороетан, HFA-134a (гідрофтороалкан-134a), HFA-227 (гідрофтороалкан-227) тощо. Бажаним пропелентом є гідрофторовуглець. Сурфактант може бути взятим для стабілізації принаймні одного анти-подвійного інтегринового антитіла в якості суспензії в пропеленті, для захисту активного компоненту від хімічної деградації тощо. Належні сурфактанти включають сорбітана триолеат, соєвий лецитин, олеєву кислоту тощо. В деяких випадках бажаними є розчинні аерозолі, що використовують такі розчинники, як етанол. Додаткові компоненти, які відомі в науці, для утворення

протеїна, такі як протеїн можуть бути також включені у препарат.

Ті, хто має належну кваліфікацію в даній галузі, визнають, що методи даного винаходу можуть бути досягнуті за допомогою пульмонального введення препаратів принаймні одного анти-подвійного інтегринового антитіла з використанням пристроїв, які тут не описані.

Пероральні препарати та їх введення

Препарати для перорального призначення базуються на супутньому використанні ад'ювантів (напр., резочиноли та неіонні сурфактанти, такі як поліоксиетилен олеїловий ефір та п-гексадецилполіетиленовий ефір) для штучного підвищення проникності стінок тонкого кишечника, а також на супутньому використанні ензиматичних інгібіторів (напр., інгібітори панкреатичного трипсина, діізопропілфторофосфат (DFF) та тразилол) для пригнічення ферментного розщеплення. Активні складові препарату у твердій формі для перорального прийому можуть бути змішані з принаймні одним додатком, включаючи сахарозу, лактозу, целюлозу, маннітол, трегалозу, рафінозу, мальтитол, декстран, крохмалі, агар, аргінати, жатини, жітозани, пектини, трагакантова камінь, арабікова смола, желатин, колаген, казеїн, альбумін, синтетичний або напівсинтетичний полімер та гліцерид. Ці форми також можуть містити інші типи додатків, напр., неактивний розчинюючий компонент, лубрикант, такий як магнія стеарат, парабен, консервант, такий як цистеїн, дезінтегратор, зв'язувач, потовщувач, буферний компонент, посоліджуючий компонент, ароматизуючий компонент тощо.

Таблетки та пігулки можуть окрім того бути виготовлені в якості препаратів із спеціальним захисним покриттям. Рідинні препарати для перорального прийому включають емульсію, сироп, еліксир, суспензію та розчинні препарати, що дозволяються для медичного використання. Ці препарати можуть містити неактивний розчинюючий компонент, що зазвичай використовуються у вищезгаданій галузі, напр., вода. Ліпосоми також були описані як системи доставки препарату для інсуліна та гепарина [Патент США № 4,239,754]. Нещодавно, для доставки фармацевтичних засобів були використані мікросфери штучних полімерів змішаних амінокислот (протеноїди) [Патент США № 4,239,673]. Окрім того, науці відомі компоненти носіїв для перорального прийому, що були описані в [Патенті США № 5,879,681 та Патенті США № 5,5,871,753].

Мукозальні препарати та їх введення

Для всмоктування через слизові поверхні, препарати та методи введення принаймні одного анти-подвійного інтегринового антитіла включають емульсію, що містить велику кількість субмікронних частинок, мукоадгезивні макромолекули, біоактивний пептид та безперервну водну фазу, яка покращує абсорбцію через слизові поверхні за допомогою досягнення мукоадгезії частинок емульсії [Патент США № 5,514,670]. Слизові поверхні, що підходять для нанесення емульсії даного винаходу, можуть включати рогівковий, кон'юнктивальний, буккальний, сублінгвальний, назальний, вагінальний, пульмональний, шлунковий, інтестинальний та ректальний шляхи введення. Препара-

ти для вагінального або ректального введення, напр. суппозиторії, можуть містити добавки, наприклад, поліалкіленегліколи, вазелін, масло какао тощо. Препарати для інтраназального призначення можуть бути твердими та містити в якості добавок, наприклад, лактозу, або можуть бути водними або масляними розчинами назальних крапель. Добавки для буккального призначення добавки включають цукри, кальція стеарат, магнія стеарат, прежелатинований крохмаль тощо [Патент США № 5,849,695]. Трансдермальні препарати та їх введення

Для трансдермального введення принаймні одне анти-подвійне інтегринове антитіло включене в капсулу засобу доставки, таких як ліпосома або полімерні наночастинки, мікрочастинки, мікрокапсула або мікросфери (що загалом називаються як мікрочастинки, якщо не обумовлено інше). Відомо багато відповідних засобів, включаючи мікрочастинки, що зроблені з синтетичних полімерів, таких як полігідроксиациди, такі як полілактова кислота, полігліколева кислота та їхні кополімери, поліортоестери, поліангідриди та поліфосфазани та природні полімери, такі як колаген, поліамінокислоти, альбумін та інші протеїни, альгінат та інші полісахариди та їхні комбінації [Патент США № 5,814,599].

Пролонговане введення та препарати

Інколи бажано вводити компоненти даного винаходу в суб'єкт протягом подовженого періоду часу, наприклад, протягом від одного тижня до одного року при одноразовому введенні. Можуть бути використаними різноманітні форми введення по типу повільного вивільнення, депот або імпланти. Наприклад, форма введення може містити фармацевтично прийнятну нетоксичну сіль компонента, що має низький ступінь розчинності в рідинах організму, наприклад, (а) добавки солей кислот з поліосновної кислоти, таких як фосфорна кислота, сірчанна кислота, лимонна кислота, тартарова кислота, таннієва кислота, памоева кислота, альгінієва кислота, поліглутамова кислота, нафатленові моно- або дисульфонієві кислоти, полігалактуронова кислота тощо; (b) сіль з полівалентного катіона металу, такого як цинк, кальцій, вісмут, барій, магній, алюміній, мідь, кобальт, нікель, кадмій тощо, або з органічного катіона, що утворений з напр., N,N'-дибензил-етиленедіамін або етиленедіамін; або (c) комбінації (a) і (b) напр. цинкова таннатова сіль. Додатково, компоненти даного винаходу чи, бажано, відносно нерозчинна сіль, такі як щойно було описано, можуть бути випущені в гелі, наприклад, гель моностеарата алюмінію з, напр. сезамової олії, що підходить для ін'єкцій. Зокрема бажаними солями є цинкові солі, цинкові таннатові солі, паноатіві солі тощо. Інший тип препаратів-депо повільного вивільнення для ін'єкцій міститиме компонент або сіль, що розподілена для включення у замкнений об'єм у повільно деградуєму, нетоксичному, неантигенному полімері, такому як олілактоїдний полімер/полігліколіколікислотний полімер, наприклад як описано в Патенті США № 3,773,919. Компоненти або, бажано, відносно нерозчинні солі, такі як ті, що описані вище, можуть також бути розташовані у холестеринному матриці силіконових округ-

лих таблеток великих розмірів, зокрема для використання у тварин. Додаткові препарати повільного вивільнення, депо або імпланти, напр. газові або рідинні ліпосоми відомі в літературі [Патент США № 5,770,222 та "Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems", J.R. Robinson ed., Marcel Dekker, Inc., N.Y., 1978].

По описанні винаходу загалом, більшого розуміння можна буде досягнути при звертанні до прикладів, які надаються для ілюстрації і не можуть вважатися як вичерпні.

Приклад 1: Клонування та експресія подвійного інтегринового антитіла у клітинах ссавців

Типовий вектор експресії у ссавців містить принаймні один промоутерний елемент, який опосередковує ініціацію транскрипції мРНК, кодує послідовність антитіла та сигнали, що потрібні для припинення транскрипції та поліаденіляції транскрипта. Додаткові елементи включають поліпшувачі, послідовності Kozak та проміжні послідовності, що розташовані обабіч донорських та акцепторних сайтів для розщеплення РНК. Високоєфективна транскрипція може бути досягнута за допомогою ранніх та пізніх промоутерів з SV40, довгих термінальних повторень (LTRS) з ретровірусів, напр., RSV, HTLV1, HIV1, та ранні промоутери цитомегаловіруса (CMV). Однак, можуть також використовуватися клітинні елементи (напр., людський актиновий промоутер). Належні вектори експресії для використання даного винаходу на практиці включають, наприклад, такі вектори, як pIRESneo, pRetro-Off, pRetro-On, PLXSN або pLNCX [Clontech Labs, Palo Alto, CA], pcDNA3.1 (+/-), pcDNA/Zeo (+/-) або pcDNA3.1/Hygro (+/-) (Invitrogen), PSVL та PMSG (Pharmacia, Uppsala, Швеція), pRSVcat (ATCC 37152), pSV2dhfr (ATCC 37146) та pBC12MI (ATCC 67109). Клітини господаря ссавців, що можуть використовуватися, включають людські клітини Hela 293, H9 та Jurkat, мишині клітини NIH3T3 та C127, клітини Cos 1, Cos 7 та CV 1, клітини перепела QC1-3, мишині L клітини та клітини яєчників китайських хомячків (CHO).

Альтернативно, ген може бути експресований у стабільних клітинних лініях, що містять ген інтегрований у хромосому. Ко-трансфекція з обраним маркером, таким як dhfr, gpt, неоміцин або піроміцин дозволяє ідентифікацію та ізоляцію трансфектованих клітин.

Трансфектні гени також можуть бути посилені для експресії великих кількостей кодованого антитіла. Маркер DHFR (дегідрофолат редуктази) є корисним для розробки клітинних ліній, що несуть декілька сотень або навіть декілька тисяч копій зацікавленого гену. Іншими корисними маркерами відбору є фермент глютамін синтаза (GS) [Murphy, et al., Biochem. J. 227:277-279 (1991); Bebbington, et al., Bio/Technology 10:169-175 (1992)]. При використанні цих маркерів, клітини ссавців вирощуються в обраному середовищі та відбираються клітини з найбільшою резистентністю. Ці клітинні лінії містять посилений ген(и), що інтегровані в хромосому. Клітини яєчників китайських хомячків (CHO) та NSO часто використовуються для продукції антитіл.

Експресія векторів pC1 та pC4 містять потужний промоутер (LTR) вірусу саркоми Ройза [Cullen, et al., *Molec. Cell. Biol.* 5:438-447 (1985)] плюс фрагмент CMV-поліпшувача [Boshart, et al., *Cell* 41:521-530 (1985)]. Множинні сайти клонування, напр., з рестриктивними сайтами ферментативно-го розщеплення BamHI, XbaI та Asp718, покращують клонування зацікавленого гена. Вектори додатково містять 3' інтрон, сигнали поліаденилації та припинення гена препроінсуліна щура.

Клонування та експресія клітин CHO

Для експресії подвійного інтегринового антитіла використаний вектор pC4. Плазмідна pC4 є похідною плазміді pSV2-dhfr (ATCC Accession No. 37146). Плазміді містять мишиний ген DHFR, що перебуває під контролем раннього промоутера SV40. Яєчники китайських хом'ячків або інші клітини, у котрих відсутня дигідрофолатна активність, що трансфіковані цими плазмідами, можуть бути відібраними за допомогою вирощування клітин у селективному середовищі [напр., alpha minus MEM, Life Technologies, Gaithersburg, MD], яке поставляється разом з хімотерапевтичним препаратом метотрексатом. Посилення генів DHFR в клітинах, які резистентні до метотрексата (MTX), було добре встановлено [див., напр., F. W. Alt, et al., *J. Biol. Chem.* 253:1357-1370 (1978); J. L. Hamlin та C. Ma, *Biochem. et Biophys. Acta* 1097:107-143 (1990); та M.J. Page та M.A. Sydenham, *Biotechnology* 9:64-68 (1991)]. Вирощування клітин у зростаючих концентраціях MTX розвивається резистентність до препарату внаслідок надвиробництва цільового фермента, DHFR, в результаті посилення гена DHFR. Якщо другий ген пов'язаний з геном DHFR, то він зазвичай також посилюється і надмірно експресується. В науці відомо, що такий підхід може використовуватися для розвитку клітинних ліній, що несуть понад 1000 копій посиленого гена(-ів). В подальшому, коли метотрексат видаляється, отримуються клітинні лінії, які містять посилений ген, інтегрований в одну або більше хромосом клітини господаря.

Для експресії зацікавленого гена плазмідна pC4 містить потужний промоутер довготермінального повторення (LTR) вірусу саркоми Ройза [Cullen, et al., *Molec. Cell. Biol.* 5:438-447 (1985)] плюс фрагмент, що ізолюваний з покращувача негайного раннього гена людського цитомегаловірусу (CMV) [Boshart, et al., *Cell* 41:521-530 (1985)]. Нижче промоутера знаходяться обмежувальні сайти ферментативного розщеплення BamHI, XbaI та Asp718, що дозволяє інтеграцію генів. Окрім цих клонуючих сайтів плазмідна містить інтрон 3' та поліаденилаційний сайт препроінсулінового гена щура. Для експресії також можуть бути використані інші високоефективні промоутери, напр., людський b-актиновий промоутер, ранній або пізній промоутери SV40 або довго-термінальні повторення з інших ретровірусів, напр., HIV та HTLV. Для експресії подвійного інтегрину у керований спосіб в клітинах ссавців можуть бути використані системи експресії генів Clontech Tet-Off і Tet-On та сході системи [M. Gossen та H. Bujard, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5547-5551 (1992)]. Для поліаденилації mPHK можуть також використовуватися інші сигнали, напр., з генів людського гормону росту або глобіну. Ста-

більні клітинні лінії, що несуть зацікавлений ген інтегрований в хромосоми, також можуть бути відібрані по ко-трансфікуванні з обраним маркером, таким як gpt, G418 або гіроміцин. Використанню більше, ніж одного обраного маркера на початку, напр., G418 та метотрексату, має переваги.

Плазмідна pC4 розщеплюється рестриктивними ферментами і потім дефосфорильована з використанням інтестинальної фосфатази теляти, що виготовляється відомими виробниками. Вектор потім ізолюється з 1% агарозного геля.

Використана послідовність ДНК, що кодує повне інтегринове антитіло, відповідає варіабельним регіонам HC та LC подвійного інтегринового антитіла даного винаходу згідно з етапами відомого методу. В цьому також використовується ізолювана нуклеїнова кислота, що кодує відповідний людський постійний регіон (тобто, регіони HC та LC).

Ізолюваний варіабельний та постійний регіон кодуєвої ДНК та дефосфорильований вектор після цього зв'язуються T4 ДНК лігазою. Потім трансформуються клітини *E. coli* HB101 або XL-1 Blue та ідентифікується бактерія, яка містить фрагмент, що вставлений у плазмідну pC4, з використанням, наприклад, рестриктивного ферментного аналізу.

Клітини яєчників китайських хом'ячків (CHO), у котрих відсутній активний ген DHFR, використовуються для трансфікування. 5μг експресії плазміді pC4 котрансфікується з 0,5μг плазміді pSV2-нео з використанням ліпофектина. Плазмідна pSV2нео містить домінуючий маркер, що обирається, ген нео з Tn5, що кодує фермент, який надає резистентність до групи антибіотиків, включаючи G418. Клітини висіваються в alpha minus MEM з 1μг/мл G418. Через 2 дні, клітини трипсинуються та висіваються в гібридомно-клонуючі пластини (Greiner, Німеччина) в alpha minus MEM з 10, 25 або 50 μг/мл метотрексата плюс 1μг/мл G418. Через приблизно 10-14 днів прості клони трипсинуються і потім висіваються у 6-лункові чашки Петрі або 10 мл колби з використанням різних концентрацій метотрексата (50 нМ, 100 нМ, 200 нМ, 400 нМ, 800 нМ). Клоні, що вирощуються при найвищих концентраціях метотрексату, потім переносяться в нові 6-лункові пластини, що містять навіть вищі концентрації метотрексата (1 мМ, 2 мМ, 5 мМ, 10 мМ, 20 мМ). Така ж процедура повторюється доти, доки не отримаються клони, що ростуть при концентрації 100-200 мМ. Експресія бажаного генного продукту аналізується, наприклад, за допомогою SDS-PAGE та Western blot або за допомогою реверсивно-фазового аналізу HPLC.

Приклад 2: Метод виробництва та характеристики, як одним із прикладів, повністю людського подвійного інтегринового антитіла

Резюме. Гібридні миші (CBA/Jx57/BL6/J) F2 [Taylor et al., *International Immunology* 6:579-591 (1993); Lonberg et al., *Nature* 368:856-859 (1994); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14:826 (1996); Fishwild et al., *Nature Biotechnology* 14:845-851 (1996)], що містить людські трансгени варіабельного та постійного регіона антитіла як для важких, так і для легких ланцюгів, були імунізовані людським плацентарним αVβ3. Одне злиття надає 2

повністю людських $\alpha V\beta 3$ реактивних моноклональних антитіл IgG1k, що називаються GenO.95 та GenO.101. В подальшому були характеризовані повністю людські анти- $\alpha V\beta 3$ антитіла і обидва вони були виявлені як реактивні до гетеродимерів $\alpha V\beta 3$ та $\alpha V\beta 5$, що свідчить про специфічність для загальних альфа ланцюгів обох молекул. Одне Mat, GenO.95, що також відоме як CNTO 95, пригнічує зв'язування як $\alpha V\beta 3$, так і $\alpha V\beta 5$, з вібронектином при аналізах, що базуються на клітинах.

Скорочення:

BSA - коров'ячий сировотковий альбумін

CO₂ - диоксид вуглецю

DMTO - диметил сульфоксид

ELA - імуноферментний аналіз

FBS - фетальна коров'яча сировотка

H₂O₂ - пероксид водню

HC - важкий ланцюг

HRP - пероксидаза хрину

Ig - імуноглобулін

IP - інтраперитонеальний

IV - внутрішній

Mab - моноклональне антитіло

OD - оптична густина

OPD - о-Фениленедіаміна дигідрохлорид

PEG - поліетиленгліколь

PSA - пеніцилін, стрептомицин, амфотерицин

RT - кімнатна температура

SQ - підшкірний

TBS - буферний сольовий розчин

v/v - об'єм на об'єм

w/v - вага на об'єм

Введення:

Ми використовували трансгенних мишей, що містять гени людських важких та легких ланцюгів імуноглобулінів, для генерації повністю людських моноклональних антитіл, що є специфічними до інтегринів αV . Ці нові антитіла можуть використовуватися терапевтично для пригнічення ангіогенного процесу за допомогою блокади зв'язування інтегринів αV з їхніми відповідними лігандами ECM та забезпечення додаткових засобів для лікування різноманітних видів раку.

