

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ****(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ**(21)(22) Заявка: **2007116980/15, 28.09.2005**(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
28.09.2005

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
05.10.2004 US 60/616,104(43) Дата публикации заявки: **20.11.2008** Бюл. № 32(45) Опубликовано: **20.02.2011** Бюл. № 5(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: **RU 2170256 C2, 10.07.20001. WO 00747718,**
14.12.2000. WO 0222212, 21.03.2002. WO
0067796, 16.11.2000. LAMPRECHT P et al.
"Wegener's granulomatosis". Herz. 2004 Feb;
29(1):47-56 реферат. LAMPRECHT P, et al.
Rituximab induces remission in refractory HCV
associated cryoglobulinaemic vasculitis. Ann
Rheum Dis. 2003 Dec; 62(12):1230-3. PMID:
14644867 [PubMed - indexed for MEDLINE].(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: **07.05.2007**(86) Заявка РСТ:
US 2005/034647 (28.09.2005)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2006/041680 (20.04.2006)

Адрес для переписки:

129090, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры", пат.пов. Е.Е.Назиной

(72) Автор(ы):

БРУНЕТТА Пол Дж. (US)

(73) Патентообладатель(и):

ДЖЕНЕНТЕК, ИНК. (US)**(54) СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ ВАСКУЛИТА**

(57) Реферат:

Настоящая группа изобретений относится к медицине, в частности к терапии и иммунологии, и касается лечения васкулита, обусловленного антинейтрофильными цитоплазматическими антителами (ANCA-ассоциированного васкулита). Для этого вводят CD20-антитело в дозе 400-1300 мг в качестве монотерапии или в

дополнение к терапии стероидами и иммунодепрессантами. CD20-антитело вводят от одного до трех раз в течение месяца с последующим повторным введением в стадии полной или частичной ремиссии. Такой режим введения антитела обеспечивает эффективное лечение и уменьшение побочных эффектов за счет снижения дозы или полной отмены

стероидов и иммунодепрессантов. 3 н. и 114 з.п.

ф-лы, 5 табл., 9 ил.

R U 2 4 1 1 9 5 6 C 2

R U 2 4 1 1 9 5 6 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.

A61K 39/395 (2006.01)**A61P 37/00** (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2007116980/15, 28.09.2005**(24) Effective date for property rights:
28.09.2005

Priority:

(30) Priority:
05.10.2004 US 60/616,104(43) Application published: **20.11.2008 Bull. 32**(45) Date of publication: **20.02.2011 Bull. 5**(85) Commencement of national phase: **07.05.2007**(86) PCT application:
US 2005/034647 (28.09.2005)(87) PCT publication:
WO 2006/041680 (20.04.2006)

Mail address:

**129090, Moskva, ul. B.Spaskaja, 25, str.3, OOO
"Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery",
pat.pov. E.E.Nazinoj**

(72) Inventor(s):

BRUNETTA Pol Dzh. (US)

(73) Proprietor(s):

DZhENENTEK, INK. (US)(54) **METHOD OF TREATING VASCULITIS**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: claimed group of inventions relates to medicine, in particular to therapy and immunology, and deals with treatment of vasculitis, induced by antineutrophilic cytoplasmatic antibodies (ANCA-associated vasculitis). For this purpose CD20-antibody is introduced in dose 400-1300 mg as monotherapy or in addition to therapy with steroids

and immunosuppressants. CD20-antibody is introduced from one to three times during a month with further repeated introduction at stage of complete or partial remission.

EFFECT: mode of antibody introduction ensures efficient treatment and reduction of side effects due to reduction of dose or complete withdrawal of steroids and immunosuppressants.

117 cl, 8 ex, 4 tbl, 12 dwg

Родственные заявки

Данная заявка является непредварительной заявкой, поданной согласно 37 CFR 1.53(b)(1), по которой испрашивается приоритет согласно 35 USC 119(e) предварительной заявки с номером 60/616104, поданной 5 октября 2004 года, содержание которой включено здесь в качестве ссылки.

Область изобретения

Данное изобретение относится к способам лечения ассоциированного с антинейтрофильными цитоплазматическими антителами (ANCA) васкулита у индивидуума и к наборам с инструкциями для таких применений.

Уровень техники

Васкулит

Аутоиммунные заболевания, такие как ревматоидный артрит, рассеянный склероз, васкулит и обыкновенная системная красная волчанка, среди прочих, остаются клинически важными заболеваниями человека. Как предполагает это название, аутоиммунные заболевания проявляют их разрушающее действие через собственную иммунную систему тела. Хотя патологические механизмы среди отдельных типов аутоиммунных заболеваний различаются, один общий механизм включает в себя связывание определенных присутствующих антител (называемых здесь самореактивными антителами или аутоантителами).

Васкулит определяется как воспаление стенки кровеносного сосуда и является патологической основой разнообразной группы индивидуальных патологических состояний. Ассоциированный с антинейтрофильными цитоплазматическими антителами (ANCA) васкулит, который является обычным первичным системным васкулитом, включает микроскопическую полиангиопатию, гранулематоз Вегенера, синдром Churg-Strauss, почечно-ограниченный васкулит (идиопатический некротизирующий серповидный гломерулонефрит) (Falk et al. N. Engl. J. Med., 318: 1651-1657 (1988)) и некоторые типы индуцированного лекарственными средствами васкулита. Jennette et al. Arthritis Rheum 37:187-92 (1994); Jennette and Falk, N. Engl. J. Med. 337:1512-1523 (1997). Вышеупомянутые заболевания поражают людей всех возрастов, но являются наиболее частыми у пожилых людей 50-60 лет, и они поражают в равной степени мужчин и женщин. Pettersson et al, Clin. Nephrol., 43: 141-149 (1995); Falk et al., Ann. Intern. Med. 113: 656-663 (1990).

ANCA являются специфическими антителами в отношении антигенов в цитоплазматических гранулах нейтрофилов и лизосомах моноцитов, впервые сообщенными в 1982 году. Niles et al., Arch. Intern. Med., 156:440-445 (1996). ANCA первоначально детектировали непрямой иммунофлуоресценцией на фиксированных этанолом нейтрофилах. Wilk, "Delineation of a standard procedure for indirect immunofluorescence detection of ANCA" APMIS Suppl. 6: 12-13 (1989). Были известны по меньшей мере три различных распределения флуоресценции: цитоплазматическое/классическое распределение (cANCA) с акцентированием интенсивности флуоресценции в зоне с ядерными долями, окооядерное распределение (pANCA) и более диффузное цитоплазматическое распределение окрашивания (атипичное ANCA). Приблизительно 90% сывороток, которые продуцируют распределение cANCA, реагируют с протеиназой 3 (PR3), сериновой протеазой из азурофильных гранул миелоидных клеток. Jennette and Falk, N. Engl. J. Med., supra. У пациентов с первичным системным васкулитом, преимущественно поражающим кровеносные сосуды среднего и малого размера, приблизительно 75% сывороток, продуцирующих окооядерное распределение (pANCA), реагируют с

миелопероксидазой (МРО), миелоидным лизосомным ферментом. Cohen Tervaert et al., *Am. J. Med.* 91:59-66 (1991). У ANCA-положительных пациентов с другими не-
 васкулитными заболеваниями часто определяют антигенные специфические
 признаки. Диагностический потенциал PR3-ANCA и МРО-ANCA достаточно хорошо
 установлен в настоящее время. У пациента с признаками и симптомами
 васкулита ANCA со специфичностью в отношении PR3 (PR3-ANCA) диагностируется
 гранулематоз Вегенера, в то время как ANCA со специфичностью в отношении
 МРО (МРО-ANCA) является высокочувствительным в отношении микроскопической
 полиангиопатии, идиопатического некротизирующего серповидного
 гломерулонефрита или активного синдрома Churg-Strauss. Cohen Tervaert et al.,
Sarcoidosis Vasc. Diffuse Lung Dis. 13: 241-245 (1996). См. также Xiao et al., *J. Clin.*
Invest., 110: 955-963 (2002), которые описывают модель животного, которая в
 достаточной степени подтверждает прямую патогенную роль ANCA-IgG в
 гломерулонефрите и васкулите человека, и статью Pora et al., *J. Allergy Clin.*
Immunol., 103: 885-894 (1999), показывающую, что в гранулематозе Вегенера
 активация В-клеток связана с активным заболеванием, тогда как активация Т-клеток
 сохраняется во время ремиссии этого заболевания, что свидетельствует о внутреннем
 нарушении иммунной системы при этом заболевании. См. также статью Cupps et al.,
J. Immunol., 128: 2453-2457 (1982), касающуюся роли циклофосфида в супрессии
 функции В-лимфоцитов человека.

В спектре первичных васкулитных синдромов ANCA-связанные синдромы
 образуют отдельную группу с перекрывающимися признаками. Большинство
 пациентов с васкулитом имеют продромальное подобное гриппу начало, состоящее
 из недомогания, миалгий, артралгий, лихорадки и потери массы. Это подобное
 гриппу начало наблюдается в пределах дней - недель перед наступлением явного
 васкулитного или нефритного заболевания. Гранулематоз Вегенера отличается от
 других заболеваний присутствием некротизирующего гранулематозного воспаления
 верхних и нижних дыхательных путей, которое обычно сопровождается системным
 некротизирующим васкулитом малых сосудов и гломерулонефритом.
 Синдром Churg-Strauss отличается присутствием в анамнезе астмы, аллергического
 ринита, системной эозинофилии, наряду с системным васкулитом с
 гломерулонефритом или без гломерулонефрита. Микроскопическая полиангиопатия
 характеризуется некротизирующим и/или серповидным гломерулонефритом и
 мультисистемным васкулитом, в том числе малых сосудов. Микроскопическая
 полиангиопатия имеет многие общие признаки с гранулематозом Вегенера и
 синдромом Churg-Strauss, но не обнаруживает некротизирующего гранулематозного
 воспаления дыхательных путей и астмы. Jennette et al., *Arthritis Rheum.*, supra. В
 идиопатическом некротизирующем и/или серповидном гломерулонефрите
 васкулитный процесс ограничивается почками. Поскольку лечение пациентов с
 микроскопической полиангиопатией или гранулематозом Вегенера является по
 существу одинаковым, в случае большого повреждения органа необходимо
 различить эти тесно связанные варианты ANCA-связанного васкулита перед началом
 лечения. Jennette et al., *Arthritis Rheum.*, supra.

Прежде чем лечение стало доступным, пациенты с генерализованным
 гранулематозом Вегенера имели средний коэффициент выживаемости пять месяцев. В
 начале 1970-х годов Fauci и Wolff ввели схему, комбинирующую ежедневную
 циклофосфамидную терапию, предоставляемую в течение одного года после
 достижения стадии ремиссии, с терапией преднизолом, начинающейся с дозы 1 мг на

килограмм массы тела в день и постепенно уменьшающейся до схемы введения через день. Было обнаружено, что это лечение репродуктивно индуцирует ремиссию у 80-100 процентов пациентов и может приводить к значительному продлению жизни.

Действительно, пролонгированная иммуносупрессивная терапия (более продолжительная чем 1 год) циклофосфамидом и стероидами является эффективной в индукции ремиссии заболевания и предотвращении ранних рецидивов в большинстве васкулитных нарушений. Balow et al., "Vasculitic disease of the kidney, polyarteritis, Wegener's granulomatosis, necrotizing and crescentic glomerulonephritis, and other disorders." In: Schrier and Gottschalk (eds): Diseases of the kidney, 5th edition, (Little, Brown and Company, Boston, 1993), p.2095-2117; Jayne et al., N. Engl. J. Med., 349: 36-44 (2003); Gaskin et al, "Systemic vasculitis" In: Cameon et al. (eds): Oxford textbook of clinical nephrology. (Oxford University Press, Oxford, 1992), p.612-636; Fauci et al, Ann. Intern. Med. 89: 660-676 (1978); Fauci et al, Ann. Intern. Med., 98: 76-85 (1983); Hoffman et al, Ann. Int. Med., 116: 488-498 (1992); and Andrassy et al, Clin. Nephrol, 35: 139-147 (1991).

Однако при постепенном уменьшении и прекращении терапии обычными являются рецидивы. В одном исследовании, в котором гранулематоз Вегенера прослеживали в среднем в течение восьми лет, рецидив имел место у 50 процентов пациентов. Кроме того, непрерывное использование циклофосфамида для поддержания ремиссии не рекомендуется, так как эта программа лечения связана с тяжелыми и вероятно летальными побочными эффектами, такими как появление условно-патогенных инфекций и рака. Например, повторяющиеся курсы циклофосфамида связаны с супрессией костного мозга, инфекцией, циститом, бесплодием, миелодисплазией и переходно-клеточной карциномой мочевого пузыря. В некоторых случаях такие токсичные действия мешают дальнейшему применению циклофосфамида. Stillwell et al., Arthritis Rheum., 31: 465-470 (1988); Radis et al., Arthritis Rheum. 38: 1120-1127 (1995). Таким образом, циклофосфамид снижают или прекращают и заменяют азатиоприном, как только достигается ремиссия, для предотвращения побочных эффектов, эта линия проведения терапии была испытана в строгом многоцентровом испытании, и было показано, что она является одинаковым образом эффективной в последующем наблюдении в течение 18 месяцев. Gaskin et al., supra, 1992; Jayne, Rheumatology 39: 585-595 (2000). Азатиоприн считается менее эффективным в индукции ремиссии, чем циклофосфамид, но его долгосрочная токсичность является гораздо меньшей. Bouroncle et al., Am. J. Med., 42: 314-318 (1967); Norton et al., Arch. Intern. Med., 121: 554-560 (1968).