Матеріали і методи

Тварини

Трансгенні миші, які були розроблені GenPharm International, виробляють людські імуноглобуліни, а не мишині IgM чи Igk. Ці миші містять людську трансгенну послідовність, яка проходить V(D)J приєднання, важко-ланцюгове класове включення та соматичну мутацію, для генерації великої кількості людських імуноглобулінів [Taylor et al., International Immunology 6:579-591 (1993)]. Трансген легкого ланцюга частково походить з дріжджевого штучного хромосомного клону, що включає приблизно половину ембріонального людського регіону V_k. На додаток до декількох генів V_H, важколанцюговий (HC) трансген кодує як людський μ та людський $\gamma 1$ [Lonberg et al., Nature 368:856-859 (1994)] та/або $\gamma 3$ постійні регіони. В процесах імунізації та злиття для отримання цих моноклональних антитіл використовувалися миші з генотипічного роду HC012.

Очищення людського $\alpha V\beta 3$

Людська плацента (подрібнена з використанням м'ясорубки) або клітини M21 людської меляноми, що експресують інтегрин $\alpha V\beta 3$, були екстраговані за допомогою сольового розчину, який містить 20 mM Tris pH 7,5, 1 mM CaCl₂, 1 mM MnCl₂, 100 mM октилтіоглюкозида (OTG від Pierce), 0,05% натрія азида та 1 mM фенолметилсульфонил фтора (Sigma). Суміш помішувалася протягом 1 год при кімнатній температурі і очищувалася за допомогою центрифугування при 10000хg. Верхній шар з плацентраного екстракта було поміщено в колонку афіності, що містить Mab 10E5 поєднане з сефарозою (Pharmacia) для видалення GP IIb/IIIa і черезпотоків фракція була додана до колонки афіності, що містить Mab c7E3 Fab поєднане з сефарозою (Pharmacia) для зв'язування $\alpha V\beta 3$. Колонка c7E3 була відмита з PBS, що містить 1 mM CaCl₂, 1 mM MnCl₂ та 0,1% OTG, а потім 0,1 mM ацетату натрія pH 4,5, 1 mM CaCl₂, 1 mM MnCl₂ та 0,1% OTG, pH 3,0. Колонка була елюювана 0,1 mM гліцина, 2% ацетовою кислотою, 1 mM CaCl₂, 1 mM MnCl₂ та 0,1% OTG. Екстракт, що містить очищені $\alpha V\beta 3$ було нейтралізовано з використанням 2M Tris pH 8,5. Очищення препаратів було досліджено за допомогою аналізу SDS-PAGE та ELISA для виключення забруднення GP IIb/IIIa [Wayner, et al., J. Cell Biol. 113: 919-929 (1991)].

Імунізації

Хірургічно кастровані миші чоловічої статі віком 15-17 тижнів отримані від GenPharm були імунізовані IP (200μл) та у 2 місцях SQ (100μл на місце) з всього 20 μг плацентарного $\alpha V\beta 3$ (початкова V фракція, JG21197), емульсифікованого з однаковим об'ємом повного ад'юванта Фройнда (день 0). Через 2 тижні миші імунізовувалися у такий же спосіб з $\alpha V\beta 3$ емульсифікованого з однаковим об'ємом неповного ад'юванта Фройнда. На 28, 42 та 56 день виконувалися 10μг IP/10μг SQ ін'єкції неповного ад'юванта Фройнда. На 42 та 56 дні у мишей бралася кров за допомогою ретроорбітальної пункції без антикоагулянтів. Кров згорталася при RT протягом 1 години, а потім відбиралася сировотка і вона титрувалася з $\alpha V\beta 3$ твердофазового EIA аналізу. Синтез, під назвою GenO, виконувався, коли повторні ін'єкції не викликали підвищення титрів. В цей період часу, мишам з титром специфічних людських IgG 1:1280 проти $\alpha V\beta 3$ вводилася остання IV ін'єкція 10μг $\alpha V\beta 3$ розведеного в 100μл фізіологічного розчину. Через 3 дні, миші умертвлялися за допомогою цервікальної дислокації і у них асептично видалялася селезінка та поміщалася в 10 мл холодного фосфатного буферного сольового розчину (PBS), що містить 100 Од/мл пеніциліна, 100μг/мл стрептомицину та 0,25μг/мл амфотерицину В (PSA). Спленоцити відбиралися за допомогою стерильної перфузії селезінки за допомогою PSA-PBS. Клітини були відмиті один раз у холодному PSA-PBS, підрховані з використанням виключення синього фарбника Tripan та ресуспендовані в RPMI1640 середовищі, що містить 25 mM Hepes.

Клітинні лінії

Несекретуючий мишиний мієломний зливний партнер, SP2/0 був отриманий групою Cell Biology Services (CBS) 9-1-93. Клітинна лінія була пошире-

на у α MEM (модифікованому) середовищі (JRH Biosciences) з умістом 10% (v/v) FBS (Cell Culture Labs), 1 мМ натрію піруват, 0,1 мМ NEAA, 2 мМ L-глутаміну (всі від JRH Biosciences) та криоконсервована у 95% FBS та 5% DMSO (Sigma), потім збережена парофазовому рідинноазотному холодильнику в CBS. Клітинний банк був стерильним (Qulait Control Centocor, Malvern) та не містив мікоплазму (Bionique Laboratories). Клітини підтримувалися в фазовій культурі до злиття. Вони відмивалися у PBS, підраховувалися та визначалася їхня життєздатність (>95%) за допомогою виключення трипанового синього барвника до злиття.

Клітинна лінія M21, людська меланома, що експресує інтегрини α V β 3 та α V β 5, була поширена та криоконсервована. В Cell Biology Services було отримано 10-ампульний дослідницький клітинний банк, який зберігався у рідинному азоті. Клітинний банк був стерильним та вільним від мікоплазми (Bionique Laboratories). Клітинна лінія MDAMB435L2, людська карцинома грудей, що була подарована д-ром Janet Price (MD Anderson, Houston TX), експресує інтегрин α V β 3. Клітинна лінія була криоконсервована у Cell Biology Services. Клітинний банк був стерильним та вільним від мікоплазми (Bionique Laboratories). Клітини M21 та MDAMB435L2 були розморожені, поширені у відповідному середовищі та підтримувалися у фазовому стані протягом кількох днів до використання біоаналізів або дозволялося їхнє скопичення для досягнення очищення протеїна α V β 3 (клітини M21).

Клітинне злиття

Було виконано злиття у співвідношенні 1:1 клітини мишиної міеломи (SP2/0) з життєздатними клітинами селезінки. Коротко, клітини селезінки та клітини міеломи були спільно гранульовані. Гранула була повільно ресуспендована, протягом 30 секунд, в 1 мл 50% (w/v) розчину PEG/PBS (молекулярна вага PEG 3000, Sigma) при 37°C. Злиття було припинене при повільному додаванні 1 мл PBS Далбекко (JRH) (37°C) протягом 1 хвилини. Додаткові 19 мл PBS були додані протягом наступних 90 секунд. Зливні клітини було відцентрифуговано протягом 5 хвилин при 750 обертах/хвилину. Клітини було потім ресуспендовано у середовищі NAT (α MEM середовище, що містить 20% фетальну коров'ячу сироватку (JRH), 1 мМ натрію піруват, 2 мМ L-глутаміна, 0,1 мМ неесенціальних амінокислот, 10 μ г/мл гентаміцина, 2,5% культивуєчого додатка Origen (Fisher), 50 μ M 2-меркаптоетанола, 100 μ M гіпоксантина, 0,4 μ M аміноптерина та 16 μ M тимідину), а потім розподілено по 200 μ л/лунку в тринадцяти 96-лункових плоскодонних пластинах для клітинних культур. Пластини потім було поміщено у зволожуючий 37°C інкубатор, що містить 5% CO₂ та 95% повітря на 7-10 днів.

Визначення людських IgG анти- α V β 3 антитіл у мишиній сироватці

Для скринінгу мишиної сироватки на людські IgG антитіла специфічні до людського α V β 3 було використано твердофазовий EIA. Коротко, пластили були покриті PBS при концентрації α V β 3 1 μ г/мл на ніч. Після відмивання 0,15 М сольового розчи-

ну, що містить 0,02% (v/v) Tween 20, лунки були блоковані 1% (w/v) BSA у HBSS Ca⁺⁺ та Mg⁺⁺, 200 μ л/лунку на 1 годину при RT. Пластили використувалися відразу або заморожувалися при -20°C для майбутнього використання. Мишина сироватка інкубувалася у подвійному розчиненні на пластинах покритих α V β 3 з концентрацією 50 μ л/лунку при RT протягом 1 години. Пластили відмивалися, а потім оброблялися 50 μ л/лунку HRP-міченими Fc специфічними козлиними антилюдськими IgG (Accurate) розведеними 1:30000 у 1% BSA-PBS протягом 1 год при RT. Пластили потім знову відмивалися та додавали 100 μ л/лунку розчину субстрата цитрат-фосфату (0,1 М лимонної кислоти та 0,2 М фосфату натрія, 0,01% H₂O₂ та 1 мг/мл OPD) на 15 хвилин при RT. Зупиняючий розчин (4N сірчана кислота) додавався у концентрації 25 μ л/лунку та OD визначався при 490 нм за допомогою автоматичного спектрофотометра.

Визначення повністю людських імунноглобулінів у верхньому шарі гібридоми

Оскільки миші GenPham спроможні генерувати як мишині, так і людські, імунноглобулінові ланцюги, при використанні двох окремих систем EIA було визначено росто-позитивні гібридоми, що секретують повністю людські імунноглобуліни. Пластили були покриті, як це описано вище, та нерозведений верхній шар гібридами інкубувався на пластинах протягом 1 години при 37°C. Пластили були відмиті та оброблені або з HRP-міченим козлиним антилюдським антитілом каппа (Southern Biotech) розведеним 1:10000 у 1% BSA-HBSS або HRP-міченим козлиним анти-людським IgG Fc специфічним антитілом розведеним до 1:30000 у 1% BSA-HBSS протягом 1 години при 37°C. Пластили потім інкубувалися з субстратним розчином, як це було описано вище.

Ізотипування

Ізотипне визначення антитіл було виконано з використанням EIA в такому ж форматі, що використовувався для скринінгу мишиної імунної сироватки на специфічні титри. α V β 3 наносився на 96-лункові пластили, як це було описано вище, та очищене антитіло в концентрації 2 μ г/мл інкубувалося на пластині протягом 1 години при RT. Пластили відмивалися та оброблялися HRP-міченим козлиним анти-людським IgG₁ (Binding Site) або HRP-міченим козлиним анти-людським IgG₃ розведеним при 1:4000 (Zymed) у 1% BSA-HBSS протягом 1 години при RT. Пластили були знову відмиті та інкубовані з субстратним розчином, як описано вище.

Зв'язуючі характеристики людських моноклональних антитіл при EIA

Зв'язуючі характеристики для антитіл оцінювалися з використанням EIA захоплення α V β 3. Пластили типу Linbro були покриті α V β 3 у концентрації 1 μ г/мл у TBS з 2 мМ кальція на ніч при 4°C. Пластили були відмиті та блоковані TBS/ 1% BSA/кальцій принаймні протягом 1 години при кімнатній температурі. Очищені антитіла інкубувалися у подвійному розчиненні від стартової концентрації 2 μ г/мл. Пластили були відмиті та до них додано кон'юговані антитіла (HRP-мічений козлиний анти-людський IgG Fc при 1:30000) та інкубовані на

пластинах протягом 1 години при кімнатній температурі. Пластини були відмиті, в лунки було додано субстрат OPD. Пластини були проаналізовані за допомогою автоматичного спектрофотометра.

Конкуренція зв'язування GenO95 з клітинами M21 різними комерційними анти-інтегриновими M ab

Клітини M21 були трипсинізовані з культурних колб, відмиті та ресуспендовані в HBSS/кальцій до 2×10^6 клітин/мл. GenO95 був попередньо помічений FITC-козліними анти-людськими Tc (Jackson) протягом 30 хвилин при RT. 10X концентрації 200 $\mu\text{g}/\text{мл}$ або 20 $\mu\text{g}/\text{мл}$ GenO95 інкубувалися з FITC-козліними анти-людськими IgG у концентрації 250 $\mu\text{g}/\text{мл}$. Клітини M21 у концентраціях кратних 100 $\mu\text{л}$ (2×10^5 клітин) інкубувалися з 12 $\mu\text{л}$ 10X GenO95 у високих (остаточно 20 $\mu\text{g}/\text{мл}$) та низьких (остаточно 2 $\mu\text{g}/\text{мл}$) концентраціях \pm 12 $\mu\text{л}$ таких мишиних антитіл: m7E3 IgG, анти- $\alpha\text{V}\beta 3$ (клон LM609, Chemicon), анти- $\alpha\text{V}\beta 5$ (клон P1F6, Gibco), анти- $\beta 3$ (Chemicon, AMAC) або анти- αV (клон VNR139, Gibco) антитілами (у концентрації 20 $\mu\text{g}/\text{мл}$) протягом 45 хвилин при 37°C. З кожної пробірки було взято кратну частину (для дво-кольорового аналізу), а решту було фіксовано з 1% параформальдегідом та проаналізовано на потоковому цитометрі. Для дво-кольорового аналізу, кратна частина (50 $\mu\text{л}$) інкубувалася з PE-козліни антимишиними IgG протягом 30 хвилин при RT до мічених мишиних анти- $\alpha\text{V}\beta 3$, анти- $\alpha\text{V}\beta 5$, анти- $\beta 3$ або анти- αV для дво-кольорового аналізу. Всі пробірки були фіксовані з 1% параформальдегідом.

Пригнічення $\alpha\text{V}\beta 3$ - або $\alpha\text{V}\beta 5$ -залежної M21- або MDAMB435L2-клітинної адгезії з пластинами покритими вібронектином за допомогою $\alpha\text{V}\beta 3/\alpha\text{V}\beta 5$ специфічних Mab

Пластини типу Linbro були покриті на 1 годину при кімнатній температурі 50 (іл/лунку вібронектином (Collaborative, Becton Dickinson) у концентрації 5 $\mu\text{g}/\text{мл}$ у TBS з 2 mM кальція. Пластини були відмиті HBSS/кальцій та блоковані TBS, що містить 2 mM кальція та 1% BSA протягом 30 хвилин при RT. Клітини M21 були трипсинізовані, одноразово відмиті з середовищем, що містить FCS, та ресуспендовані у 3 мл HBSS без кальцію. Всі відмивки виконувалися за допомогою 10 хвилиного обертання при 1000 обертах/хвилину в настільній центрифугі Sorvall. Для флуоресцентного мічення клітин, до них додавався кальцеїн (Molecular Probes) (5 $\text{mg}/\text{мл}$ у DMSO) до остаточної концентрації 100 $\mu\text{g}/\text{мл}$ у 50 мл конічних пробірках (обертаних фольгою). Клітини були інкубовані протягом 10-15 хвилин при 37°C. Кальцеїн-мічені клітини були одноразово відмиті з HBSS та ресуспендовані у HBSS, доповненим 0,1% BSA та 1 mM MgCl_2 . Антитіла були титровані (14-разована серія розведень) у HBSS/0,1% BSA/2 mM кальція при 10X остаточної концентрації. Клітини (300 $\mu\text{л}$ при $7,5 \times 10^6/\text{мл}$) були попередньо інкубовані з титрацією антитіл (37 $\mu\text{л}$ 10X розчину) \pm анти- $\alpha\text{V}\beta 5$ (P1F6) асцит (Chemicon) (37 $\mu\text{л}$ 1:600 (10X)) протягом 15 хв при 37°C. Клітинно-антитільна суміш додавалася до пластин, покритих вібронектином, у концентрації 100 $\mu\text{л}/\text{лунку}$ тричі (приблизно 6×10^5 клітин/лунку). Пластини були інкубовані протягом 45

хвилин при 37°C. Незв'язані клітини виділялися за допомогою двох відмивок з HBSS/кальцієм (150 $\mu\text{л}/\text{лунку}$). 100 $\mu\text{л}$ HBSS/кальцій додавався до кожної лунки і пластини аналізувалися на Fluoroskan при 485-538 нм.

При окремому аналізі клітини людської карциноми грудей MDAMB435L2 були вирощені з версею та суспендовані у безсировотковому середовищі у концентрації 500000 клітин/мл та інкубовані з різноманітними концентраціями GenO95. Після 10 хвилин інкубації суспензія пухлинних клітин (100 $\mu\text{л}$) додавалася до пластин типу Linbro покритих вібронектином (10 $\mu\text{g}/\text{мл}$) та інкубовані при 37°C. Через 1 годину, лунки були тричі відмиті з безсировотковим середовищем (200 $\mu\text{л}/\text{відмивку}$) та до кожної лунки було додано фарбник Cell Titer AQ на основі MIT (Promega). Ступінь клітинної адгезії було визначено на аналізаторі пластин ELISA, де OD490 нм є прямопропорційним клітинній адгезії.

Визначення Ca^{++} залежності для зв'язування анти-людських $\alpha\text{V}\beta 3/\alpha\text{V}\beta 5$ Mab з їхніми лігандами

Для визначення катіонної залежності при зв'язуванні C2TO 95 та C372 з $\alpha\text{V}\beta 3$ або $\alpha\text{V}\beta 5$, використовувалася рідиннофазовий EIA. На пластини EIA (Corning) було нанесено C2TO 95, C372, c7E3 або LM609 IgG Mab у концентрації 10 $\text{g}/\text{мл}$ з покриттям карбонатним буфером на ніч при 4°C. Пластини були блоковані 1% BSA розведеним у HBSS за присутності чи відсутності 2 mM Ca^{++} принаймні на 1 годину при 37°C. Подвійні розчини $\alpha\text{V}\beta 3$ (log JG52599) або $\alpha\text{V}\beta 5$ (Chemicon) починаючи з 10 $\text{g}/\text{мл}$ були попередньо інкубовані з 50 mM EDTA (Sigma) у 1% BSA/HBSS без Ca^{++} або з 1% BSA/HBSS з Ca^{++} протягом 30 хвилин при 37°C. Суміші потім були додані до пластин і інкубовані протягом 30 хвилин при 37°C. Пластини потім були відмиті та було додано неконкуруючі Mab до таких пластин як: пластини покриті C2TO 95, C372, c7E3 для визначення зв'язування $\alpha\text{V}\beta 3$, Mab LM609 додавалося у концентрації 20 $\text{g}/\text{мл}$ у 1% BSA/HBSS ∇Ca^{++} ; до пластин покритих LM609 для визначення зв'язування $\alpha\text{V}\beta 3$, Mab C2TO 95 додавалося у концентрації 20 $\text{g}/\text{мл}$ у 1% BSA/HBSS ∇Ca^{++} ; до пластин покритих C2TO 95, C372, c7E3 для визначення зв'язування $\alpha\text{V}\beta 5$, додавалося Mab VNR139 (Gibco) у концентрації 10 $\text{g}/\text{мл}$ у 1% BSA/HBSS ∇Ca^{++} та інкубовано протягом 30 хвилин при 37°C. Пластини були відмиті, було додано субстрат OPD та вимірювалося OD 490, як це описувалося раніше.

Результати та обговорення

Створення повністю людських анти-людських $\alpha\text{V}\beta 3$ інтегринових моноклональних антитіл

Одне злиття, під назвою GenO, було виконано з мишей GenPham, імунізованих протеїном $\alpha\text{V}\beta 3$. З цього злиття, було відібрано 129 росто-позитивних гібридів. Було ідентифіковано дві клітинні лінії гібридом, які секретують повністю людські IgG антитіла, що реактивні з людським $\alpha\text{V}\beta 3$. Ці дві клітинні лінії, GenO.95.9.12 та GenO.101.17.22, кожна з яких секретує імунноглобуліни людського IgG1к ізотипу та обидві були субклоновані двічі за допомогою обмеженого розведення для отримання стабільних клітинних ліній (>90%

гомогенності). GenO.95.91.12 було надано С-код #CNTO 95 і GenO. 101.17.22 було надано С-код #C372A. Кожна з цих клітинних ліній була заморожена у 12-ампульному дослідницькому клітинному банку, що зберігається у LN2.

Зв'язуючі характеристики людських моноклональних антитіл при EIA

Аналіз ELISA підтвердив, що очищене антитіло з двох гібридом, CNTO 95 та C372A, зв'язує $\alpha\text{V}\beta 3$ в концентрації-залежний спосіб. На рисунку 1 показано результати відносної зв'язуючої ефективності антитіл. 50-відсоткове зв'язування досягається при 0,07 та 0,7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ для C372A та CNTO 95, відповідно. При тому ж аналізі, c7E3 IgG показали 50-відсоткове максимальне зв'язування при 0,07 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Конкуренція зв'язування Mab GenO95 з клітинами M21 за допомогою комерційно доступних анти-інтегринових Mab

За допомогою одно-колірного аналізу, жодне з мишиних анти- $\alpha\text{V}\beta 3$, aHTH- $\alpha\text{V}\beta 5$, анти- $\beta 3$ або анти- α антитіл не конкурували з CNTO 95 при зв'язуванні з клітинами M21 (таблиця 1). Цей експеримент дозволив показати, що CNTO 95 зв'язується з клітинами M21 у дозозалежний спосіб. Дво-колірний аналіз показав, що мишині анти- $\alpha\text{V}\beta 3$, анти- $\alpha\text{V}\beta 5$, анти- $\beta 3$ або анти- α антитіла здатні зв'язуватися з клітинами M21 (дані не показано).

Таблиця 1: Конкуренція зв'язування Mab GenO95 з клітинами M21 за допомогою мишиних анти-інтегринових Mab

Конкуруюче антитіло	FITC-козлинні анти-людські Fc-мічені GenO95			
	2 $\mu\text{g}/\text{ml}$		20 $\mu\text{g}/\text{ml}$	
	MCF	% позитивних	MCF	% позитивних
негативний (без GenO95)	2,69		2,69	
позитивний (сольовий розчин)	4,33	100%	14,33	100%
m7E3 IgG	5,73	132%	14,72	103%
LM609 (анти- $\alpha\text{V}\beta 3$)	4,78	110%	13,34	93%
анти- $\beta 3$ (Chemicon)	5,42	125%	13,10	91%
анти- $\beta 3$ (AMAC)	4,61	106%	13,10	91%
P1F6 (анти- $\alpha\text{V}\beta 5$)	4,87	112%	14,46	101%
VNR139(анти- α_v)	4,61	106%	14,86	104%

MCF = серединноканальна флуоресценція

Пригнічення $\alpha\text{V}\beta 3$ - або $\alpha\text{V}\beta 5$ -залежної M21- або MDAMB435L2-клітинної адгезії з пластинами покритими вібронектином за допомогою $\alpha\text{V}\beta 3/\alpha\text{V}\beta 5$ специфічних Mab

Клітини M21 адгезують на пластинах покритих вібронектином у $\alpha\text{V}\beta 3$ - або $\alpha\text{V}\beta 5$ -залежний спосіб. Таким чином, для повного пригнічення M21-клітинної адгезії до пластин покритих вібронектином необхідна блокада як $\alpha\text{V}\beta 3$, так і $\alpha\text{V}\beta 5$. C372A не пригнічує M21-клітинну адгезію за присутності чи відсутності P1F6, анти- $\alpha\text{V}\beta 5$ асциту (рисунок 2). GenO95 (CNTO 95) повністю пригнічує M21-клітинну адгезію до пластин покритих вібронектином як з, так і без анти- $\alpha\text{V}\beta 5$ (P1F6) асциту, що вказує, що антитіло блокує як $\alpha\text{V}\beta 3$, так і $\alpha\text{V}\beta 5$. В якості контролю для параметрів аналізу, було включено ReoPro (c7E3 Fab), що блокує $\alpha\text{V}\beta 3$ (на додаток до GPIIb/IIIa). Саме ReoPro тільки частково пригнічує M21-клітинну адгезію, ReoPro за присутності анти- $\alpha\text{V}\beta 5$ (P1F6) асциту повністю пригнічує адгезію, на що вказує зв'язування клітин M21 з вібронектином через як $\alpha\text{V}\beta 3$, так і $\alpha\text{V}\beta 5$ інтегрини. Дані були нормалізовані по відсотку максимального M21-клітинного зв'язування за відсутності антагоніста +/- анти- $\alpha\text{V}\beta 5$ (P1F6) асциту. Для титрації антагоністу без P1F6, дані було нормалізовано по

максимальному зв'язуванню клітин M21 за відсутності антагоністу P1F6.

Для титрації антагоніста за присутності P1F6, дані було нормалізовано по максимальному зв'язуванню за відсутності антагоніста, але за присутності P1F6. Дані було відображено у графічному вигляді як відсоток максимального зв'язування (без антитіла) та у вигляді нелінійної регресії виконаної з використанням GraphPad Prism.

GenO95 також показали здатність повністю пригнічувати адгезію клітин MDAMB435L2 до вібронектина при мінімальній концентрації 1,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (рисунок 3). Ці дані, у комбінації з даними, які вказують на пригнічення адгезії клітин M21, підтверджують здатність GenO95 функціонально пригнічувати $\alpha\text{V}\beta 3$ та/або $\alpha\text{V}\beta 5$ рецепторну взаємодію з вібронектином.

Визначення Ca^{++} залежності для зв'язування анти-людських $\alpha\text{V}\beta 3/\alpha\text{V}\beta 5$ Mab з їхніми лігандами

Відомо, що присутність катіона кальція необхідна для зв'язування Mab c7E3 з $\alpha\text{V}\beta 3$ і не потрібна для зв'язування Mab LM609 з $\alpha\text{V}\beta 3$, як це показано на рисунках 4c і 4d, відповідно. Цей експеримент було проведено для оцінки того чи буде кальцієва залежність також впливати на зв'язуючі характеристики CNTO 95 або C372 для інтегринів $\alpha\text{V}\beta 3$ і $\alpha\text{V}\beta 5$. У форматі аналізу було внесе-

но надмірну концентрацію EDTA для хелатування Ca, що був присутній у зв'язуючій кишені інтегрованих гетеродимерів, і, таким чином, зв'язування оцінювалося за відсутності катіона. Було встановлено, що зв'язування CNTO 95 та C372 з $\alpha\text{V}\beta 3$ не залежить від присутності Ca (рисунко 4a, 4b). Те ж саме є правдивим для зв'язування CNTO 95 з $\alpha\text{V}\beta 5$, але, однак, не є таким для $\alpha\text{V}\beta 3$ (рисунок 4e, 4f), оскільки зв'язування збільшується за присутності Ca.

Висновок

Злиття GenO було виконано з використанням спленоцитів гібридних мишей, що містять трансгенні людського варіабельного та постійного регіонів антитіла, які були імунізовані людським $\alpha\text{V}\beta 3$. Було створено повністю людські $\alpha\text{V}\beta 3$ реактивні IgG моноклональні антитіла ізо типу IgG1k. Ці Mab були в подальшому охарактеризовані та було встановлено, що вони зв'язують як $\alpha\text{V}\beta 3$, так і $\alpha\text{V}\beta 5$ інтегрини. Було показано, що зв'язування двох Mab є кальцій-незалежним для $\alpha\text{V}\beta 3$ і кальцій-залежним для $\alpha\text{V}\beta 5$ тільки для зв'язування C372. Більш того, одне Mab, GenO95 (CNTO 95), спроможне повністю

Клітини A375S2, клітинна лінія людської меланоми, що експресує інтегрини $\alpha\text{V}\beta 5$ та $\alpha\text{V}\beta 3$, були культивовані в мінімальному середовищі Dulbecco (DMEM), що містить 10% фетальну коров'ячу сировотку (FBS, Cell Culture Labs), 1 mM натрія пірувата, 0,1 mM неесенціальних амінокислот та 2 mM L-глутаміна (всі від JRH Biosciences).

Клітини HT29, клітинна лінія людської карциноми товстого кишківника, що експресує інтегрини

$\alpha\text{V}\beta 5$ та мінімум $\alpha\text{V}\beta 3$, отримана від д-ра J. Jakubowski (Eli Lilly, Inc.), культивувалися у середовищі RPMI (JRH Biosciences), що містить 10% FBS, 1 mM натрія піруват, 0,1 mM неесенціальних амінокислот та 2 mM L-глутаміна. Інтегрини

$\alpha\text{V}\beta 3$ серія JG22499 був очищений Centocor з людської плаценти. Інша серія інтегрини $\alpha\text{V}\beta 3$ (октилова версія, серія 19100991) був придбаний у Chemicon. $\alpha\text{V}\beta 5$ (версія Triton, серія 20030055, серія 1910990 та октилова версія, серія 19060747) було придбано у Chemicon.

Антитіла

GenO.95 був очищений з поверхневого шару після центрифугування клітинної культури за допомогою хроматографії Протеїна А. ReoPro було вироблено у Centocor, Inc. LM609, мишине анти-людське $\alpha\text{V}\beta 3$ антитіло, (1976ZK, серія 20020559 та серія 1910329) та P1F6, мишине анти-людське антитіло $\alpha\text{V}\beta 5$ (1961 P-K, серія 17110560) були придбані у Chemicon.

Радіомітки

Антитіла були помічені ізотопом ^{125}I Na (Amersham, IL) з використанням Iodobeads (Pierce Chemicals, IL) до специфічної активності 1-2 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$. Концентрація антитіла (mg/ml) була визначена шляхом ділення абсорбції (OD/ml) при 280 нм на 1,4. Специфічна активність йодированого антитіла була визначена шляхом розведення антитіла та підрахунку кратності в гамма-лічильнику або Topcounter (Packard).

$$\text{Специфічна активність (cpm}/\mu\text{g}) = \frac{\text{cpm}/\text{об'єм (мл)} \times \text{фактор розведення}}{\text{концентрація } (\mu\text{g}/\text{мл визначений при реєстрації OD}_{280})}$$

Аналіз зв'язування пластин покритих інтегрином

Інтегрин $\alpha\text{V}\beta 3$ або $\alpha\text{V}\beta 5$ були розведені до 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ в Tris-буферному сольовому розчині (TBS, 10 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 7,5), що містить 2 mM кальція хлориду ($\text{TBS}/\text{Ca}^{++}$), та внесений по 50 μl на лунку на 96-лункові полістеренові пластини типу Linbro (Flow/ICN) на ніч на 4°C. Пластини були відмиті $\text{TBS}/\text{Ca}^{++}$ та блоковані 1% коров'ячим сировотковим альбуміном (BSA) у $\text{TBS}/\text{Ca}^{++}$ протягом 1 год при кімнатній температурі. 50 мікролітрів розведеного антитіла було додано тричі до покритих лінок та інкубовано протягом 2 год при 37°C. Після трьох відмивок з TBS-Tween буфером (TBS + 0,1% Tween 20), було додано пероксидазо-кон'юговані козлині анти-людські IgG F(ab')₂ (H+L, Jackson серія 16869), при 1:40:000 розведенні в 1% BSA-TBS та інкубовано протягом 1 год при кімнатній температурі. Пластини були відмиті тричі та оброблені о-фениленедіамін дигідрохлоридним субстратним розчином (OPD, Sigma), що містить 0,1 M лимонної кислоти, 0,2 M натрія фосфата, 0,01% H_2O_2 та 1 mg/ml OPD. Кольорова обробка була припинена після 15 хв при кімнатній температурі з 0,3 N H_2SO_4 та пластини були досліджені при OD₄₉₀ нм у аналізаторі пластин Molecular Dynamics.

Криві зв'язування були створені за допомогою GraphPad PRISM (версія 3, GraphPad Software): Результати були виражені у % макимального зв'язування значення статурації. K_D , константа дисоціації зв'язування (виражається у M) була визначена за допомогою нелінійної регресії даних з використанням PRISM.

Клітинно-зв'язуючий аналіз

50 мікролітрів розведеного радіоміченого антитіла в 2% RPMI середовищі, що містить 2% коров'ячий сировотковий альбумін (JRH Biosciences) було додано тричі до клітин, що з'єднуються, культивованих у 96-лунковій тканинно-культурній пластині (Packard). Клітини були інкубовані протягом 1,5 год при 37°C; м'яко відмиті тричі за допомогою буферного сольового розчину Hanks, що містить кальцій та магній (HBS++, JRH Biosciences) і потім аспіровані. В кожному лунку було додано 100 мікролітрів Mucosinct 20 (Packard) і було оцінено клітинно-зв'язуючу радіоактивність у TopCounter (Packard).

Для визначення неспецифічного зв'язування, було проведено експеримент з таким же набором розведень за присутності 100-разового надлишку немічених антитіл.

Для визначення кількості клітин, розташованих у кожній лунці, клітини з кількох лунок були видалені за допомогою трипсину, зібрані та підраховані

під мікроскопом. Кількість рецепторів на клітину

вираховувалася таким чином:

$$\text{Кількість рецепторів /клітину} = \frac{\text{специфічне зв'язування cpm} \times 6,023 \times 10^{23} \text{ молекул/моль}}{\text{специфічна активність (cpm/g)} \times \text{мол.вага (г/моль)} \times \text{к-сть клітин}}$$

Вмах, максимальна кількість зв'язуючих місць на клітину, та K_d були визначені шляхом нелінійної регресії даних з використанням PRISM.

Результати та обговорення

Визначення значень зв'язуючої афіності було виконано за допомогою вимірювання зв'язування різних концентрацій GenO.95 (та ReoPro) з очищеними інтегрини $\alpha_v\beta_3$ і $\alpha_v\beta_5$ та з клітинною поверхнею у балансі. Криві сатурації зв'язування були прямокутними гіперболами, що свідчить про одно-рецепторне зв'язуюче місце для GenO.95 та ReoPro (рис.5-6; Motulsky H, 1999). Аналіз цих даних сатурації зв'язування (інколи називаються експериментами Scatchard) були виконані з використанням нелінійної регресії одно-місцевої гіперболи в PRISM для отримання афіності, K_d та кількості рецепторів, Вмах (Molutsky H, 1999).

Було використано декілька серій GenO.95, ReoPro та очищених інтегринів для забезпечення акуратного визначення значень зв'язуючої афіності. Криві сатурації зв'язування GenO.95 на пластинах покритих $\alpha_v\beta_3$ (рис. 5A) та кривих зв'язування ReoPro на пластинах покритих $\alpha_v\beta_5$ (рис. 5B) відображають середнє значення та середнє відхилення 6 окремих експериментів. Результати отримані з версією Triton $\alpha_v\beta_3$ були встановлені як більш відтворювані, ніж ті, що було отримано з октилової версії. На пластинах покритих $\alpha_v\beta_3$, середня K_d GenO.95 становила $2,1 \pm 1,33 \times 10^{-10}$ М; та середня K_d ReoPro становила $2,5 \pm 1; 6 \times 10^{-10}$ М.

Крива сатурації зв'язування GenO.95 на пластинах покритих $\alpha_v\beta_5$ (рис. 6A) та криві зв'язування ReoPro на пластинах покритих $\alpha_v\beta_5$ (рис. 6B) показані як середнє значення та стандартне відхилення 6 окремих експериментів. Результати отримані з октиловою версією були послідовнішими, ніж ті, що були отримані з версією Triton. Середня K_d

GenO.95 на $\alpha_v\beta_5$ становила $2,5 \pm 1,04 \times 10^{-11}$ М. ReoPro не продемонстрував зв'язування та залежності від дози на пластинах покритих $\alpha_v\beta_5$.

Значення зв'язуючої афіності для очищених інтегринів порівнювалися зі зв'язуванням з рецепторами, що експресуються на різних клітинних лініях. На рисунку 7A-C показано зв'язування 125-I GenO.95 з клітинами A375S2, які експресують $\alpha_v\beta_3$ та $\alpha_v\beta_5$ (рис. 7A). Середні значення афіності на клітинах A375S2 становили: $K_d = 5,2 \pm 2,04 \times 10^{-9}$ М; та 120000 ± 37000 рецепторів/клітину. Клітини HT-29 експресують $\alpha_v\beta_5$. Значення афіності для зв'язування 125-I GenO.95 з клітинами HT-29 становили: $K_d = 1,3 \pm 3,76 \times 10^{-10}$ М; та 81000 ± 24000 рецепторів/клітину (рис. 7B). Клітини M21 експресують інтегрини $\alpha_v\beta_3$ та $\alpha_v\beta_5$. Зв'язування 125-I GenO.95 з клітинами M21 становило: $K_d = 8,5 \pm 3,03 \times 10^{-9}$ М; та 200000 ± 80000 рецепторів/клітину (рис. 7C).