Другие альтернативные схемы поддерживающей терапии включают в себя метотрексат (de Groot et al., Arthritis Rheum., 39: 2052-2061 (1996)), циклоспорин А (Haubitz et al., Nephrol. Dial. Transplant, 13: 2074-2076 (1998)), микофенолят (Nowack et al., J. Am. Soc. Nephrol., 10: 1965-1971 (1999)) или триметопримсульфаметоксазол (Stegeman et al., N. Engl. J. Med., 335: 16-20 (1996)). См. также Sanders, et al., N. Engl. J. Med., 349: 2072-2073 (2003). Однако, поскольку в ANCA-ассоциированном васкулите часто наблюдаются рецидивы, лечение в таких случаях должно быть интенсифицировано или установлено заново. Hoffman et al, supra; Gordon et al, Q.J. Med., 86: 779-789 (1993); Nachman et al, J. Am. Soc. Nephrol, 7: 33-39 (1996); Guillevin et al, Medicine 78: 26-37 (1999); Reinhold-Keller et al., Arthritis. Rheum. 43: 1021-1032 (2000); Langford, New Eng. J. Med., 349: 3-4 (July 2003).

Блокада фактора некроза опухолей альфа (TNF- α) инфликсимабом является потенциальной терапией для ANCA-ассоциированного васкулита как в качестве начальной терапии, так и в преодолении трудноизлечимого заболевания.

Инфликсимаб был эффективным в индукции ремиссии у 88% пациентов с ANCA-ассоциированным васкулитом и позволял уменьшать дозу стероида. Booth et al., J. Am. Soc. Nephrol., 15: 717-721 (2004). Кроме того, Stone et al., Arthritis and Rheumatism, 44: 1149-1154 (2001) описали, что ингибитор TNF-альфа этанерцепт (ENBREL®), вводимый по 25 мг подкожно два раза в неделю, в комбинации со стандартным лечением гранулематоза Вегенера, хорошо переносился пациентами с небольшим количеством побочных эффектов, но в промежутках было обычным активное заболевание (иногда тяжелое).

Пациенты с синдромом Churg-Strauss обычно отвечали на терапию только кортикостероидами в высоких дозах, хотя в некоторых случаях может требоваться добавление цитотоксических лекарственных средств. Jayne and Rasmussen, Mayo Clin. Proc. 72: 737-47 (1997). Сопутствующие патологические состояния, которые ускоряют повреждение сосудов, например гипертензия, диабет, гиперхолестеринемия, и курение должны контролироваться должным образом.

В индуцированном лекарственным средством васкулите приведший к васкулиту агент должен быть отменен. Антигистаминовые препараты и нестероидные противовоспалительные лекарственные средства помогают смягчать кожный дискомфорт и уменьшать ассоциированные артралгии и миалгии. Тяжелое кожное заболевание может быть основанием для пероральной терапии кортикостероидами. Jennette et al., Arthritis Rheum., supra.

Персистенция или повторное появление ANCA является фактором риска для развития рецидива активности заболевания, что позволяет предположить патофизиологическую роль этих аутоантител in vivo. Stegeman et al., Ann. Intern. Med., 120: 12-17 (1994); De'Oliviera et al., Am. J. Kidney Dis., 25: 380-389 (1995); Jayne et al., Q. J. Med., 88:127-133 (1995). Рецидивам гранулематоза Вегенера часто предшествуют повышения титра сANCA, как детектировано непрямой иммунофлуоресценцией (Cohen Tervaert et al., Arch. Intern. Med., 149: 2461-2465 (1989)), они и могут предотвращаться обработкой иммуносупрессорами на основе повышений сANCA (Cohen Tervaert et al., Lancet, 336: 706-711 (1990)).

В отношении общего обсуждения по ANCA-ассоциированному васкулиту см. Lhote and Guillevin, Rheum. Dis. Clin. North Am. 21:911-947 (1995): "ANCA-associated vasculitis: occurrence, prediction, prevention, and outcome of relapses" by Maarten Boomsma, PhD Thesis, Thesis University Groningen, ISBN 90-367-1451-6 (M.M.Boomsma, Groningen, 2001) (<http://www.ub.rug.nl/eldoc/dis/medicine/m.m.boomsma/thesis.pdf>); Kamesh et al., J. Am. Soc. Nephrol. 13:1953-1960 (2002) и Layne, Kidney & Blood Pressure Research 26:231-239 (2003).

CD20-антитела и терапия с их применением

Лимфоциты являются одним из многих типов лейкоцитов, продуцируемых в костном мозгу во время процесса гемопоэза. Имеются две основные популяции лимфоцитов: В-лимфоциты (В-клетки) и Т-лимфоциты (Т-клетки). Лимфоцитами, представляющими здесь особый интерес, являются В-клетки.

В-клетки созревают в костном мозгу и покидают костный мозг, экспрессируя на их клеточной поверхности антигенсвязывающее антитело. Когда «наивная» В-клетка впервые встречается с антигеном, в отношении которого является специфическим ее мембраносвязанное антитело, эта клетка начинает быстро делиться, и ее потомство дифференцируется на В-клетки памяти и эффекторные клетки, называемые «плазматическими клетками». В-клетки памяти имеют более продолжительный период жизни и продолжают экспрессировать мембраносвязанное антитело с той же

самой специфичностью, что и специфичность антитела исходной родительской клетки. Плазматические клетки не продуцируют мембраносвязанное антитело, но вместо этого продуцируют антитело в форме, которая может быть секретирована. Секретируемые антитела являются основными эффекторными молекулами гуморального иммунитета.

CD20-антиген (также называемый В-лимфоцит-рестриктивным антигеном дифференцировки человека, Вр35) является гидрофобным трансмембранным белком с молекулярной массой приблизительно 35 кДа, локализованным на пре-В- и зрелых В-лимфоцитах. Valentine et al., J. Biol. Chem. 264(19):11282-11287 (1989) и Einfeld et al., EMBO J. 7(3):711-717 (1988). Этот антиген экспрессируется также на более чем 90% В-клеточных не-ходжкинских лимфом (NHL) (Anderson et al. Blood 63(6): 1424-1433 (1984)), но не обнаруживается на гемопоэтических стволовых клетках, про-В-клетках, нормальных плазматических клетках или других нормальных тканях (Tedder et al. J. Immunol. 135 (2):973-979 (1985)). CD20 регулирует раннюю стадию (ранние стадии) в процессе активации для инициирования клеточного цикла и дифференцировки (Tedder et al., supra) и, возможно, функционирует в качестве канала ионов кальция. Tedder et al., J. Cell. Biochem. 14D:195 (1990).

При условии экспрессии CD20 в В-клеточных лимфомах этот антиген может служить в качестве кандидата для «нацеливания» на такие лимфомы. В сущности, такое нацеливание может быть генерализовано следующим образом: антитела, специфические в отношении поверхностного антигена CD20 В-клеток, вводят пациенту. Эти анти-CD20-антитела специфически связываются с антигеном CD20 (очевидно) как нормальных, так и злокачественных В-клеток; это антитело, связанное с поверхностным антигеном CD20, может приводить к разрушению или истощению неопластических В-клеток. Кроме того, химические агенты или радиоактивные метки, имеющие потенциал в отношении разрушения опухоли, могут быть конъюгированы с этим анти-CD20-антителом таким образом, что этот агент специфически «доставляется» в неопластические В-клетки. Независимо от этого подхода первичной задачей является разрушение опухоли; этот конкретный подход может определяться конкретным анти-CD20-антителом, которое используется, и, следовательно, доступные подходы к нацеливанию на антиген CD20 могут в значительной степени варьироваться.