Такі ж дослідження клітинного зв'язування були виконані з 125-I ReoPro на різноманітних клітинних лініях. На рисунку 8A-C показано зв'язування 125-I ReoPro з клітинами A375S2 та отриманими середніми значеннями були: $K_d = 22 \pm 3,7 \times 10^{-9}$ М; та 370000 ± 190000 рецепторів/клітину (рис. 8A). На клітинах HT-29, 125-I ReoPro показав мінімальне зв'язування (рис. 8B). Зв'язування 125-I ReoPro з клітинами M21 показало: $K_d = 10 \pm 2,00 \times 10^{-9}$ М і 660000 ± 120000 рецепторів/клітину (рис. 8C). Значення зв'язування 125-I

ReoPro на клітинах M21 збігаються зі значеннями, що були раніше опубліковані (Tam et al, 1998).

Виклад результатів зв'язування показано у таблиці 2-3.

Таблиця 2. Афіність GenO.95 та ReoPro до очищених інтегринів

	Пластини покриті $\alpha_v\beta_3$ (n = 6)	Пластини покриті $\alpha_v\beta_5$ (n = 6)
	K_d (M)	K_d (M)
GenO.95	$2,1 \pm 1,33 \times 10^{-10}$	$2,5 \pm 1,04 \times 10^{-11}$
ReoPro	$2,5 \pm 1,46 \times 10^{-10}$	Незначна

Таблиця 3. Афіністість GenO.95 та ReoPro до клітин

	Клітини A375S2	Клітини A375S2	Клітини HT-29	Клітини HT-29	Клітини M21	Клітини M21
	Kd (M)	<i>Рецепторів на клітину</i>	Kd (M)	Рецепторів на клітину	Kd (M)	Рецепторів на Клітину
GenO.95	5,2 ± 2,04 x 10 ⁻⁹ (n=5)	120000 ± 37000 (n=7)	1,3 ± 0,38 x 10 ⁻⁹ (n=5)	81000 ± 24000 (n=7)	8,5 ± 3,03 x 10 ⁻⁹ (n=4)	200000 ± 80000 (n=8)
ReoPro	22 ± 3,7 x 10 ⁻⁹	370000 ± 190000 (n=6)	Незначно (n=4)	<i>Незначно</i> (n=4)	10 ± 2,0 x 10 ⁻⁹ (n=3)	660000 ± 120000 (n=7)

82 НЕ ПОДАНО НА МОМЕНТ УКЛАДАННЯ

що культовані у тривимірному фібриновому матриксі, таким чином демонструючи, що це анти-тіло має потенціальні анти-ангіогенні властивості.

Вступ

Тепер існують суттєві дані про те, що прогресивний ріст пухлини залежить від ангіогенезу, утворення нових кровоносних судин. Ці кровоносні судини забезпечують пухлини поживними речовинами та киснем, відводять продукти розпаду та діють як провідники для метастазування пухлинних клітин у віддаленні ділянки (1). Останні дослідження окрім того визначили різноманітні ролі інтегринів в процесах ангіогенезу. Інтегрини є гетеродимерними трансмембранними протеїнами, що відіграють важливу роль в опосередкуванні клітинної адгезії, міграції, виживання та проліферації (2). Експресія інтегринів $\alpha V\beta 3$ є мінімальною на кровоносних судинах у стані спокою чи у нормі, але значно зростає на ангіогенних судинних клітинах (1-3). Тісно пов'язаний, але відмінний інтегрин $\alpha V\beta 5$ також демонструє участь в опосередкуванні процесу ангіогенезу. Антитіло, що генерується проти $\alpha V\beta 3$, блокує ангіогенез індукований основним фібробластним фактором росту (FGF), тоді як антитіло специфічне до $\alpha V\beta 5$ пригнічує ангіогенез індукований судинним ендотеліальним фактором росту (VEGF) (1-5).

Ангіогенез може бути зімітовано in vitro за допомогою ендотеліального ростового аналізу. Ця система включає міграцію та проліферацію ендотеліальних клітин. GenO95 є людським моноклональним антитілом, що впізнає інтегрини $\alpha V\beta 3$ та $\alpha V\beta 5$, а ці інтегрини регулюють проліферацію та міграцію ендотеліальних клітин. Цей приклад описує експерименти, котрі показують, що GenO95 пригнічує поширення росту людських ендотеліальних клітин у фібриновому матриксі.

Матеріали

Людський основний фактор росту фібробластів (bFGF) та людський ендотеліальний фактор

росту 165 (VEGF₁₆₅) було отримано від R&D Systems (Minneapolis, MN). MAB 1976Z (LM609), моноклональне антитіло проти інтегрини $\alpha V\beta 3$ та MAB 1961 (P1F6), моноклональне антитіло проти інтегрини $\alpha V\beta 5$, були придбані у Chemicon (Temecula, CA). ReoPro та GenO95 були отримані у Відділі клінічної фармакології та технології антитіл Centocor. Людський фібриноген (без плазміногену, >95% згортуючий протеїн) та коров'ячий шкірний желатин були придбані у Sigma (Saint Louis, MI).

Клітинні лінії

Huvecs, людські ендотеліальні клітини умбілікальної вени, було придбано в Clonetics (Walkersville, MA). Huvecs культивувалися в ендотеліальному базально-медіумі (EBM) наборі (Clonetics), що містить 10% FBS, довгу R інсуліно-подібного фактору росту-1, аскорбінову кислоту, гідрокортизон, людський епідермальний фактор росту, людський судинний ендотеліальний фактор росту, hFGF-b, гентаміцина сульфат та амфотерицин-B. Клітини були інкубовані при 37°C та 5% CO₂ і середовище змінювалося кожні 2-3 доби. В усіх експериментах використовувалися тільки пасажі 3-8. Ростовий аналіз, що базується на фібринових мікроносіях

Модифікація метода Nehls та Drenckhahn (6) використовувалася для визначення утворення капілярних трубок в тривимірному матриксу на основі фібрину. Було приготовлено мікроносії цитодекс-3 покриті фібрином (MC, Sigma) згідно з рекомендаціями постачальника. Свіжо автоклавовані MC суспендувалися в EBM-2 + 20% FBS та додавалися ендотеліальні клітини до" фінальної концентрації 40 клітин/ MC. Клітинам дозволялося приєднуватися до MC протягом 4-го динного періоду інкубації при 37°C. MC суспендувалися у великому об'ємі середовища та культивувалися протягом 2-4 днів при 37°C у атмосфері 5% CO₂. MC періодично перемішувалися для попередження агрегації кульок покритих клітинами. MC було вбудовано у фібриновий гель, що був приготовлений

таким чином: людський фібриноген (2 мг/мл) був розчинений у простому середовищі EBM-2, що містить bFGF або сировотку. Цей розчин також містить різноманітні антитіла. Для попередження надмірного фібринолізу клітин занурених у фібрин, апротинін додавався до розчину фібриногена та до середовища росту у концентрації 200 Од/мл. Мікронодії покриті клітинами додавалися до розчину фібриногена з густиною 100-200 МС/мл (50-100 кульок/ лунку - 48-лункової пластини) та було індуковано згортання за допомогою додавання тромбіна (0,5% Од/мл). По завершенні згортання, 0,5 мл розчину (що містить всі компоненти описані вище, окрім фібриногену та тромбіну) додавалося до фібринових матриць. Пластини інкубувалися при 37°C та 5% CO₂ протягом 1-3 днів. Через 1-3 дні, гель фіксувався з 3% параформальдегідом розчином у PBS та визначалася кількість капілярних ростків з довжиною, що перевищує діаметр кульки МС (150 μ m).

Результати та обговорення

Huvecс може формувати капілярно-подібні ростки при культивуванні у фібриновому гелі (рисунок 9). Ендотеліальні клітини мігрують назовні від кульок покритих желатином та розростаються у вигляді довгої філоподії. Довгі ростки складаються з декількох клітин, що утворюють просвіт. Цей процес нагадує мікрокапілярне утворення *in vivo*, тому що він залучає міграцію, інвазію ендотеліальних клітин та клітинну проліферацію. Визначення кількості утворених ростків показало, що GenO95 пригнічує утворення ендотеліальних клітинних ростків у bFGF або повному середовищі (Рисунок 10). Комбінація LM609 та P1F6 зазвичай пригнічує ріст ефективніше, ніж GenO95 (Рисунок 11).

Висновок

Утворення нових кровоносних судин з існуючих кровоносних судин є наріжним каменем ангіогенезу. Цей процес може імітуватися *in vivo* за допомогою ендотеліального росткового аналізу. Ці ростки відображають мікрокапіляри, що формуються у відповідь на ангіогенні стимули, такі як bFGF або різноманітні стимули, які присутні у сировотці. GenO95 дозо-залежно пригнічує bFGF- та повносередовищно-стимульоване утворення ростків ендотеліальних клітин, що свідчить про те, що це антитіло може ефективно пригнічувати функцію α V β 3 та α V β 5. Чому GenO95 не є таким ефективним, як комбінація LM609 та P1F6 невідомо, але можливо, що GenO95 впізнає α V β 3 та α V β 5 з нижчою афінією при порівнянні з LM609 та PTF6, відповідно. Загалом, ці дані показують, що GenO95 може пригнічувати складний процес утворення мікрокапілярів *in vivo*.

Посилання

1. Gastl G, Hermann T, Steurer M, Zmija J, Gunsilius E, Unger C, and Kraft A. 1997. Angiogenesis as a Target for Tumor Treatment. *Oncology* 54:177-184.

2. Elicieri BP, and Cheresh DA. 1999. The role of α V integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development. *The Journal of Clinical Investigation* 103:1227-1230.

3. Brooks PC, Montgomery AM, Rosenfeld M, Reisfeld RA, 1994. Integrin α V β 3 antagonist promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell* 79: 1157-1164.

4. Enenstein J, Walweh NS, and Kramer RH. 1992. Basic FGF and TGF- β differentially modulate integrin expression of human microvascular endothelial cells. *Exp. Cell Res.* 203:499-503.

5. Friedlander M, Brooks PC, Shaffer RW, Kincaid CM, Varner JA, and Cheresh DA. 1995. Definition of two angiogenic pathways by distinct α V integrins. *Science* 270:1500-1502.

6. Nehls, V and Drenckhahn, D. 1995. A novel, microcarrier-based in vitro assay for rapid and reliable quantification of three-dimensional cell migration and angiogenesis. *Microvascular Res.* 50:311-322.

Приклад 5: Вплив подвійного інтегринового антитіла на адгезію, міграцію та інвазію ендотеліальних і пухлинних клітин

Резюме

Гібридні миші (CBA/J x C57/BL6/J) F₂ (1-4), що містять трансгени варіабельного та постійного регіонів людських антитіл як для важких, так і легких ланцюгів, були імунізовані людським плацентарним α V β 3. Одне злиття надало повністю людське α V β 3-реактивне IgGk моноклональне антитіло, що називається GenO95. Було встановлено, що повністю людське антитіло є реактивним до інтегринів α V β 3 та α V β 5 (5). Ці інтегрини беруть участь у адгезії, міграції та інвазії ендотеліальних та пухлинних клітин. Отже, нами описано ефект GenO95 на інтегрин-опосередковану рухомість клітин. GenO95 пригнічує зв'язування людських ендотеліальних клітин умбілікальної вени (HUVEC) та клітин меланоми людини з вібронектином, денатурованим колагеном, фібриногеном та фібрином, але він не блокує адгезію клітин до фібронектину та колагену типу I. GenO95 також пригнічує міграцію ендотеліальних клітин, яка була стимульована основним фактором росту фібробластів та низькими дозами сірки. GenO95 пригнічує інвазію пухлинних клітин через фібриновий гель. У заключення, GenO95 функціонально блокує α V β 3 та α V β 5 в різноманітних клітинних аналізах *in vitro*.

Скорочення

BSA - коров'ячий сировотковий альбумін

CO₂ - диоксид вуглецю

DMSO - диметилсульфоксид

FBS - фетальна коров'яча сировотка

Ig - імунноглобулін

Mab - моноклональне антитіло

OD - оптична густина

RT - кімнатна температура

HUVECS - ендотеліальні клітини умбілікальної вени людини

bFGF - коров'ячий основний фактор росту фібробластів

Вступ

Існують суттєві дані про те, що прогресивний ріст пухлин залежить від ангіогенезу. Утворення нових кровоносних судин забезпечує пухлини поживними речовинами та киснем, вони відводять продукти розпаду та діють як провідники для метастазування пухлинних клітин у віддаленні ділянки. Декілька досліджень встановили роль інтегри-

нів в процесі ангиогенезу. Інтегрини є гетеродиметрними трансмембранними протеїнами, що відіграють критичну роль в клітинній адгезії до екстрацелюлярного матриксу (ECM) та опосередковують виживання, проліферацію та міграцію клітин (6). Під час процесу ангиогенезу, на поверхні активованих ендотеліальних клітин активуються $\alpha V\beta 3$ та $\alpha V\beta 5$, які в свою чергу допомагають цим клітинам мігрувати та проліферувати (6). Антитіло, що створено проти $\alpha V\beta 3$ блокує ангиогенез, індукований основним фактором росту фібробластів (bFGF), тоді як антитіло специфічне до $\alpha V\beta 5$ пригнічує ангиогенез, індукований фактором росту судинного ендотелію (VEGF) (6,7). На додаток до регулювання ангиогенезу, $\alpha V\beta 3$ та $\alpha V\beta 5$ регулює адгезію, міграцію і інвазію пухлинних клітин, необхідні для метастазування пухлинних клітин процеси. Попередні дослідження показали, що GenO95 зв'язується з очищеними інтегрини $\alpha V\beta 3$ та $\alpha V\beta 5$, таким чином, ми встановили, що це антитіло може функціонально блокувати $\alpha V\beta 3$ - та $\alpha V\beta 5$ -опосередковану адгезію, міграцію та інвазію пухлинних клітин.

Матеріали і методи

Матеріали

Коров'ячий фактор росту фібробластів (bFGF) та людський ендотеліальний фактор росту 165 (VEGF₁₆₅) було отримано від R&D Systems (Minneapolis, MN). MAB 1976Z (LM609), моноклональне антитіло проти інтегрини $\alpha V\beta 3$ та MAB 1961 (P1F6), моноклональне антитіло проти інтегрини $\alpha V\beta 5$ були придбані у Chemicon (Temecula, CA). ReoPro (серія: 94A04ZE) та GenO95 (серія: JG100899) були отримані від Centocor. Вставки клітинних культур BIOCOAT (розмір пор: 8 μ m) були придбані у Becton Dickinson (Bedford, MA). Набір аналізу клітинної адгезії Vybrant™ (V-13181) були придбані у Molecular Probes (Eugene, OR). Людський фібриноген без плазміногену (VWF/Fn очищений) було придбано у Enzyme Research Labs (South Bend, IN). Коров'ячий шкірний желатин було придбано у Sigma (Saint Louis, MO). Вібронектин людини було придбано у Promega (Madison, WI), а колаген типу I було придбано у GIBCO BRL (Gaithersburg, MD).

Клітинні лінії

Ендотеліальні клітини умбілікальної вени людини (HUVECS) було придбано у Clonetics (Walkersville, MA) і вони були культивовані в наборі середовища EBM (Clonetics), що містить 10% FBS, довгий R інсуліно-подібний фактор росту-1, аскорбінову кислоту, гідрокортизон, людський епідермальний фактор росту, людський судинний ендотеліальний фактор росту, гентаміцина сульфат та амфотерицин-В. Клітини були вирощені при 37°C та 5% CO₂ і середовище змінювалося кожні 2-3 доби. В усіх експериментах використовувалися тільки пасажі 3-8.

Клітинна лінія меланоми людини A375S.2, що експресує інтегрини $\alpha V\beta 3$ та $\alpha V\beta 5$, були отримані від Centocor Cell Bank, де клітинні лінії вважаються не забрудненими мікоплазмами та бактеріями. Клітини культивувалися у середовищі DMEM з 10% FBS, 2 mM L-глутаміну, 1 mM натрія пірувата та 0,1 mM неесенціальних амінокислот.

Клітини карциноми товстого кишківника людини HT29 було отримано у Centocor Cell Biology Service Department, де клітинна лінія вважається не забрудненою мікоплазмою та бактеріями. Клітини були культивовані в середовищі α -MEM з 10% FBS, 2 mM L-глутаміна, 1 mM натрія пірувата та 0,1 mM не-есенціальних амінокислот.

Потокова цитометрія

Для визначення поверхневих інтегринів, клітини були вирощені, промиті, суспендовані у небагатому середовищі RPMI та потім інкубовані протягом 60 хвилин на льоду з анти-інтегриновим mAb (10 μ г/мл) та FITC-мічені козлині анти-мишині антитіла (1:100) або FITC-мічені анти-інтегринові антитіла (10 μ г/мл). Відсутність первинних антитіл або замінників первинних антитіл ізотипічно-подібними антитілами, слугувала негативним контролем. Клітини були відразу проаналізовані на потоковому цитометрі FACS Scan II (Beckton Dickinson, Mountain View, CA).

Аналіз адгезії

Пластини Microtiter (Linbro-Titertek, ICN Biomedicals, Inc) були покриті при 4°C на ніч вібронектином (1 μ г/мл), желатином (0,1%), фібриногеном (100 μ г/мл), колагеном типу I та блоковані на 1 годину 1% BSA/PBS (pH 7,4). Лунки Microtiter покриті фібрином були сформовані обробкою тромбіном (1 Од/мл) або фібриногеном. Зв'язуючі клітини (HUVECS HT29 та A375S.2) були помічені флюоресцентним фарбником Calcein AM (Molecular Probes, Eugene, OR) згідно з інструкціями виробника, вирощені, двічі промиті та суспендовані у 0,1% з різноманітними концентраціями антитіл протягом 15 хв при 37°C. Клітинно-антитільна суміш була додана до лунок (100 μ л на лунку) та інкубовані протягом 1 год при 37°C. Пластини були двічі промиті з PBS для видалення незв'язаних клітин та було виміряно адгезію у флюоресцентному аналізаторі пластин (Fluoroskan) при 485-538 нм. Клітинна адгезія до лунок покритих BSA слугувала негативним контролем. Ізотипно-подібні антитіла були негативним контролем.