Антитело ритуксимаб (RITUXAN®) является генетически сконструированным химерным мышь/человек моноклональным антителом, направленным против антигена CD20. Ритуксимаб является антителом, называемым «C2B8» в Патенте США №5736137, выданном 7 апреля 1998 года (Anderson et al.). Ритуксимаб показан для лечения пациентов с рецидивирующей или трудноизлечимой низкоккачественной или фолликулярной, CD20-положительной, В-клеточной не-ходжкинской лимфомы. Исследования механизма действия *in vitro* показали, что ритуксимаб связывает комплемент человека и лизирует лимфоидные В-клеточные линии через комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC). Reff et al., Blood 83 (2): 435-445 (1994). Кроме того, он имеет значительную активность в анализах на антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC). Ранее было показано, что ритуксимаб имеет антипролиферативные действия в анализах с включением тритированного тимидина и индуцирует апоптоз непосредственно, тогда как другие анти-CD19- и анти-CD20-антитела не имеют таких действий. Maloney et al., Blood 88(10):637a (1996). Синергизм между ритуксимабом и химиотерапевтическими агентами и токсинами также наблюдали экспериментально. В частности, ритуксимаб

сенсibilизирует устойчивые к лекарственным средствам клеточные линии В-клеточной лимфомы человека к цитотоксичным эффектам доксорубина, CDDP, VP-16, дифтерийного токсина и рицина (Demidem et al., Cancer Chemotherapy & Radiopharmaceuticals 12 (3):177-186 (1997)). Препреклинические исследования in vivo показали, что ритуксимаб истощает В-клетки из периферической крови, лимфатических узлов и костного мозга собакоболовых обезьян, предположительно через комплемент- и клеточноопосредованные процессы. Reff et al., Blood 83(2):435-445 (1994).

Ритуксимаб был одобрен в Соединенных Штатах в ноябре 1997 года для лечения пациентов с рецидивирующей или трудноизлечимой низкоккачественной или фолликулярной CD20⁺ В-клеточной NHL в дозе 375 мг/м² один раз в неделю для 4 доз. В апреле 2001 года Департамент по контролю за качеством пищевых продуктов, медикаментов и косметических средств (FDA) одобрил дополнительные притязания в отношении лечения NHL низкой степени: повторяемое лечение (один раз в неделю для четырех доз) и дополнительную схему введения доз (один раз в неделю для восьми доз). Участвовали более чем 300000 пациентов, на которых воздействовали ритуксимабом либо в виде монотерапии, либо в комбинации с иммуносупрессорными или химиотерапевтическими лекарственными средствами. Пациентов лечили также ритуксимабом в виде поддерживающей терапии в течение периода времени до 2 лет. Hainsworth et al., J. Clin. Oncol. 21:1746-1751 (2003); Hainsworth et al., J. Clin. Oncol. 20:4261-4267 (2002). Ритуксимаб использовали также в лечении злокачественных и незлокачественных нарушений плазматических клеток. Treon and Anderson, Semin. Oncol. 27: 79-85 (2000).

Ритуксимаб исследовали также в различных незлокачественных аутоиммунных нарушениях, в которых В-клетки и аутоантитела, по-
5 видимому, играют роль в патофизиологии заболевания. Edwards et al., *Biochem. Soc. Trans.* 30:824-828 (2002). Сообщалось, что ритуксимаб потенциально облегчает признаки и симптомы, например,
10 ревматоидного артрита (RA) (Leandro et al, *Ann. Rheum. Dis.* 61:883-888 (2002); Edwards et al, *Arthritis Rheum.*, 46 (Suppl. 9): S46 (2002); Stahl et al, *Ann. Rheum. Dis.*, 62 (Suppl. 1): OP004 (2003); Shaw et al. *Ann. Rheum. Dis.* 62 Suppl 2:ii55-ii59 (2003); Weyand and Goronzy, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 987: 140-149
20 (2003); Emery et al, *Arthritis Rheum.* 48(9): S439 (2003)), обыкновенной системной красной волчанки (Eisenberg, *Arthritis. Res. Ther.* 5:157-159 (2003); Anolik et al, *Arthritis Rheum.* 48: 455-459 (2003); Leandro et al. *Arthritis Rheum.* 46: 2673-2677 (2002); Gorman et al, *Lupus*, 13: 312-316 (2004); Tomietto et al,
30 *Thromb. Haemost.* 92: 1150-1153 (2004)), иммунной тромбоцитопенической пурпурой (D'Arena et al, *Leuk. Lymphoma*

44:561-562 (2003); Stasi et al, *Blood*, 98: 952-957 (2001); Saleh
 et al, *Semin, Oncol*, 27 (Supp 12):99-103 (2000); Zaja et al,
Haematologica, 87: 189-195 (2002); Zaja et al, *Haematologica* 88:
 538-546 (2003); Cooper et al, *Br. J. Haematol.* 125: 232-239
 (2004); Ratanatharathorn et al., *Ann. Int. Med.*, 133: 275-279
 (2000)), аплазии только эритроцитов (Auner et al., *Br. J.*
Haematol., 116: 725-728 (2002)); аутоиммунной анемии (Zaja et
 al., *Haematologica* 87:189-195 (2002) (опечатка указана в
Haematologica 87:336 (2002); Raj et al., *J. Pediatr. Hematol.*
Oncol. 26: 312-314 (2004); Zecca et al., *Blood* 101: 3857-3861
 (2003); Quartier et al., *Lancet* 358: 1511-1513 (2001)),
 аутоиммунных цитопений (Robak, *Eur. J. Haematol.* 72: 79-88
 (2004)); болезнь холодового агглютиниана (Layios et al.,
Leukemia, 15: 187-8 (2001); Berentsen et al., *Blood*, 103: 2925-
 2928 (2004); Berentsen et al., *Br. J. Haematol.*, 115: 79-83
 (2001); Bauduer, *Br. J. Haematol.*, 112: 1083-1090 (2001);
 Damiani et al., *Br. J. Haematol.*, 114: 229-234 (2001); Lee and
 Kueck, *Blood* 92: 3490-3491 (1998)), синдрома типа В тяжелой
 инсулинонедостаточности (Coll et al., *N. Engl. J. Med.*, 350-311
 (2004), смешанной криоглобулинемии (DeVita et al., *Arthritis*
Rheum. 46 Suppl. 9:S206/S469 (2002); Zaja et al., *Haematologica*
 84: 1157-1158 (1999)), тяжелой псевдопаралитической миастении
 (Zaja et al., *Neurology*, 55: 1062-63 (2000); Wylam et al., *J.*
Pediatr., 143: 674-677 (2003)), гранулематоза Вегенера (Specks
 et al., *Arthritis & Rheumatism* 44: 2836-2840 (2001)),
 трудноизлечимой пузырчатки обыкновенной (Dupuy et al., *Arch*
Dermatol., 140:91-96 (2004)), дерматомиозита (Levine *Arthritis*