Аналіз хемотактичної міграції

Аналіз клітинної міграції було виконано у 24-транслункових камерах з полістиреновою мембраною (діаметр 6,5 мм, товщина 10 μ m та розмір пор 8 μ m). Суб-зливні 24-год клітинні культури (HUVECS або A375S.2) були вирощені з трипсин-EDTA, двічі відмиті та ресуспендовані в їхніх відповідних середовищах без сировотки, що містить 0,1% BSA. Клітини (100000/500 μ л) було додано до верхньої камери за присутності чи відсутності антитіл. Для покращення хемотактичної клітинної міграції, 750 μ л середовища, що містить 0,1% BSA та вібронектин (2 μ г/мл) або сировотку (2% для клітин HUVECS і 10% для клітин A375S2) було додано у нижні камери, а пластина була розташована в інкубаторі тканинних культур. Міграцію було припинено через 4-8 год шляхом видалення клітин з верхньої камери за допомогою бавовняного тампону, а потім фільтри було зафіксовано 3% параформальдегідом та зафарбовано Crystal Violet. Ступінь клітинної міграції була визначена за допомогою світлової мікроскопії і зображення були проаналізовані з використанням програмного за-

безпечення аналізу зображень Phase 3 (Glen Mills, PA). Програмне забезпечення аналізує загальну площу зайняту зафарбованими клітинами на нижній поверхні фільтра і це є прямопорційним ступеню клітинної міграції.

Дослідження гаптотактичної міграції

Аналізи клітинної міграції були виконані з використанням транслункових камер, як це описано вище з незначною модифікацією. Коротко, нижня частина мембрани покривалася вібронектином (2 $\mu\text{g}/\text{мл}$) протягом 60 хвилин при кімнатній температурі, а потім блокувана розчином 1% BSA/PBS при кімнатній температурі протягом 60 хв. Потім, мембрани були відмиті з PBS та висушені повітрям. Безсировоткове середовище (750 $\mu\text{л}$), що містить 0,1% BSA та bFGF (20 $\text{нг}/\text{мл}$) була додана до нижніх камер. Суб-зливні 24-год кльотри були оброблені EDTA-трипсином, двічі промиті та ресуспендовані у безсировотковому середовищі. Клітини (100000/500 $\mu\text{л}$) були додані до верхніх камер за присутності чи відсутності антитіл. Камери були поміщені у інкубатор тканинних культур і міграція відбувалася протягом 6 год. Ступінь клітинної міграції визначався так, як це описувалося вище.

Аналіз інвазії

Фібриноген (безплазміновий, 100 $\mu\text{л}$ 10 $\text{мг}/\text{мл}$) та 100 $\mu\text{л}$ 1 Одмл тромбіна були змішані та відразу додані у верхню камеру 24-лункової транслункової пластини (діаметр 6,5 мм, товщина 10 $\mu\text{м}$ і розмір пор 8,0 $\mu\text{м}$, Costar). Пластини були інкубовані при 37°C протягом 30 хвилин для утворення фібринового гелю. Зливні пухлинні клітини (A375S.2) були трипсинізовані, центрифуговані, ресуспендовані в базальному середовищі з вмістом 0,1% BSA та 10 $\mu\text{г}/\text{мл}$ плазміногена (Enzyme Research Labs, South Bend, IN) з різноманітними концентраціями антитіл та інкубовані протягом 15 хвилин при кімнатній температурі. Клітини (100000/500 $\mu\text{л}$) було додано до верхньої камери за присутності чи відсутності антитіл. Нижній відділ камери інвазії було заповнено 0,75 мл 10% FBS-DMEM, який слугував хемоатрактантом і пластини були перенесені до інкубатора тканинних культур. Через 24 години, інвазію було припинено шляхом видалення клітин бавовняним тампоном, і фільтри були фіксовані 3% параформальдегідом та зафарбовані Crystal Violet. Ступінь клітинної міграції було проаналізовано за допомогою програмного

обладнання аналізу зображень Phase 3, як це було описано вище.

Результати та обговорення

GenO95 пригнічує $\alpha\text{V}\beta 3$ - та $\alpha\text{V}\beta 5$ -опосередковану клітинну адгезію

Оскільки GenO95 зв'язується з інтегринами $\alpha\text{V}\beta 3$ і $\alpha\text{V}\beta 5$, ми визначили чи наші пухлинні клітини (A375S.2 та HT29) і ендотеліальні клітини експресують ці інтегрини. Поточкова цитометрія показала, що клітини A375S.2 та HUVEC експресують як $\alpha\text{V}\beta 3$, так і $\alpha\text{V}\beta 5$ інтегрини, але клітини HT29 експресують інтегрин $\alpha\text{V}\beta 5$, але не інтегрин $\alpha\text{V}\beta 3$ (рисунк 12A-I).

Клітини HT29 (12A, B та C) експресують інтегрин $\alpha\text{V}\beta 5$, але не інтегрин $\alpha\text{V}\beta 3$ на їхній поверхні. Клітини HUVEC (12D, E та F) та A375S.2 (12G, H та I) експресують інтегрин $\alpha\text{V}\beta 5$ і $\alpha\text{V}\beta 3$ на їхній поверхні. Пухлинні клітини та ендотеліальні клітини були зафарбовані за допомогою імуннофлуоресценції та проаналізовані за допомогою потокової цитометрії. Гістограма ліворуч відображає фонову флуоресценцію за присутності ізотипно-подібного антитіла. Гістограма праворуч вказує позитивне зафарбовування. A, D, G, LM609 (mAb до $\alpha\text{V}\beta 3$, 10 $\mu\text{г}/\text{мл}$); B, E, H, P1F6 (mAb до $\alpha\text{V}\beta 5$, 10 $\mu\text{г}/\text{мл}$); та C, F, I, GenO95 (10 $\mu\text{г}/\text{мл}$).

Було детально визначено вплив GenO95 на адгезію клітин HUVEC, A375S.2 та HT 29 з різноманітними матричними протеїнами. GenO95 повністю пригнічував адгезію клітин HUVEC та A375S.2 до пластини покритих вібронектином, та частково фібриногеном, желатином і фібрином, що вказує, що антитіло може блокувати $\alpha\text{V}\beta 3$ та $\alpha\text{V}\beta 5$ (рисунки 2 і 3, таблиця 1 і 2).

91 НЕ ПОДАНО НА МОМЕНТ УКЛАДАННЯ

таблиця 5. Адгезія клітин A375S.2 до вібронектину, желатину, фібриногену, фібрину, фібронектину та колагену типу I. Ступінь клітинної адгезії за присутності різноманітних концентрацій антитіла відображено у вигляді відсотка від клітинної адгезії за відсутності антитіла, що розглядається як 100%. Кожна точка даних є середньою триразових визначень (\pm SD). Концентрація антитіл, що використовувалися, становить 10 $\mu\text{г}/\text{мл}$.

Адгезія (%) +/- SD

	Вібронектин	Желатин	Фібриноген	Фібрин	Фібронектин	Колаген типу I
Людський IgG	104,0 ± 5,3	94,6 ± 12,4	102,5 ± 5,9	99,5 ± 4,0	100,0 ± 5,5	99,1 ± 3,3
LM609	42,1 ± 6,1	25,2 ± 7,1	14,0 ± 1,8	50,0 ± 1,9	104,0 ± 8,1	100,0 ± 1,5
PIF6	28,5 ± 3,8	87,4 ± 7,8	99,4 ± 3,6	92,9 ± 4,7	101,0 ± 5,7	101,0 ± 7,3
LM609- PIF6	0,9 ± 0,3	1,1 ± 1,5	10,3 ± 2,6	47,6 ± 3,2	109,0 ± 4,1	102,0 ± 4,6
GenO95	1,4 ± 0,4	23,2 ± 7,2	11,4 ± 2,8	43,3 ± 3,5	103,0 ± 4,5	104,0 ± 5,9
ReoPro	38,1 ± 0,7	6,0 ± 1,0	6,5 ± 2,1	12,9 ± 3,8	104,0 ± 5,6	93,1 ± 3,1

Адгезія клітин карцинома товстого кишечника людини HT29 до вібронектину. Аналіз адгезії було виконано так, як це описано у Методах. Адгезія клітин до лунок покритих BSA була негативним контролем. Дані на рисунку 15 відкладено у вигляді відсотка максимального зв'язування (відсутність антитіла) та є середнім значенням трьох вимірювань (+/- SD).

GenO95 блокує міграцію клітин меланоми людини та ендотеліальних клітин

Інтегрини $\alpha V\beta 3$ та $\alpha V\beta 5$ беруть участь у міграції клітин, таким чином ми визначали чи GenO95 може блокувати вібронектин-стимульовану клітинну міграцію. Вібронектин-стимульована клітинна міграція залучає $\alpha V\beta 3$ та $\alpha V\beta 5$. GenO95 у дозозалежний спосіб пригнічує міграцію ендотеліальних клітин, коли вібронектин використовується в якості хемоатрактанта (рисунки 5 і 6). Цікаво, що GenO95 також блокує міграцію як HUVECS, так і клітин A375S.2 до сировотки (рисунки 7-8). Ці дані можуть бути потенційно важливими для ангіогенної та пухлинної терапії, оскільки вони свідчать, що цілями для GenO95, $\alpha V\beta 3$ та $\alpha V\beta 5$ є центральні рецептори, що активуються багатьма факторами міграції, які наявні у сировотці.

Мірація HUVECS до вібронектину 2 μ г/мл. Аналіз було виконано так, як це описано у Методах, і міграція клітин продовжувалася 6 год. Фотомікрографії є репрезентативними полями (10х лінзи об'єктива) клітинної міграції на рисунку 16A, відсутність антитіла, (16B), GenO95 (5 μ г/мл), (16C), GenO95 (40 μ г/мл). Рисунок 16D є графічним відображенням клітинної міграції за присутності різних концентрацій GenO95. Дані було нормалізовано до відсотка від контролю (без антитіла), як брався за 100% і кожна точка даних є середнім трьох транслункових фільтрів (+/- SD).

Міграція HUVECS у напрямку вібронектину 2 μ г/мл за присутності антитіл до $\alpha V\beta 3$ та $\alpha V\beta 5$. аналіз міграції було виконано так, як це описано у Методах, і клітини мігрували протягом 6 годин. LM609 та P1F6 є mAb до $\alpha V\beta 3$ та $\alpha V\beta 5$, відповідно. Дані показані на рисунку 17 було нормалізовано у відсотках до контролю (без антитіла), який приймався за 100%, і кожний стовпчик є середнім

трьох транслункових фільтрів (+/- SD). BSA, мишиний IgG та людський IgG були негативними контролюями. LM609-P1F6 відповідає комбінації обох антитіл. Антитіла та BSA використовувалися у концентраціях 10 μ г/мл.

Міграція HUVECS у напрямку до 2% FBS. Аналіз міграції проводився протягом 4 год і дані збиралися так, як це описано у Методах. Рисунок 18(A) є графічним відображенням клітинної міграції за присутності LM609, P1F6, комбінації LM609+P1F6, ізотипно-подібних контрольних антитіл (людських і мишиних). Антитіла та протеси використовувалися у концентрації 10 μ г/мл. Рисунок 18(B) є графічним відображенням клітинної міграції за присутності ReoPro та GenO95. Фотомікрографії є репрезентативними полями (10х лінзи об'єктива) клітинної міграції на рисунку 18(C), відсутність антитіла, рисунку 18(D), GenO95 (5 μ г/мл), та рисунку 18(E), GenO95 (20 μ г/мл). Дані нормалізовано у відсотках від контролю (немає антитіл), який приймався за 100%, і кожна точка є середнім трьох транслункових фільтрів (+/- SD).

Міграція клітин A375S.2 у напрямку до 10% FBS. Аналіз міграції проводився протягом 4 год і дані збиралися так, як це описано у Методах. Антитіла використовувалися у концентрації 10 μ г/мл. Рисунок 19(A) є графічним відображенням клітинної міграції за присутності різних концентрацій GenO95. Рисунок 19(B) є графічним відображенням клітинної міграції за присутності LM609, P1F6, комбінації LM609+ P1F6, ізотипно-подібних контрольних антитіл (людських і мишиних). Рисунок 19(B) є графічним відображенням клітинної міграції за присутності ReoPro та GenO95. Фотомікрографії є репрезентативними полями (10х лінзи об'єктива) клітинної міграції на рисунку 19(C), відсутність антитіла, рисунку 19(D), GenO95 (5 μ г/мл), та рисунку 19(E), GenO95 (20 μ г/мл).

Результати, описані вище, вказують, що GenO95 блокує пухлинну та ендотеліальну міграцію до вібронектину та сировотки. Далі, ми визначили чи ці антитіла можуть пригнічувати bFGF-стимульовану міграцію. Як показано на рисунку 9, bFGF-стимульована міграція клітин HUVECS у

напрямку до вібронектина, і GenO95 достовірно блокує цю стимульовану клітинну міграцію.

Міграція HUVECS у напрямку вібронектина за присутності bFGF. Нижня частина фільтрів міграційної камери була покрита вібронектином 2 $\mu\text{g}/\text{мл}$, і аналіз було виконано так, як це описано у Методах. Клітини проходили міграцію протягом 6 год. На рисунку 20A-E, кожна точка даних є середньою 3 транслункових фільтрів (\pm SD). Рисунок 20(A), bFGF; Рисунок 20(B), GenO95 (5 $\mu\text{g}/\text{мл}$); Рисунок 20(C), GenO95 (40 $\mu\text{g}/\text{мл}$); Рисунок 20(D), без bFGF. Рисунок 20(E), графічно показано пригнічення клітинної міграції за присутності різноманітних антитіл.

GenO95 блокує інвазію клітин меланоми людини

Вищеописані результати вказують, що GenO95 може пригнічувати адгезію та міграцію клітин. Таким чином, ми досліджували чи це антитіло може блокувати інвазію пухлинних клітин, багатокроковий процес, що включає клітинну адгезію, деградацію матрикса та міграцію клітин через деградований матрикс. Ми обрали фібрин в якості матриксу для пухлинних клітин, оскільки GenO95 був спроможний блокувати адгезію пухлинних клітин до фібрину (Рисунок 3). Як показано на рисунку 10, інвазія клітин A375S.2 може бути пригнічена за допомогою LM609, що свідчить про залучення принаймні одного $\alpha\text{V}\beta 3$ в цей процес. GenO95 дозозалежно пригнічував інвазію пухлинних клітин через фібрин. Невідповідні IgG та mAb до тромбоцитарних GPIIb/IIIa (10E5) були негативним контролем. Загалом ці дані свідчать, що GenO95 може ефективно блокувати інвазію клітин меланоми людини.

Інвазія клітин A375S.2 через фібриновий гел (5 $\text{mg}/\text{мл}$). Аналіз інвазії проводився протягом 24 год і дані отримувалися так, як це описано у Методах. Фотомікрографії є репрезентативними полями (4x лінзи об'єктиву) клітинної інвазії на рисунку 21 (а) за відсутності антитіл, рисунку 21 (Б) GenO95 (10 $\mu\text{g}/\text{мл}$), рисунки 21(С) та (D) є графічним відображенням клітинної інвазії за присутності GenO95, 10E5 F(ab')₂, LM609, P1F6, LM-P1F6 (LM609+P1F6), людських та мишиних IgG (H-IgG та M-IgG). Графік рисунка 21(D): концентрації всіх антитіл та протеїнів становлять 10 $\mu\text{g}/\text{мл}$. Дані нормалізовано у відсотках до контролю (без антитіл), який прийнято за 100%, і кожна точка даних є середньою трьох транслункових фільтрів (\pm SD).

Висновок

Адгезія, міграція та інвазія клітин потребує інтегринів, таких як $\alpha\text{V}\beta 3$ та $\alpha\text{V}\beta 5$. GenO95 спромо-

жний функціонально блокувати інтегрини $\alpha\text{V}\beta 3$ та $\alpha\text{V}\beta 5$, що експресуються ендотеліальними та пухлинними клітинами. GenO95 спроможні блокувати міграцію та інвазію клітин, які стимульовані bFGF або сывороткою. Ці результати свідчать, що GenO95 є потужним інгібітором інгібіторів $\alpha\text{V}\beta 3$ та $\alpha\text{V}\beta 5$, що експресуються пухлинними та ендотеліальними клітинами.

Посилання

1. Taylor, L.D., C.E. Carmack, D. Huszar, K. M. Higgins, R. Mashayekh, G. Sequear, S.R. Schramm, C-C. Kuo, S.L. O'Donnell, R.M. Kay, C.S. Woodhouse, and N. Lonberg. 1993. Human immunoglobulin transgenes undergo rearrangement, somatic mutation and class switching in mice that lack endogenous IgM. *International Immunology* 6:579-591.
2. Lonberg, N., L.D. Taylor, F.A. Harding, M. Trounstine, K.M. Higgins, S.R. Schramm, C-C. Kuo, R. Mashayekh, K. Wymore, J.G. McCabe, D. Munoz-O'Regan, S.L. O'Donnell, E.S.G. Lapachet, T. Bengoechea, D.M. Fishwild, C.E. Carmack, R.M. Kay, and D. Huszar. 1994. Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications. *Nature* 368:856-859.
3. Neuberger, M. 1996. Generating high-avidity human Mabs in mice. *Nature Biotechnology* 14:826.
4. Fishwild, D. M., S. L. O'Donnell, T. Bengoechea, D. V. Hudson, F. Harding, S. L. Bernhard, D. Jones, R. M. Kay, K. M. Higgins, S. R. Schramm, and N. Lonberg. 1996. High-avidity human IgG monoclonal antibodies from a novel strain of minilocus transgenic mice. *Nature Biotechnology* 14:845-851.
5. Gastl, G., T. Hermann, M. Steurer, J. Zmija, E. Gunsilius, C. Unger, and A. Kraft. 1997. Angiogenesis as a Target for Tumor Treatment. *Oncology* 54:177-184.
6. Eliceiri, B.P., and D.A. Cheresh. 1999. The role of αV integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development. *The Journal of Clinical Investigation* 103:1227-1230.
7. Friedlander M., P.C. Brooks, R.W. Shaffer, C. M. Kincaid, J. A. Varner, and D.A. Cheresh. 1995. Definition of two angiogenic pathways by distinct αV integrins. *Science* 270:1500-1502.