Rheum., 46 (Suppl. 9):S1299 (2002)), синдрома Шергена (Somer et al., Arthritis & Rheumatism, 49: 394-398 (2003)), смешанной
 5 криоглобулинемии активного типа II (Zaja et al., Blood, 101: 3827-3834 (2003)), пузырчатки обыкновенной (Dupuy et al., Arch Dermatol., 140:91-95 (2004)), аутоиммунной нефропатии (Pestronk
 10 et al., J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 74:485-489 (2003); Nobile-Orazio, Curr. Opin. Neurol. 17: 599-605 (2004); Rojas-Garcia et al., Neurology 61: 1814-1861 (2003); Renaud et al.,
 15 Muscle Nerve 27:611-615 (2003)), паранеопластического синдрома опсоклонуса-миоклонуса (Pranzatelli et al., Neurology 60 (Suppl. 1) PO5.128:A395 (2003)), приобретенных ингибиторов фактора VIII
 20 (Wiestner et al., Blood 100: 3426-3428 (2002); и рецидивирующего-ремиттирующего рассеянного склероза (RPMS).
 25 Cross et al. (abstract) "Preliminary Results from a Phase II Trial of Rituximab in MS" Eight Annual Meeting of the Americas
 30 Commitees for Research and Treatment in Multiple Sclerosis, 20-21 (2003).

У пациентов с ревматоидным артритом (RA) проводили исследование фазы II
 35 (WA16291) для получения данных последующего наблюдения в отношении безопасности и эффективности ритуксимаба в течение 48 недель. Emery et al., Arthritis Rheum. 48(9):S439 (2003); Szezepanski et al., Arthritis Rheum. 48(9):S121 (2003). В целом пациентов в количестве 161 человек равномерно рандомизировали на четыре
 40 группы (плеча) обработки: метотрексат, только ритуксимаб, ритуксимаб плюс метотрексат и ритуксимаб плюс циклофосфамид (CTX). В схеме введения ритуксимаба вводили один грамм внутривенно в дни 1 и 15. Инфузии ритуксимаба у большинства пациентов с RA хорошо переносились, причем 36% пациентов,
 45 испытывали по меньшей мере одно вредное событие во время их первой инфузии в сравнении с 30% пациентов, получавшими плацебо. В общем и целом, большинство вредных событий были слабыми-умеренными и были хорошо сбалансированными по всем группам обработки. В целом наблюдали 19 серьезных вредных событий во всех четырех группах на протяжении 48 недель, которые были несколько более частыми в группе ритуксимаб/CTX. Встречаемость инфекций была хорошо
 50 сбалансирована по всем группам. Средняя степень тяжелой инфекции в этой популяции пациентов с RA была равна 4,66 на 100 пациентов-лет, что является более низким, чем степень инфекций, требующих госпитализации в случае пациентов с RA (9,57 на 100 пациентов-лет), о которых сообщалось в эпидемиологическом

исследовании сообщества. Doran et al., Arthritis Rheum. 46:2287- 2293 (2002).

Профиль безопасности ритуксимаба, о котором сообщалось, у небольшого количества пациентов с неврологическими нарушениями, включающими в себя аутоиммунную невропатию (Petronk et al., supra), синдром опсиклонуса-миоклонуса (Pranzatelli et al., supra) и RRMS (Cross et al., supra), был сходным с профилем безопасности, о котором сообщалось, в онкологии или RA. В продолжающемся финансируемом исследователем испытании (IST) ритуксимаба в комбинации с интерфероном-бета (IFN- β) или глатирамер-ацетатом у пациентов с RRMS (Cross et al., supra) 1 из 10 лечившихся пациентов был госпитализирован для нового наблюдения, после того как он испытывал умеренные лихорадку и озноб после первой инфузии ритуксимаба, в то время как остальные 9 пациентов завершили программу лечения из четырех инфузий без каких-либо побочных эффектов, о которых сообщалось.

Патенты и патентные публикации, касающиеся CD20-антител и CD20-связывающих молекул, включают в себя Патенты США с номерами

5 5776456, 5736137, 5843439, 6399061 и 6682734, а также US 2002/0197255, US 2003/0021781, US 2003/0082172, US 2003/0095963, US 2003/0147885 (Anderson et al.); Патент США № 6455043 and WO

10 2000/09160 (Grillo-Lopez, A.); WO 2000/27428 (Grillo-Lopez and White); WO 2000/27433 (Grillo-Lopez and Leonard); WO 2000/44788 (Braslawsky et al.); WO 2001/10462 (Rastetter, W.); WO

15 2001/10461 (Rastetter and White); WO 2001/10460 (White and Grillo-Lopez); US 2001/0018041, US 2003/0180292, WO 2001/34194 (Hanna and Hariharan); US 2002/0006404 and WO 2002/04021 (Hanna and Hariharan); US 2002/0012665, WO 2001/74388 and 6896885B5

20 (Hanna, N.); US 2002/0058029 (Hanna, N.); US 2003/0103971 (Hariharan and Hanna); US 2005/0123540 (Hanna et al.); US 2002/0009444 and WO 2001/80884 (Grillo-Lopez, A.); WO

25 2001/97858; US 2005/0112060, и Патент США № 6846476 (White, C); US 2002/0128488 and WO 2002/34790 (Reff, M.); WO 2002/060955 (Braslawsky et al.); WO 2002/096948 (Braslawsky et al.); WO

30 2002/079255 (Reff and Davies); Патент США № 6171586 and WO 1998/56418 (Lam et al.); WO 1998/58964 (Raju, S.); WO 1999/22764 (Raju, S.); WO 1999/51642, Патент США № 6194551, Патент США № 6242195, Патент США № 6528624 and Патент США № 6538124 (Idusogie et al.); WO 2000/42072 (Presta, L.); WO 2000/67796 (Curd et al.);

35 40 WO 2001/03734 (Grillo-Lopez et al); US 2002/0004587 и WO

45

50

2001/77342 (Miller and Presta); US 2002/0197256 (Grewal, I.); US
2003/0157108 (Presta, L.); Патенты США №№ 6565827, 6090365,
5 6287537, 6015542, 5843398 и 5595721, (Kaminski et al.); Патенты
США № 5500362, 5677180, 5721108, 6120767, 6652852, 6893625
(Robinson et al.); Патент США № 6410391 (Raubitschek et al);
10 Патент США № 6224866 и WO 00/20864 (Barbera-Guillem, E.); WO
2001/13945 (Barbera-Guillem, E.); WO 2000/67795 (Goldenberg); US
2003/0133930 and WO 2000/74718 (Goldenberg and Hansen); US
15 2003/0219433 and WO 2003/68821 (Hansen et al); WO 2004/058298
(Goldenberg and Hansen); WO 2000/76542 (Golay et al.); WO
2001/72333 (Wolin and Rosenblatt); Патент США № 6368596 (Ghetie
20 et al); Патент США № 6306393 и US 2002/0041847 (Goldenberg, D.);
US 2003/0026801 (Weiner and Hartmann); WO 2002/102312 (Engleman,
E.); US 2003/0068664 (Albitar et al); WO 2003/002607 (Leung,
25 S.); WO 2003/049694, US 2002/0009427, and US 2003/0185796 (Wolin
et al); WO 2003/061694 (Sing and Siegall); US 2003/0219818
30 (Bohen et al); US 2003/0219433 and WO 2003/068821 (Hansen et
al); US 2003/0219818 (Bohen et al); US 2002/0136719 (Shenoy et
al); WO 2004/032828 and US 2005/0180972 (Wahl et al); and WO
35 2002/56910 (Hayden-Ledbetter). Смотрите также Патент США №
5849898 и EP 330191 (Seed et al); EP 332865A2 (Meyer and Weiss);
Патент США № 4861579 (Meyer et al); US 2001/0056066 (Bugelski et
40 al); WO 1995/03770 (Bhat et al); US 2003/0219433 A1 (Hansen et
al); WO 2004/035607 (Teeling et al); WO 2004/056312 (Lowman et
al); US 2004/0093621 (Shitara et al); WO 2004/103404 (Watkins et
45 al); WO 2005/000901 (Tedder et al); US 2005/0025764 (Watkins et
al); WO 2005/016969 (Carr et al); US 2005/0069545 (Carr et al);

50

WO 2005/014618 (Chang et al.); US 2005/0079174 (Barbera-Guillem and Nelson); US 2005/0106108 (Leung and Hansen); WO2005/044859 and US 2005/0123546 (Umana et al.); WO 2005/070963 (Allan et al.); US 2005/0186216 (Ledbetter and Hayden-Ledbetter); и Патент США № 6897044 (Braslawski et al.).

Публикации, касающиеся лечения ритуксимабом, включают в себя: Perotta and Abuel, "Response of chronic relapsing ITP of 10 years duration to rituximab" Abstract # 3360 *Blood* 10(1)(part 1-2): p. 88B (1998); Perotta et al., "Rituxan in the treatment of chronic idiopathic thrombocytopaenic purpura (ITP)", *Blood*, 94: 49 (abstract) (1999); Matthews, R., "Medical Heretics" *New Scientist* (7 April, 2001); Leandro et al, "Clinical outcome in 22 patients with rheumatoid arthritis treated with B lymphocyte depletion" *Ann Rheum Dis*, supra; Leandro et al., "Lymphocyte depletion in rheumatoid arthritis: early evidence for safety, efficacy and dose response" *Arthritis and Rheumatism* 44(9): S370 (2001); Leandro et al., "An open study of B lymphocyte depletion in systemic lupus erythematosus", *Arthritis and Rheumatism*, 46:2673-2677 (2002), где во время 2-недельного периода каждый пациент получал две инфузии 500 мг ритуксимаба, две инфузии 750 мг циклофосфамида и кортикостероиды перорально в высоких дозах и где два из получающих лечение пациентов имели рецидивы на 7 и 8 месяц, соответственно, и лечились повторно, хотя с использованием других протоколов; "Successful long-term treatment of systemic lupus erymatosus with rituximab maintenance therapy" Weide et al., *Lupus*, 12: 779-782 (2003), где пациенту проводили курс лечения ритуксимабом ($375 \text{ мг/м}^2 \times 4$,

с недельными интервалами) и дополнительно вводили ритуксимаб
каждые 5-6 месяцев с последующим проведением поддерживающей
терапии ритуксимабом 375 мг/м² каждые три месяца, а второму
пациенту с трудноизлечимой SLE проводили успешное лечение
ритуксимабом и поддерживающую терапию каждые три месяца, причем
оба пациента хорошо отвечали на терапию ритуксимабом; Edwards
and Cambridge, "Sustained improvement in rheumatoid arthritis
following a protocol designed to deplete B lymphocytes"
Rheumatology 40:205-211 (2001); Cambridge et al., "B lymphocyte
depletion in patients with rheumatoid arthritis: serial studies
of immunological parameters" *Arthritis Rheum.*, 46 (Suppl. 9):
S1350 (2002); Cambridge et al., "Serologic changes following B
lymphocyte depletion therapy for rheumatoid arthritis" *Arthritis
Rheum.*, 48: 2146-2154 (2003); Edwards et al., "B-lymphocyte
depletion therapy in rheumatoid arthritis and other autoimmune
disorders" *Biochem Soc. Trans.*, supra; Edwards et al, "Efficacy
and safety of rituximab, a B-cell targeted chimeric monoclonal
antibody: A randomized, placebo controlled trial in patients
with rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism* 46(9): S197
(2002); Edwards et al., "Efficacy of B-cell-targeted therapy
with rituximab in patients with rheumatoid arthritis" *N Engl. J.
Med.* 350:2572-2582 (2004); Pavelka et al., *Ann. Rheum. Dis.* 63:
(S1):289-290 (2004); Emery et al., *Arthritis Rheum.* 50 (S9):S659
(2004); Levine and Pestronk, "IgM antibody-related
polyneuropathies: B-cell depletion chemotherapy using rituximab"
Neurology 52: 1701-1704 (1999); Uchida et al., "The innate
mononuclear phagocyte network depletes B lymphocytes through Fc

receptor-dependent mechanisms during anti-CD20 antibody immunotherapy" *J. Exp. Med.* 199: 1659-1669 (2004); Gong et al., "Importance of cellular microenvironment and circulatory dynamics in B cell immunotherapy" *J. Immunol.* 174: 817-826 (2005); Hamaguchi et al., "The peritoneal cavity provides a protective niche for B1 and conventional B lymphocytes during anti-CD20 immunotherapy in mice" *J. Immunol.* 174: 4389-4399 (2005); Cragg et al. "The biology of CD20 and its potential as a target for mAb therapy" *Curr. Dir. Autoimmun.* 8:140-174 (2005); Eisenberg, "Mechanisms of autoimmunity" *Immunol. Res.* 27: 203-218 (2003); DeVita et al., "Efficacy of selective B cell blockade in the treatment of rheumatoid arthritis" *Arthritis & Rheum* 46:2029-2033 (2002); Hidashida et al. "Treatment of DMARD-refractory rheumatoid arthritis with rituximab." Presented at the Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology; Oct 24-29; New Orleans, LA 2002; Tuscano, J. "Successful treatment of infliximab-refractory rheumatoid arthritis with rituximab" Presented at the Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology, Oct 24-29; New Orleans, LA 2002 and published Tuscano, *Arthritis Rheum.* 46: 3420 (2002); "Pathogenic roles of B cells in human autoimmunity; insights from the clinic" Martin and Chan, *Immunity* 20:517-527 (2004); Silverman and Weisman, "Rituximab therapy and autoimmune disorders, prospects for anti-B cell therapy", *Arthritis and Rheumatism*, 48: 1484-1492 (2003); Kazkaz and Isenberg, "Anti B cell therapy (rituximab) in the treatment of autoimmune diseases", *Current opinion in pharmacology*, 4: 398-402 (2004);