Зрозуміло, що цей винахід може застосовуватися на практиці не так, як це описано у вищезгаданих описах та прикладах. Можливі численні модифікації та варіації даного винаходу в світлі вищевикладених даних а, отже, і в межах доданої заявки.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Giles-Komar, Jill; Heavner, George; Snyder, Linda; Trikha, Mohit
 <120> DUAL INTEGRIN ANTIBODIES, COMPOSITIONS, METHODS AND USES
 <130> CEN 249
 <160> 17
 <170> PatentIn Ver 2.0

 <210> 1
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 1
 Arg Tyr Thr Met His
 5

 <210> 2
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 2
 Val Ile Ser Phe Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys Gly
 1 5 10 15

 <210> 3
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 3
 Glu Ala Arg Gly Ser Tyr Ala Phe Asp Ile
 1 5 10

 <210> 4
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 4
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

 <210> 5
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 5
 Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
 1 5

 <210> 6
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 6

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
1 5

<210> 7
<211> 119
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 7

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Arg Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
20 25 30
Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Val Ile Ser Phe Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Glu Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Val Asn Ile Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Glu Ala Arg Gly Ser Tyr Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 8
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 8

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 Pro
85 90 95
Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys

100

105

<210> 9
 <211> 1048
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 9

Met Ala Phe Pro Pro Arg Arg Arg Leu Arg Leu Gly Pro Arg Gly Leu
 1 5 10 15

Pro Leu Leu Leu Ser Gly Leu Leu Leu Pro Leu Cys Arg Ala Phe Asn
 20 25 30

Leu Asp Val Asp Ser Pro Ala Glu Tyr Ser Gly Pro Glu Gly Ser Tyr
 35 40 45

Phe Gly Phe Ala Val Asp Phe Phe Val Pro Ser Ala Ser Ser Arg Met
 50 55 60

Phe Leu Leu Val Gly Ala Pro Lys Ala Asn Thr Thr Gln Pro Gly Ile
 65 70 75 80

Val Glu Gly Gly Gln Val Leu Lys Cys Asp Trp Ser Ser Thr Arg Arg
 85 90 95

Cys Gln Pro Ile Glu Phe Asp Ala Thr Gly Asn Arg Asp Tyr Ala Lys
 100 105 110

Asp Asp Pro Leu Glu Phe Lys Ser His Gln Trp Phe Gly Ala Ser Val
 115 120 125

Arg Ser Lys Gln Asp Lys Ile Leu Ala Cys Ala Pro Leu Tyr His Trp
 130 135 140

Arg Thr Glu Met Lys Gln Glu Arg Glu Pro Val Gly Thr Cys Phe Leu
 145 150 155 160

Gln Asp Gly Thr Lys Thr Val Glu Tyr Ala Pro Cys Arg Ser Gln Asp
 165 170 175

Ile Asp Ala Asp Gly Gln Gly Phe Cys Gln Gly Gly Phe Ser Ile Asp
 180 185 190

Phe Thr Lys Ala Asp Arg Val Leu Leu Gly Gly Pro Gly Ser Phe Tyr
 195 200 205

Trp Gln Gly Gln Leu Ile Ser Asp Gln Val Ala Glu Ile Val Ser Lys
 210 215 220

Tyr Asp Pro Asn Val Tyr Ser Ile Lys Tyr Asn Asn Gln Leu Ala Thr
 225 230 235 240

Arg Thr Ala Gln Ala Ile Phe Asp Asp Ser Tyr Leu Gly Tyr Ser Val
 245 250 255

Ala Val Gly Asp Phe Asn Gly Asp Gly Ile Asp Asp Phe Val Ser Gly
 260 265 270

Val Pro Arg Ala Ala Arg Thr Leu Gly Met Val Tyr Ile Tyr Asp Gly
 275 280 285
 Lys Asn Met Ser Ser Leu Tyr Asn Phe Thr Gly Glu Gln Met Ala Ala
 290 295 300
 Tyr Phe Gly Phe Ser Val Ala Ala Thr Asp Ile Asn Gly Asp Asp Tyr
 305 310 315 320
 Ala Asp Val Phe Ile Gly Ala Pro Leu Phe Met Asp Arg Gly Ser Asp
 325 330 335
 Gly Lys Leu Gln Glu Val Gly Gln Val Ser Val Ser Leu Gln Arg Ala
 340 345 350
 Ser Gly Asp Phe Gln Thr Thr Lys Leu Asn Gly Phe Glu Val Phe Ala
 355 360 365
 Arg Phe Gly Ser Ala Ile Ala Pro Leu Gly Asp Leu Asp Gln Asp Gly
 370 375 380
 Phe Asn Asp Ile Ala Ile Ala Ala Pro Tyr Gly Gly Glu Asp Lys Lys
 385 390 395 400
 Gly Ile Val Tyr Ile Phe Asn Gly Arg Ser Thr Gly Leu Asn Ala Val
 405 410 415
 Pro Ser Gln Ile Leu Glu Gly Gln Trp Ala Ala Arg Ser Met Pro Pro
 420 425 430
 Ser Phe Gly Tyr Ser Met Lys Gly Ala Thr Asp Ile Asp Lys Asn Gly
 435 440 445
 Tyr Pro Asp Leu Ile Val Gly Ala Phe Gly Val Asp Arg Ala Ile Leu
 450 455 460
 Tyr Arg Ala Arg Pro Val Ile Thr Val Asn Ala Gly Leu Glu Val Tyr
 465 470 475 480
 Pro Ser Ile Leu Asn Gln Asp Asn Lys Thr Cys Ser Leu Pro Gly Thr
 485 490 495
 Ala Leu Lys Val Ser Cys Phe Asn Val Arg Phe Cys Leu Lys Ala Asp
 500 505 510
 Gly Lys Gly Val Leu Pro Arg Lys Leu Asn Phe Gln Val Glu Leu Leu
 515 520 525
 Leu Asp Lys Leu Lys Gln Lys Gly Ala Ile Arg Arg Ala Leu Phe Leu
 530 535 540
 Tyr Ser Arg Ser Pro Ser His Ser Lys Asn Met Thr Ile Ser Arg Gly
 545 550 555 560
 Gly Leu Met Gln Cys Glu Glu Leu Ile Ala Tyr Leu Arg Asp Glu Ser
 565 570 575
 Glu Phe Arg Asp Lys Leu Thr Pro Ile Thr Ile Phe Met Glu Tyr Arg

97	83988	98
580	585	590
Leu Asp Tyr Arg Thr Ala Ala Asp Thr Thr Gly Leu Gln Pro Ile Leu		
595	600	605
Asn Gln Phe Thr Pro Ala Asn Ile Ser Arg Gln Ala His Ile Leu Leu		
610	615	620
Asp Cys Gly Glu Asp Asn Val Cys Lys Pro Lys Leu Glu Val Ser Val		
625	630	635
Asp Ser Asp Gln Lys Lys Ile Tyr Ile Gly Asp Asp Asn Pro Leu Thr		
	645	650
		655
Leu Ile Val Lys Ala Gln Asn Gln Gly Glu Gly Ala Tyr Glu Ala Glu		
	660	665
		670
Leu Ile Val Ser Ile Pro Leu Gln Ala Asp Phe Ile Gly Val Val Arg		
	675	680
		685
Asn Asn Glu Ala Leu Ala Arg Leu Ser Cys Ala Phe Lys Thr Glu Asn		
	690	695
		700
Gln Thr Arg Gln Val Val Cys Asp Leu Gly Asn Pro Met Lys Ala Gly		
705	710	715
		720
Thr Gln Leu Leu Ala Gly Leu Arg Phe Ser Val His Gln Gln Ser Glu		
	725	730
		735
Met Asp Thr Ser Val Lys Phe Asp Leu Gln Ile Gln Ser Ser Asn Leu		
	740	745
		750
Phe Asp Lys Val Ser Pro Val Val Ser His Lys Val Asp Leu Ala Val		
	755	760
		765
Leu Ala Ala Val Glu Ile Arg Gly Val Ser Ser Pro Asp His Ile Phe		
	770	775
		780
Leu Pro Ile Pro Asn Trp Glu His Lys Glu Asn Pro Glu Thr Glu Glu		
785	790	795
		800
Asp Val Gly Pro Val Val Gln His Ile Tyr Glu Leu Arg Asn Asn Gly		
	805	810
		815
Pro Ser Ser Phe Ser Lys Ala Met Leu His Leu Gln Trp Pro Tyr Lys		
	820	825
		830
Tyr Asn Asn Asn Thr Leu Leu Tyr Ile Leu His Tyr Asp Ile Asp Gly		
	835	840
		845
Pro Met Asn Cys Thr Ser Asp Met Glu Ile Asn Pro Leu Arg Ile Lys		
	850	855
		860
Ile Ser Ser Leu Gln Thr Thr Glu Lys Asn Asp Thr Val Ala Gly Gln		
865	870	875
		880
Gly Glu Arg Asp His Leu Ile Thr Lys Arg Asp Leu Ala Leu Ser Glu		
	885	890
		895

Gly Asp Ile His Thr Leu Gly Cys Gly Val Ala Gln Cys Leu Lys Ile
 900 905 910
 Val Cys Gln Val Gly Arg Leu Asp Arg Gly Lys Ser Ala Ile Leu Tyr
 915 920 925
 Val Lys Ser Leu Leu Trp Thr Glu Thr Phe Met Asn Lys Glu Asn Gln
 930 935 940
 Asn His Ser Tyr Ser Leu Lys Ser Ser Ala Ser Phe Asn Val Ile Glu
 945 950 955 960
 Phe Pro Tyr Lys Asn Leu Pro Ile Glu Asp Ile Thr Asn Ser Thr Leu
 965 970 975
 Val Thr Thr Asn Val Thr Trp Gly Ile Gln Pro Ala Pro Met Pro Val
 980 985 990
 Pro Val Trp Val Ile Ile Leu Ala Val Leu Ala Gly Leu Leu Leu Leu
 995 1000 1005
 Ala Val Leu Val Phe Val Met Tyr Arg Met Gly Phe Phe Lys Arg Val
 1010 1015 1020
 Arg Pro Pro Gln Glu Glu Gln Glu Arg Glu Gln Leu Gln Pro His Glu
 1025 1030 1035 1040
 Asn Gly Glu Gly Asn Ser Glu Thr
 1045

 <210> 10
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 10
 agatatacta tgcac 15

 <210> 11
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 11
 gttatatcat ttgatggaag caataaatac tacgtagact ccgtgaaggg c 51

 <210> 12
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 12
 gaggcccgagg gatcgtatgc ttttgatatc 30

 <210> 13
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 13
 ctctcctgca gggccagtc gagtggttagc agctacttag cc 33

 <210> 14

<211> 18

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 14

gatgcatcca acagggcc

18

<210> 15

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 15

cagcagcgta gcaactggcc t

21

<210> 16

<211> 788

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Met Arg Ala Arg Pro Arg Pro Arg Pro Leu Trp Ala Thr Val Leu Ala
1 5 10 15

Leu Gly Ala Leu Ala Gly Val Gly Val Gly Gly Pro Asn Ile Cys Thr
20 25 30

Thr Arg Gly Val Ser Ser Cys Gln Gln Cys Leu Ala Val Ser Pro Met
35 40 45

Cys Ala Trp Cys Ser Asp Glu Ala Leu Pro Leu Gly Ser Pro Arg Cys
50 55 60

Asp Leu Lys Glu Asn Leu Leu Lys Asp Asn Cys Ala Pro Glu Ser Ile
65 70 75 80

Glu Phe Pro Val Ser Glu Ala Arg Val Leu Glu Asp Arg Pro Leu Ser
85 90 95

Asp Lys Gly Ser Gly Asp Ser Ser Gln Val Thr Gln Val Ser Pro Gln
100 105 110

Arg Ile Ala Leu Arg Leu Arg Pro Asp Asp Ser Lys Asn Phe Ser Ile
115 120 125

Gln Val Arg Gln Val Glu Asp Tyr Pro Val Asp Ile Tyr Tyr Leu Met
130 135 140

Asp Leu Ser Tyr Ser Met Lys Asp Asp Leu Trp Ser Ile Gln Asn Leu
145 150 155 160

Gly Thr Lys Leu Ala Thr Gln Met Arg Lys Leu Thr Ser Asn Leu Arg
165 170 175

Ile Gly Phe Gly Ala Phe Val Asp Lys Pro Val Ser Pro Tyr Met Tyr
180 185 190

Ile Ser Pro Pro Glu Ala Leu Glu Asn Pro Cys Tyr Asp Met Lys Thr
195 200 205

Thr Cys Leu Pro Met Phe Gly Tyr Lys His Val Leu Thr Leu Thr Asp
 210 215 220
 Gln Val Thr Arg Phe Asn Glu Glu Val Lys Lys Gln Ser Val Ser Arg
 225 230 235 240
 Asn Arg Asp Ala Pro Glu Gly Gly Phe Asp Ala Ile Met Gln Ala Thr
 245 250 255
 Val Cys Asp Glu Lys Ile Gly Trp Arg Asn Asp Ala Ser His Leu Leu
 260 265 270
 Val Phe Thr Thr Asp Ala Lys Thr His Ile Ala Leu Asp Gly Arg Leu
 275 280 285
 Ala Gly Ile Val Gln Pro Asn Asp Gly Gln Cys His Val Gly Ser Asp
 290 295 300
 Asn His Tyr Ser Ala Ser Thr Thr Met Asp Tyr Pro Ser Leu Gly Leu
 305 310 315 320
 Met Thr Glu Lys Leu Ser Gln Lys Asn Ile Asn Leu Ile Phe Ala Val
 325 330 335
 Thr Glu Asn Val Val Asn Leu Tyr Gln Asn Tyr Ser Glu Leu Ile Pro
 340 345 350
 Gly Thr Thr Val Gly Val Leu Ser Met Asp Ser Ser Asn Val Leu Gln
 355 360 365
 Leu Ile Val Asp Ala Tyr Gly Lys Ile Arg Ser Lys Val Glu Leu Glu
 370 375 380
 Val Arg Asp Leu Pro Glu Glu Leu Ser Leu Ser Phe Asn Ala Thr Cys
 385 390 395 400
 Leu Asn Asn Glu Val Ile Pro Gly Leu Lys Ser Cys Met Gly Leu Lys
 405 410 415
 Ile Gly Asp Thr Val Ser Phe Ser Ile Glu Ala Lys Val Arg Gly Cys
 420 425 430
 Pro Gln Glu Lys Glu Lys Ser Phe Thr Ile Lys Pro Val Gly Phe Lys
 435 440 445
 Asp Ser Leu Ile Val Gln Val Thr Phe Asp Cys Asp Cys Ala Cys Gln
 450 455 460
 Ala Gln Ala Glu Pro Asn Ser His Arg Cys Asn Asn Gly Asn Gly Thr
 465 470 475 480
 Phe Glu Cys Gly Val Cys Arg Cys Gly Pro Gly Trp Leu Gly Ser Gln
 485 490 495
 Cys Glu Cys Ser Glu Glu Asp Tyr Arg Pro Ser Gln Gln Asp Glu Cys
 500 505 510
 Ser Pro Arg Glu Gly Gln Pro Val Cys Ser Gln Arg Gly Glu Cys Leu
 515 520 525

Cys Gly Gln Cys Val Cys His Ser Ser Asp Phe Gly Lys Ile Thr Gly
 530 535 540
 Lys Tyr Cys Glu Cys Asp Asp Phe Ser Cys Val Arg Tyr Lys Gly Glu
 545 550 555 560
 Met Cys Ser Gly His Gly Gln Cys Ser Cys Gly Asp Cys Leu Cys Asp
 565 570 575
 Ser Asp Trp Thr Gly Tyr Tyr Cys Asn Cys Thr Thr Arg Thr Asp Thr
 580 585 590
 Cys Met Ser Ser Asn Gly Leu Leu Cys Ser Gly Arg Gly Lys Cys Glu
 595 600 605
 Cys Gly Ser Cys Val Cys Ile Gln Pro Gly Ser Tyr Gly Asp Thr Cys
 610 615 620
 Glu Lys Cys Pro Thr Cys Pro Asp Ala Cys Thr Phe Lys Lys Glu Cys
 625 630 635 640
 Val Glu Cys Lys Lys Phe Asp Arg Glu Pro Tyr Met Thr Glu Asn Thr
 645 650 655
 Cys Asn Arg Tyr Cys Arg Asp Glu Ile Glu Ser Val Lys Glu Leu Lys
 660 665 670
 Asp Thr Gly Lys Asp Ala Val Asn Cys Thr Tyr Lys Asn Glu Asp Asp
 675 680 685
 Cys Val Val Arg Phe Gln Tyr Tyr Glu Asp Ser Ser Gly Lys Ser Ile
 690 695 700
 Leu Tyr Val Val Glu Glu Pro Glu Cys Pro Lys Gly Pro Asp Ile Leu
 705 710 715 720
 Val Val Leu Leu Ser Val Met Gly Ala Ile Leu Leu Ile Gly Leu Ala
 725 730 735
 Ala Leu Leu Ile Trp Lys Leu Leu Ile Thr Ile His Asp Arg Lys Glu
 740 745 750
 Phe Ala Lys Phe Glu Glu Glu Arg Ala Arg Ala Lys Trp Asp Thr Ala
 755 760 765
 Asn Asn Pro Leu Tyr Lys Glu Ala Thr Ser Thr Phe Thr Asn Ile Thr
 770 775 780
 Tyr Arg Gly Thr
 785
 <210> 17
 <211> 799
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 17