Virgolini and Vanda, "Rituximab in autoimmune diseases",
Biomedicine & pharmacotherapy, 58: 299-309(2004); Klemmer et
al., "Treatment of antibody mediated autoimmune disorders with a
AntiCD20 monoclonal antibody Rituximab", *Arthritis And*
Rheumatism, 48: (9) 9,S (SEP), page: S624-S624 (2003); Kneitz et
al., "Effective B cell depletion with rituximab in the treatment
of autoimmune diseases", *Immunobiology*, 206: 519-527 (2002);
Arzoo et al., "Treatment of refractory antibody mediated
autoimmune disorders with an anti-CD20 monoclonal antibody
(rituximab)" *Annals of the Rheumatic Diseases*, 61 (10), p 922-
924 (2002) *Comment in Ann Rheum Dis.* 61: 863-866 (2002); "Future
strategies in immunotherapy" by Lake and Dionne, in *Burger's*
Medicinal Chemistry and Drug Discovery (2003 by John Wiley &
Sons, Inc.) Article Online Posting Date: January 15, 2003
(Chapter 2 "Antibody-Directed Immunotherapy"); Liang and Tedder,
Wiley Encyclopedia of Molecular Medicine, Section: CD20 as an
Immunotherapy Target, article online posting date: 15 January,
2002 entitled "CD20"; Appendix 4A entitled "Monoclonal
Antibodies to Human Cell Surface Antigens" by Stockinger et al.,
eds: Coligan et al., in *Current Protocols in Immunology* (2003
John Wiley & Sons, Inc) Online Posting Date: May, 2003; Print
Publication Date: February, 2003; Penichet and Morrison, "CD
Antibodies/molecules: Definition; Antibody Engineering" in *Wiley*
Encyclopedia of Molecular Medicine Section: Chimeric, Humanized
and Human Antibodies; posted online 15 January, 2002.

Krcome Toro, CM. Looney "B cells as a therapeutic target in
autoimmune diseases other than rheumatoid arthritis"

Rheumatology, 44 Suppl 2: i113-i117 (2005); Chambers and
Isenberg, "Anti-B cell therapy (rituximab) in the treatment of
autoimmune diseases" *Lupus* 14(3): 210-214 (2005); Looney et al.,
"B-cell depletion as a novel treatment for systemic lupus
erythematosus: a phase I/II dose-escalating trial of rituximab"
Arthritis Rheum. 50: 2580-2589 (2004); Looney, "Treating human
autoimmune disease by depleting B cells" *Ann Rheum. Dis.* 61:
863-866 (2002); Edelbauer et al., "Rituximab in childhood
systemic lupus erythematosus refractory to conventional
immunosuppression Case report" *Pediatr. Nephrol.* 20(6): 811-813
(2005); D'Cruz and Hughes, "The treatment of lupus nephritis"
BMJ 330(7488): 377-378 (2005); Looney, "B cell-targeted therapy
in diseases other than rheumatoid arthritis" *J. Rheumatol.*
Suppl. 73: 25-28; discussion 29-30 (2005); Sfrikakis et al.,
"Remission of proliferative lupus nephritis following B cell
depletion therapy is preceded by down-regulation of the T cell
costimulatory molecule CD40 ligand: an open-label trial"
Arthritis Rheum. 52(2): 501-513 (2005); Rastetter et al.,
"Rituximab: expanding role in therapy for lymphomas and
autoimmune diseases" *Annu. Rev. Med.* 55: 477-503 (2004);
Silverman, "Anti-CD20 therapy in systemic lupus erythematosus: a
step closer to the clinic" *Arthritis Rheum.* 52(2): 371-7 (2005),
Erratum in: *Arthritis Rheum.* 52(4): 1342 (2005); Ahn et al.,
"Long-term remission from life-threatening hypercoagulable state
associated with lupus anticoagulant (LA) following rituximab
therapy" *Am. J. Hematol.* 78(2): 127-129(2005); Tahir et al.,
"Humanized anti-CD20 monoclonal antibody in the treatment of

severe resistant systemic lupus erythematosus in a patient with antibodies against rituximab" *Rheumatology*, 44(4): 561-562 (2005), Epub 2005 Jan 11; Looney et al., "Treatment of SLE with anti-CD20 monoclonal antibody" *Curr. Dir. Autoimmun.* 8: 193-205 (2005); Cragg et al., "The biology of CD20 and its potential as a target for mAb therapy" *Curr. Dir. Autoimmun.* 8: 140-174 (2005); Gottenberg et al., "Tolerance and short term efficacy of rituximab in 43 patients with systemic autoimmune diseases" *Ann. Rheum. Dis.* 64(6): 913-920 (2005) Epub 2004 Nov 18; Tokunaga et al., "Down-regulation of CD40 and CD80 on B cells in patients with life-threatening systemic lupus erythematosus after successful treatment with rituximab" *Rheumatology* 44(2): 176-182 (2005), Epub 2004 Oct 19. See also Leandro et al., "B cell repopulation occurs mainly from naive B cells in patient with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus" *Arthritis Rheum.*, 48 (Suppl 9): S1160(2003).

Specks et al., "Response of Wegener's granulomatosis to anti-CD20 chimeric monoclonal antibody therapy" *Arthritis & Rheumatism*. 44 (12):2836-2840 (2001) описывают успешное применение четырех инфузий по 375 мг/м² ритуксимаба и глюкокортикоидов в высоких дозах для лечения гранулематоза Вегенера. Эту терапию повторяли через 11 месяцев, при рецидиве сАМСА, но при терапии не применяли глюкокортикоидов. Через 8 месяцев после второго курса ритуксимаба заболевание пациентов оставалось в стадии полной ремиссии. Кроме того, в другом исследовании было обнаружено, что ритуксимаб является хорошо переносимым, индуцирующим эффективную ремиссию агентом для тяжелого ANCA-ассоциированного васкулита при применении в дозе 375 мг/м² × 4 вместе с перорально вводимым преднизолоном 1 мг/кг/день, дозу которого уменьшали через 4 недели до 40 мг/день и полностью прекращали введение в течение следующих 16 недель. У четырех пациентов проводили повторный курс лечения только ритуксимабом для исключения рецидива/повышения титров ANCA. По-видимому, не требуются дополнительные иммуносупрессивные агенты, отличные от глюкокортикоидов, для индукции ремиссии и поддержания стойкой ремиссии (в течение 6 месяцев или более). См. Online abstract submission and invitation Keogh et al., "Rituximab for Remission Induction in Severe ANCA-Associated Vasculitis: Report of a Prospective Open-Label Pilot Trial in 10 Patients", American College of Rheumatology, Session Number: 28-100, Session Title: Vasculitis, Session Type: ACR Concurrent Session, Primary Category: 28 Vasculitis, Session 10/18/2004

(<www.abstractsonline.com/viewer/SearchResults.asp>). См. также Keogh et al., *Kidney Blood Press. Res.* 26:293 (2003), где сообщается, что одиннадцать пациентов с трудноизлечимым ANCA-ассоциированным васкулитом лечили четырехнедельными дозами 375 мг/м² ритуксимаба и глюкокортикоидами в высоких дозах, что приводило к ремиссии.