Met Pro Arg Ala Pro Ala Pro Leu Tyr Ala Cys Leu Leu Gly Leu Cys

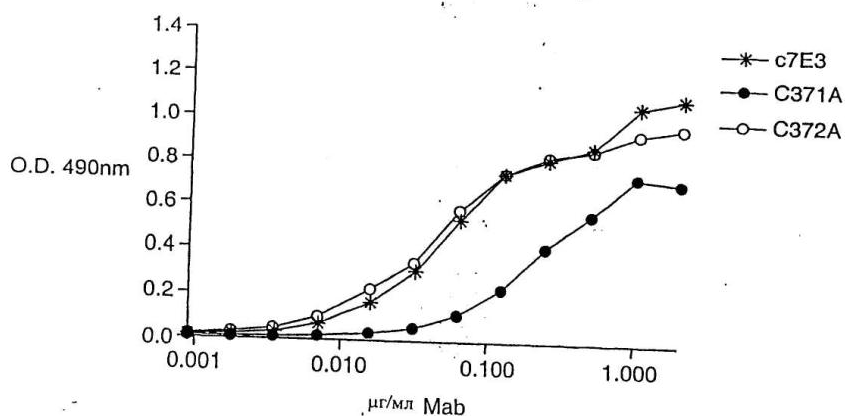
1	5	10	15
Ala Leu Leu Pro Arg Leu Ala Gly Leu Asn Ile Cys Thr Ser Gly Ser	20	25	30
Ala Thr Ser Cys Glu Glu Cys Leu Leu Ile His Pro Lys Cys Ala Trp	35	40	45
Cys Ser Lys Glu Asp Phe Gly Ser Pro Arg Ser Ile Thr Ser Arg Cys	50	55	60
Asp Leu Arg Ala Asn Leu Val Lys Asn Gly Cys Gly Gly Glu Ile Glu	65	70	75
Ser Pro Ala Ser Ser Phe His Val Leu Arg Ser Leu Pro Leu Ser Ser	85	90	95
Lys Gly Ser Gly Ser Ala Gly Trp Asp Val Ile Gln Met Thr Pro Gln	100	105	110
Glu Ile Ala Val Asn Leu Arg Pro Gly Asp Lys Thr Thr Phe Gln Leu	115	120	125
Gln Val Arg Gln Val Glu Asp Tyr Pro Val Asp Leu Tyr Tyr Leu Met	130	135	140
Asp Leu Ser Leu Ser Met Lys Asp Asp Leu Asp Asn Ile Arg Ser Leu	145	150	155
Gly Thr Lys Leu Ala Glu Glu Met Arg Lys Leu Thr Ser Asn Phe Arg	165	170	175
Leu Gly Phe Gly Ser Phe Val Asp Lys Asp Ile Ser Pro Phe Ser Tyr	180	185	190
Thr Ala Pro Arg Tyr Gln Thr Asn Pro Cys Ile Gly Tyr Lys Leu Phe	195	200	205
Pro Asn Cys Val Pro Ser Phe Gly Phe Arg His Leu Leu Pro Leu Thr	210	215	220
Asp Arg Val Asp Ser Phe Asn Glu Glu Val Arg Lys Gln Arg Val Ser	225	230	235
Arg Asn Arg Asp Ala Pro Glu Gly Gly Phe Asp Ala Val Leu Gln Ala	245	250	255
Ala Val Cys Lys Glu Lys Ile Gly Trp Arg Lys Asp Ala Leu His Leu	260	265	270
Leu Val Phe Thr Thr Asp Asp Val Pro His Ile Ala Leu Asp Gly Lys	275	280	285
Leu Gly Gly Leu Val Gln Pro His Asp Gly Gln Cys His Leu Asn Glu	290	295	300
Ala Asn Glu Tyr Thr Ala Ser Asn Gln Met Asp Tyr Pro Ser Leu Ala	305	310	315
			320

Leu Leu Gly Glu Lys Leu Ala Glu Asn Asn Ile Asn Leu Ile Phe Ala
 325 330 335
 Val Thr Lys Asn His Tyr Met Leu Tyr Lys Asn Phe Thr Ala Leu Ile
 340 345 350
 Pro Gly Thr Thr Val Glu Ile Leu Asp Gly Asp Ser Lys Asn Ile Ile
 355 360 365
 Gln Leu Ile Ile Asn Ala Tyr Asn Ser Ile Arg Ser Lys Val Glu Leu
 370 375 380
 Ser Val Trp Asp Gln Pro Glu Asp Leu Asn Leu Phe Phe Thr Ala Thr
 385 390 395 400
 Cys Gln Asp Gly Val Ser Tyr Pro Gly Gln Arg Lys Cys Glu Gly Leu
 405 410 415
 Lys Ile Gly Asp Thr Ala Ser Phe Glu Val Ser Leu Glu Ala Arg Ser
 420 425 430
 Cys Pro Ser Arg His Thr Glu His Val Phe Ala Leu Arg Pro Val Gly
 435 440 445
 Phe Arg Asp Ser Leu Glu Val Gly Val Thr Tyr Asn Cys Thr Cys Gly
 450 455 460
 Cys Ser Val Gly Leu Glu Pro Asn Ser Ala Arg Cys Asn Gly Ser Gly
 465 470 475 480
 Thr Tyr Val Cys Gly Leu Cys Glu Cys Ser Pro Gly Tyr Leu Gly Thr
 485 490 495
 Arg Cys Glu Cys Gln Asp Gly Glu Asn Gln Ser Val Tyr Gln Asn Leu
 500 505 510
 Cys Arg Glu Ala Glu Gly Lys Pro Leu Cys Ser Gly Arg Gly Asp Cys
 515 520 525
 Ser Cys Asn Gln Cys Ser Cys Phe Glu Ser Glu Phe Gly Lys Ile Tyr
 530 535 540
 Gly Pro Phe Cys Glu Cys Asp Asn Phe Ser Cys Ala Arg Asn Lys Gly
 545 550 555 560
 Val Leu Cys Ser Gly His Gly Glu Cys His Cys Gly Glu Cys Lys Cys
 565 570 575
 His Ala Gly Tyr Ile Gly Asp Asn Cys Asn Cys Ser Thr Asp Ile Ser
 580 585 590
 Thr Cys Arg Gly Arg Asp Gly Gln Ile Cys Ser Glu Arg Gly His Cys
 595 600 605
 Leu Cys Gly Gln Cys Gln Cys Thr Glu Pro Gly Ala Phe Gly Glu Met
 610 615 620
 Cys Glu Lys Cys Pro Thr Cys Pro Asp Ala Cys Ser Thr Lys Arg Asp
 625 630 635 640

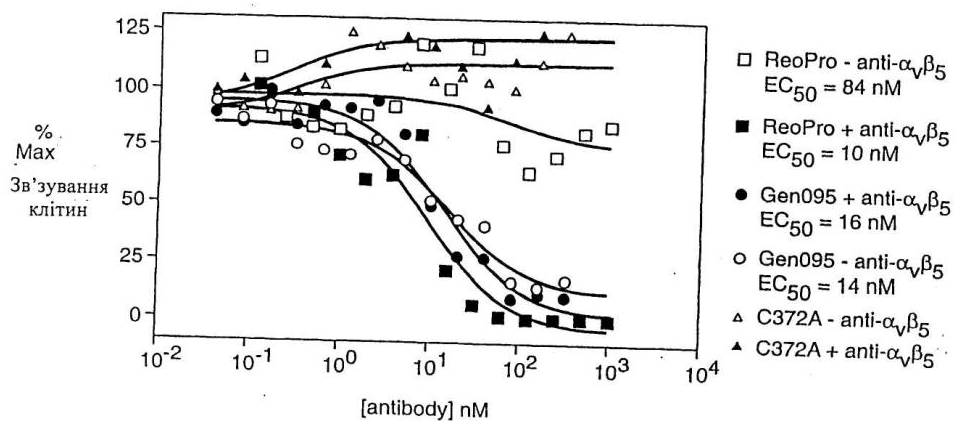
Cys Val Glu Cys Pro Leu Leu His Ser Gly Lys Pro Asp Asn Gln Thr
 645 650 655
 Cys His Ser Leu Cys Arg Asp Glu Val Ile Thr Trp Val Asp Thr Ile
 660 665 670
 Val Lys Asp Asp Gln Glu Ala Val Leu Cys Phe Tyr Lys Thr Ala Lys
 675 680 685
 Asp Cys Val Met Met Phe Thr Tyr Val Glu Leu Pro Ser Gly Lys Ser
 690 695 700
 Asn Leu Thr Val Leu Arg Glu Pro Glu Cys Gly Asn Thr Pro Asn Ala
 705 710 715 720
 Met Thr Ile Leu Leu Ala Val Val Gly Ser Ile Leu Leu Val Gly Leu
 725 730 735
 Ala Leu Leu Ala Ile Trp Lys Leu Leu Val Thr Ile His Asp Arg Arg
 740 745 750
 Glu Phe Ala Lys Phe Gln Ser Glu Arg Ser Arg Ala Arg Tyr Glu Met
 755 760 765
 Ala Ser Asn Pro Leu Tyr Arg Lys Pro Ile Ser Thr His Thr Val Asp
 770 775 780
 Phe Thr Phe Asn Lys Phe Asn Lys Ser Tyr Asn Gly Thr Val Asp
 785 790 795

ФІГ. 1

Зв'язування Mab GenPharm з $\alpha V\beta 3$

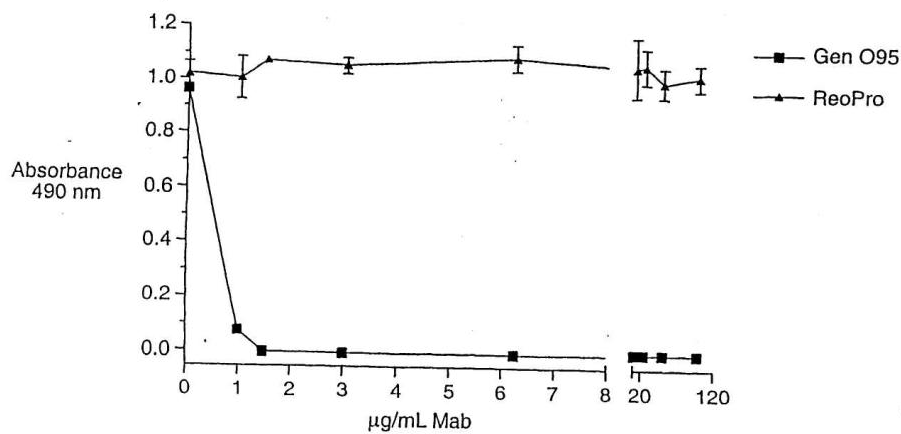


ФІГ. 2



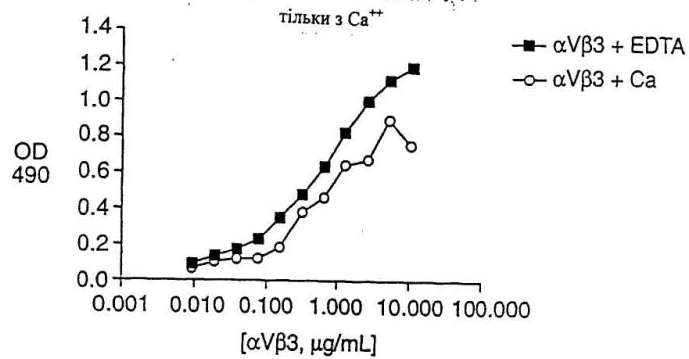
ФІГ. 3

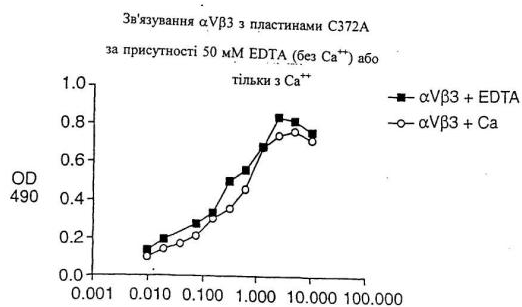
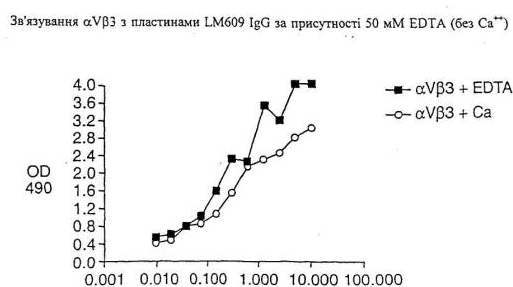
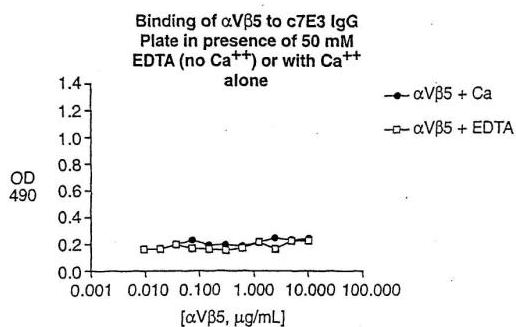
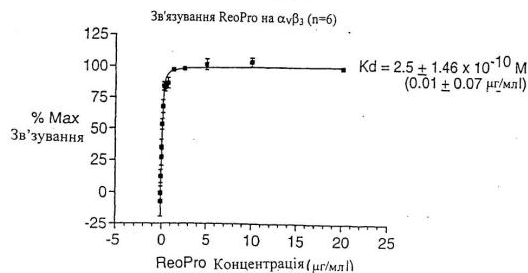
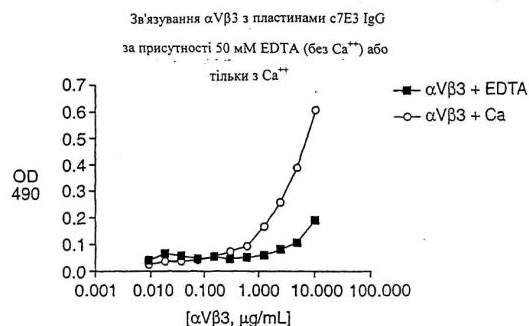
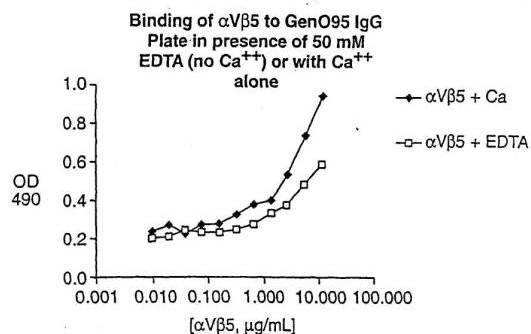
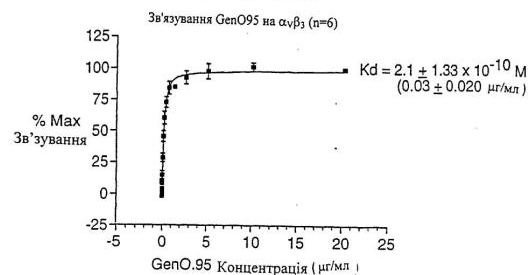
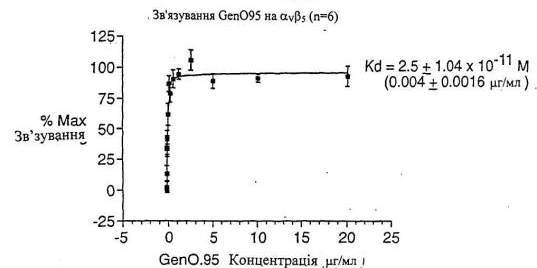
Адгезія клітини карциноми грудей людини
MDAMB435L2 до вібронектину

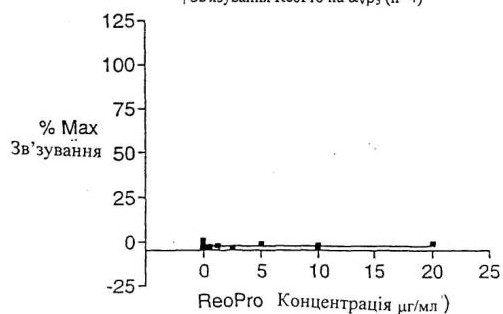


ФІГ. 4А

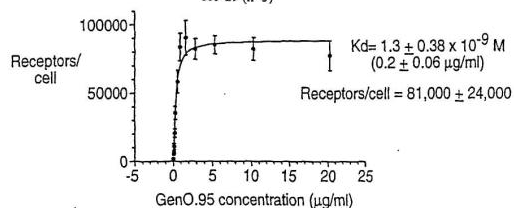
Зв'язування $\alpha V\beta_3$ з пластинами GenO95
за присутності 50 мМ EDTA (без Ca^{++}) або
тільки з Ca^{++}



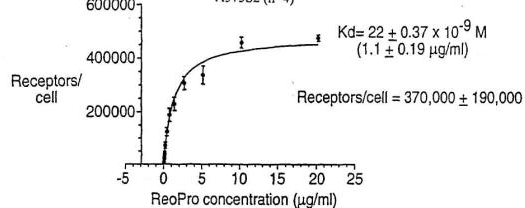
ФІГ. 4В**ФІГ. 4D****ФІГ. 4G****ФІГ. 5В****ФІГ. 4С****ФІГ. 4Е****ФІГ. 5А****ФІГ. 6А**

ФІГ. 6BЗв'язування ReoPro на $\alpha_v\beta_3$ (n=4)**ФІГ. 7B**

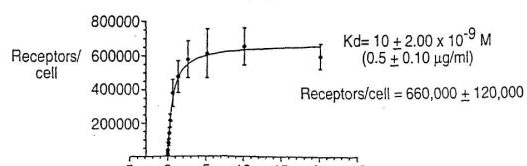
Зв'язування GenO95 з клітинами HT-29 (n=5)

**ФІГ. 8A**

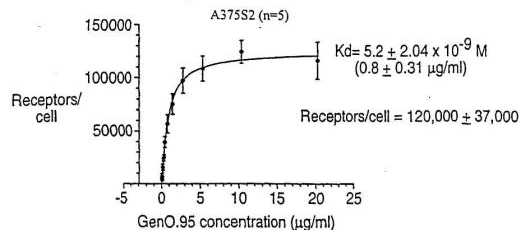
Зв'язування ReoPro з клітинами A375S2 (n=4)

**ФІГ. 8C**

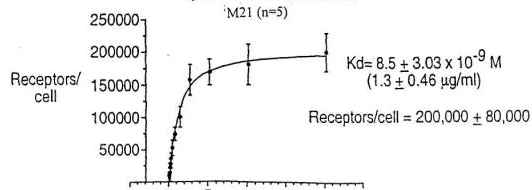
Зв'язування ReoPro з клітинами M21 (n=4)

**ФІГ. 7A**

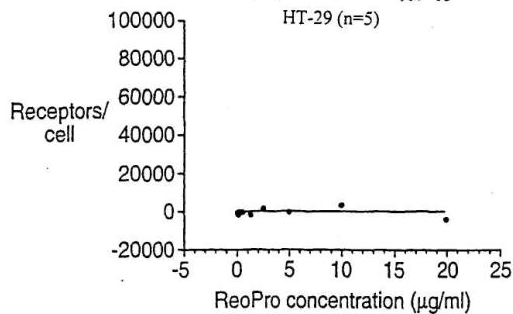
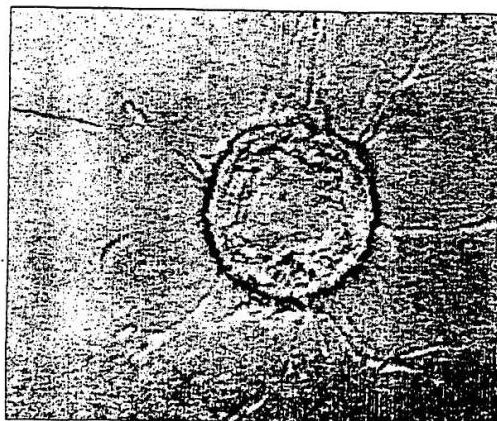
Зв'язування GenO95 з клітинами A375S2 (n=5)

**ФІГ. 7C**

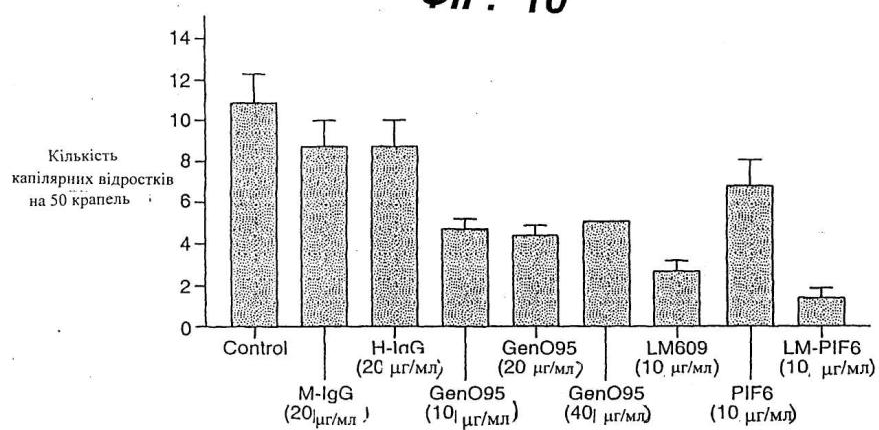
Зв'язування GenO95 з клітинами M21 (n=5)

**ФІГ. 8B**

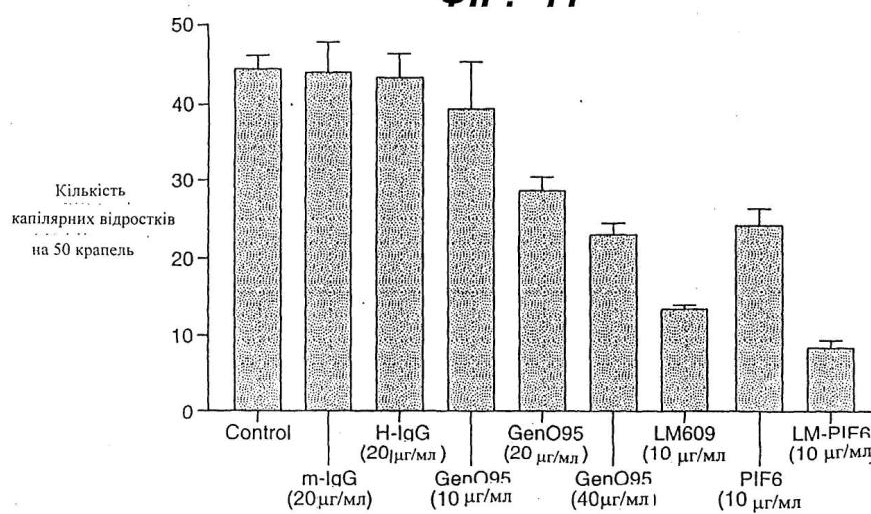
Зв'язування ReoPro з клітинами HT-29 (n=5)

**ФІГ. 9**

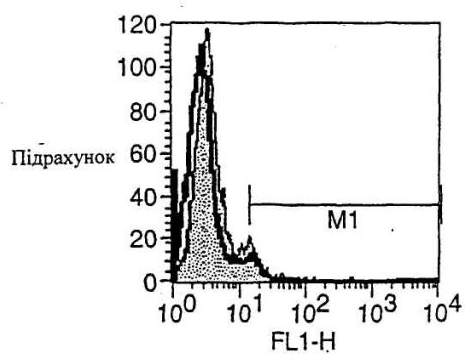
ФІГ. 10



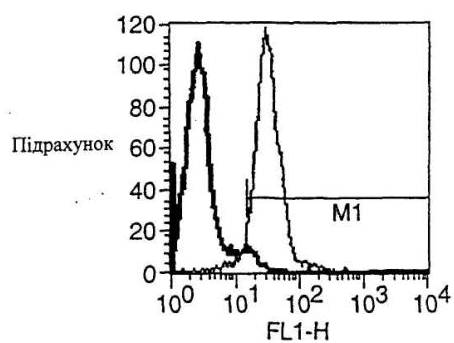
ФІГ. 11

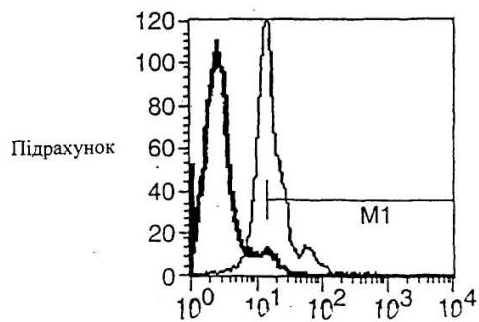
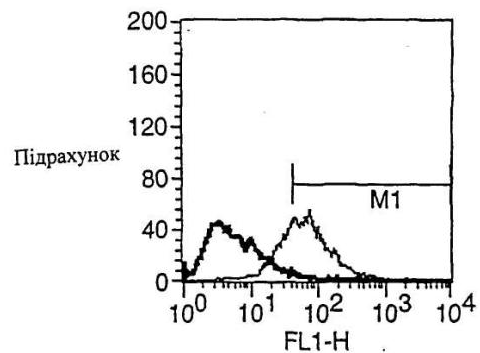
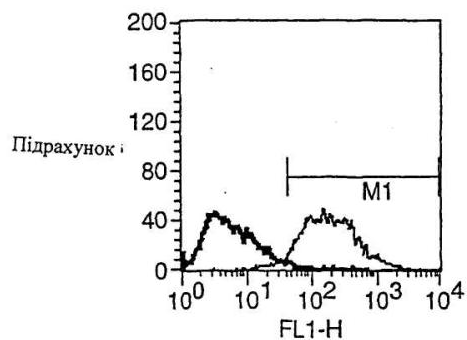
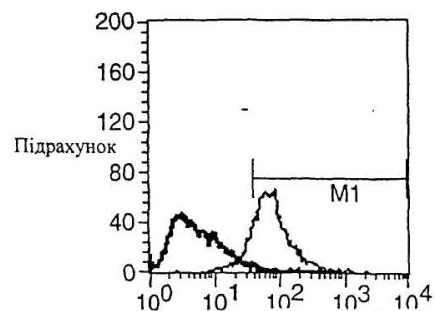
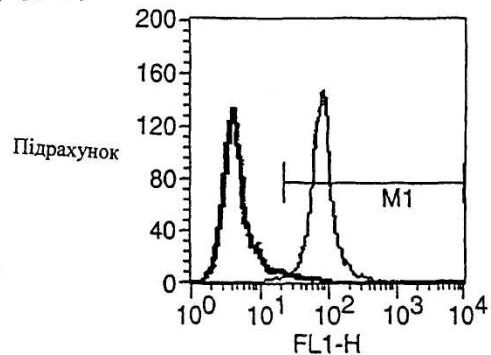
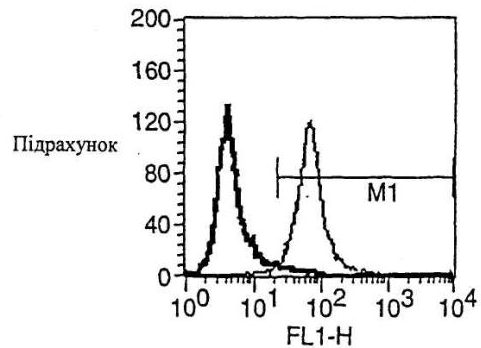
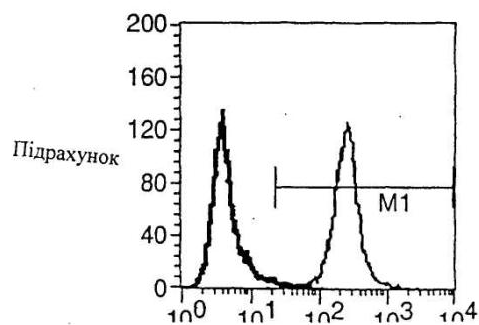


ФІГ. 12A

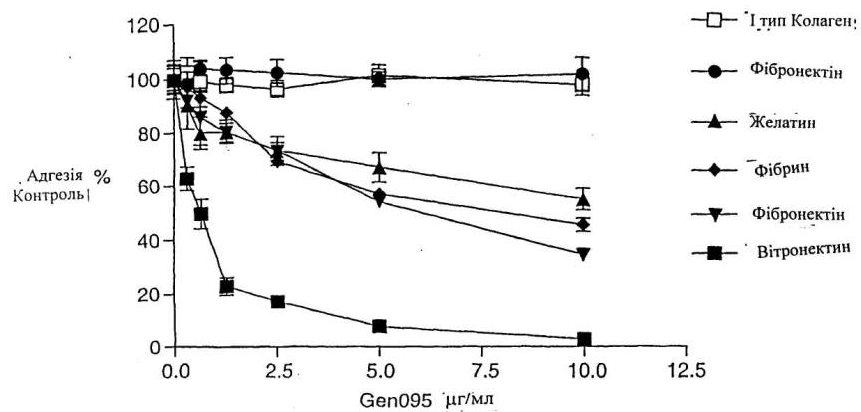


ФІГ. 12B

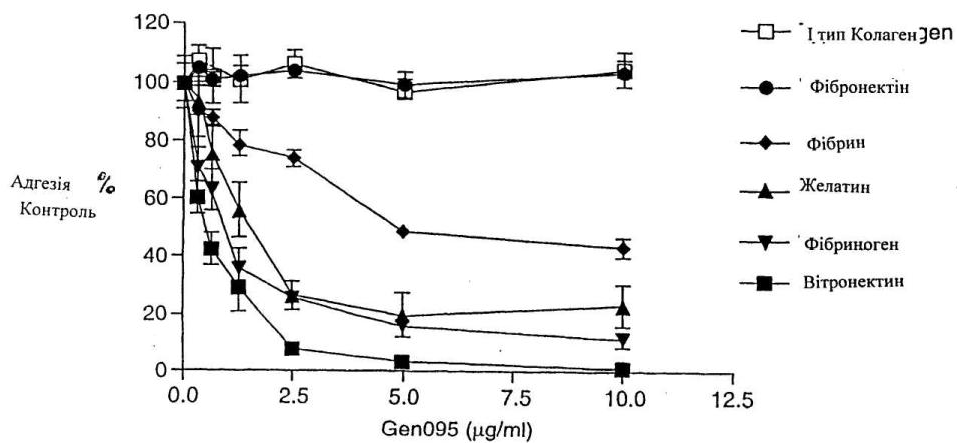


ФІГ. 12C**ФІГ. 12D****ФІГ. 12E****ФІГ. 12F****ФІГ. 12G****ФІГ. 12H****ФІГ. 12I**

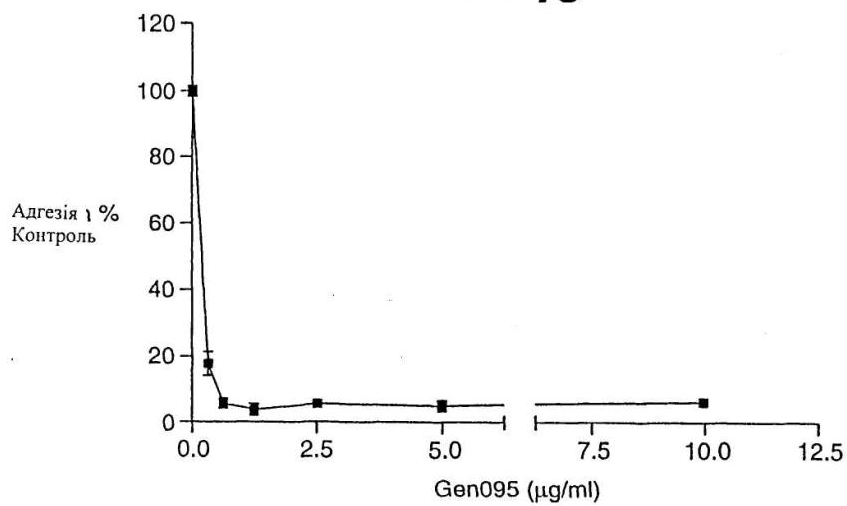
ФІГ. 13



ФІГ. 14



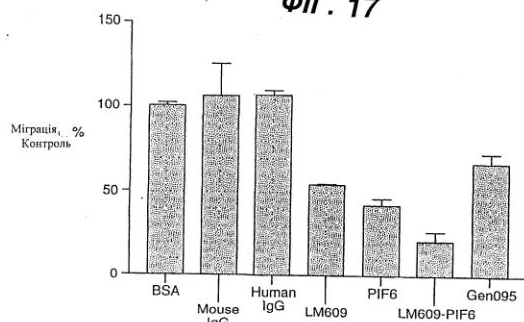
ФІГ. 15



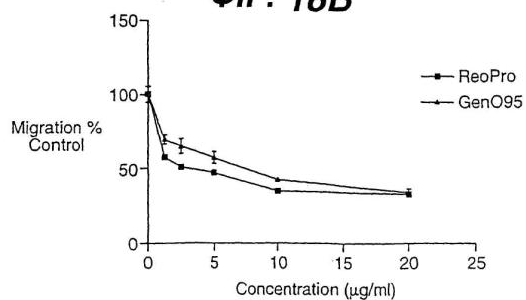
ФІГ. 16A ФІГ. 16B ФІГ. 16C



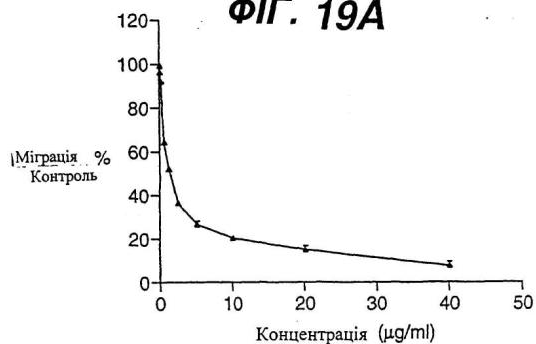
ФІГ. 17



ФІГ. 18B



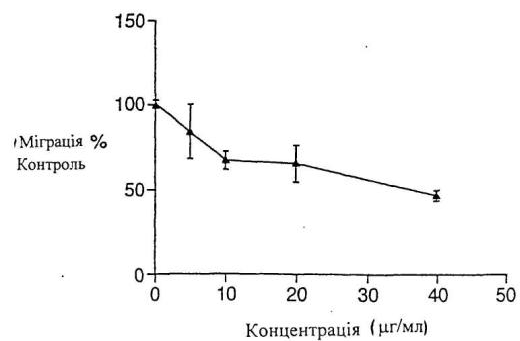
ФІГ. 19A



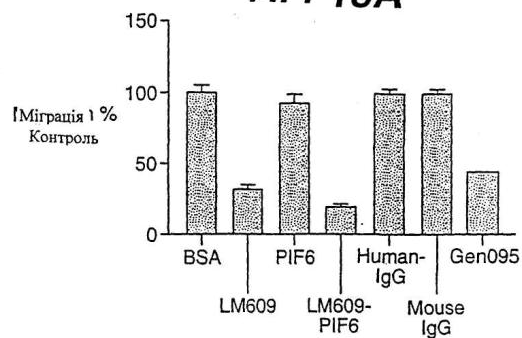
ФІГ. 19C ФІГ. 19D ФІГ. 19E



ФІГ. 16D



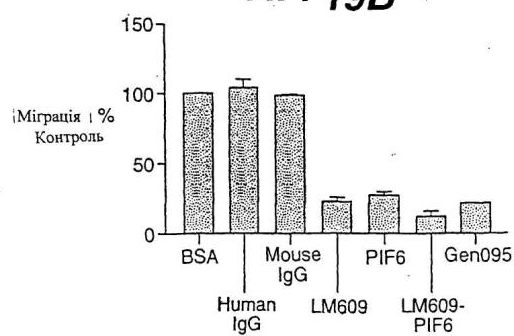
ФІГ. 18A



ФІГ. 18C ФІГ. 18D ФІГ. 18E



ФІГ. 19B



ФІГ. 20B

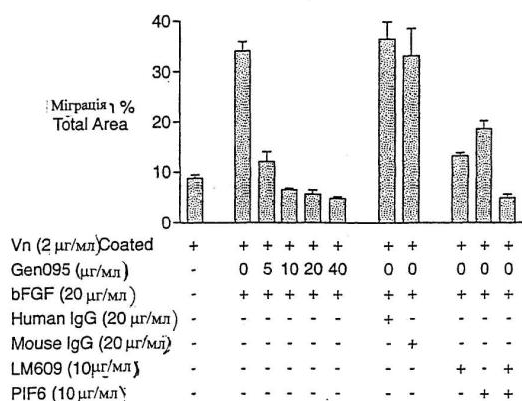
ФІГ. 20D



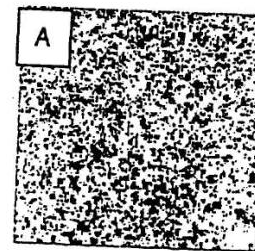
ФІГ. 20A

ФІГ. 20C

ФІГ. 20E



ФІГ. 21A



ФІГ. 21B

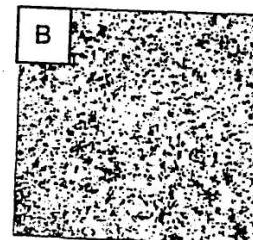


FIG. 21C

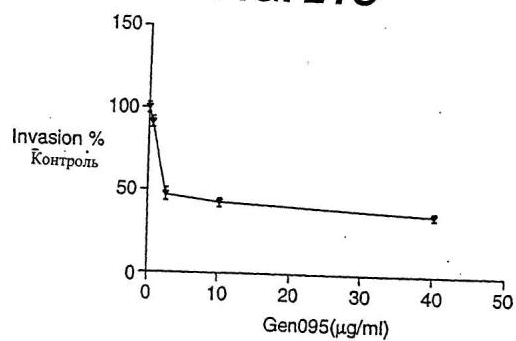


FIG. 21D