Пациентам с трудноизлечимым ANCA-ассоциированным васкулитом вводили ритуксимаб вместе с иммуносупрессивными лекарственными средствами, такими как внутривенно вводимые циклофосфамид, микофенолат-мофетил, азатиоприн или лефлуномид, с очевидной эффективностью. Eriksson, "Short-term outcome and safety in 5 patients with ANCA-positive vasculitis treated with rituximab", *Kidney and Blood Pressure Research*, 26: 294 (2003) (пять пациентов с ANCA-ассоциированным васкулитом, получавшие ритуксимаб 375 мг/м² один раз в неделю в течение 4 недель, отвечали на это лечение); Jayne et al., "B-cell depletion with rituximab for refractory vasculitis", *Kidney and Blood Pressure research*, 26: 294-295 (2003) (шесть пациентов с трудноизлечимым васкулитом, получавшие четыре еженедельные инфузии ритуксимаба при 375 мг/м² с циклофосфамидом вместе с фоновой иммуносупрессией и преднизолоном, испытывали большие спады васкулитной активности).

Дополнительное сообщение об использовании ритуксимаба вместе с внутривенным циклофосфамидом при 375 мг/м² на дозу в виде 4 доз для введения пациентам с трудноизлечимым системным васкулитом приведено в Jayne, poster 88 (11th International Vasculitis and ANCA workshop), 2003, American Society of Nephrology. См. также Stone and Specks, "Rituximab Therapy for the Induction of Remission and Tolerance in ANCA-associated Vasculitis", in the Clinical Trial Research Summary of the 2002-2003 Immune Tolerance Network, [http:](http://www.immunotolerance.org/research/autoimmune/trials/stone.html)

[//www.immunotolerance.org/research/autoimmune/trials/stone.html](http://www.immunotolerance.org/research/autoimmune/trials/stone.html), в котором предлагается испытание ритуксимаба в ANCA-ассоциированном васкулите в течение полного периода 18 месяцев. См. также Eriksson, *J. Internal Med.*, 257: 540-548 (2005) в отношении девяти пациентов с ANCA-положительным васкулитом, которых успешно лечили двумя-четырьмя еженедельными дозами по 500 мг ритуксимаба, а также Keogh et al., *Arthritis and Rheumatism*, 52: 262-268 (2005), которые сообщили, что у 11 пациентов с трудноизлечимым ANCA-ассоциированным васкулитом лечение или повторное лечение четырьмя еженедельными дозами 375 мг/м² ритуксимаба индуцировало ремиссию посредством истощения В-лимфоцитов, причем это исследование проводилось между январем 2000 года и сентябрем 2002 года.

В отношении активности гуманизированного анти-CD20-антитела см., например, Vugmeyster et al., "Depletion of B cells by a humanized anti-CD20 antibody PRO70769 in *Macaca fascicularis*", *J. Immunother.* 28: 212-219 (2005). В отношении обсуждения моноклонального антитела человека см. Baker et al., "Generation and characterization of LymphoStat-B, a human monoclonal antibody that antagonizes the bioactivities of B lymphocyte stimulator", *Arthritis Rheum.* 48: 3253-3265 (2003).

Остается потребность в подходах к лечению, которое уменьшает частоту инфузий активного лекарственного средства в период одного месяца. Кроме того, существует потребность в уменьшении риска токсичных действий используемых в настоящее время лекарственных средств, таких как стероиды и химиотерапевтические агенты, и в уменьшении риска внезапных обострений, рецидивов болезни и рецидивов у пациентов с ANCA-ассоциированным васкулитом, в стойкой ремиссии и поддержании стойкой ремиссии в течение пролонгированного периода времени.

Сущность изобретения

Данное изобретение относится к введению CD20-антитела, которое обеспечивает безопасную и активную схему лечения для индивидуумов с ANCA-ассоциированным васкулитом, включающую в себя выбор эффективной схемы введения доз и запланированное или незапланированное повторяемое лечение. Этот антагонист является эффективным как в начальной терапии, так и в лечении трудноизлечимого заболевания.

Таким образом, данное изобретение является следующим. В первом аспекте данное изобретение относится к лечению ANCA-ассоциированного васкулита у пациента, предусматривающему введение CD20-антитела пациенту в дозе приблизительно 400 мг - 1,3 г при частоте одна-три дозы в период приблизительно одного месяца.

В дополнительном варианте осуществления данное изобретение относится к изделию, содержащему: контейнер, содержащий CD20-антитело, и вкладыш упаковки с инструкциями в отношении лечения ANCA-ассоциированного васкулита у пациента, где эти инструкции указывают, что дозу CD20-антитела приблизительно 400 мг - 1,3 грамма, при частоте одна-три дозы, вводят этому пациенту в период приблизительно одного месяца.

В предпочтительных вариантах осуществления приведенных выше аспектов настоящего изобретения васкулит представляет собой гранулематоз Вегенера или микроскопическую полиангиопатию, и/или второе лекарственное средство вводят в эффективном количестве этому пациенту, где CD20-антитело является первым лекарственным средством. Таким лекарственным средством может быть один или несколько лекарственных средств. Более предпочтительно, таким вторым лекарственным средством является химиотерапевтический агент, иммуносупрессивный агент, модифицирующее заболевание противоревматическое лекарственное средство (DMARD), цитотоксический агент, антагонист интегрина, нестероидное противовоспалительное лекарственное средство (NSAID), антагонист цитокина, гормон или их комбинации.

В других дополнительных аспектах данное изобретение относится к способу лечения ANCA-ассоциированного васкулита у индивидуума, предусматривающему введение эффективного количества CD20-антитела этому индивидууму для обеспечения первоначального воздействия антитела с последующим вторым воздействием антитела, причем это второе воздействие обеспечивают не ранее чем через приблизительно 16-54 недели от первоначального воздействия.

В одном предпочтительном варианте осуществления этого последнего способа, включающего в себя множественные введения антител, настоящее изобретение относится к способу лечения ANCA-ассоциированного васкулита у индивидуума, предусматривающему введение этому индивидууму эффективного количества CD20-антитела для обеспечения первоначального воздействия антитела приблизительно 0,5-4 г с последующим вторым воздействием антитела приблизительно 0,5-4 г, причем это второе воздействие обеспечивают не ранее чем через приблизительно 16-54 недель от первоначального воздействия и каждое из воздействий антитела обеспечивают индивидууму в виде приблизительно 1-4 доз антитела, более предпочтительно в виде единичной дозы или в виде двух или трех отдельных доз антитела.

Конкретным предпочтительным здесь вариантом осуществления является способ лечения ANCA-ассоциированного васкулита у индивидуума, предусматривающий введение эффективного количества CD20-антитела этому индивидууму для

обеспечения первоначального воздействия антитела с последующим вторым воздействием антитела, причем это второе воздействие обеспечивают не ранее чем через приблизительно 16-54 недели от первоначального воздействия и каждое из этих воздействий антитела обеспечивают индивидууму в виде единичной дозы или в виде двух или трех отдельных доз антитела. Предпочтительно, в таком способе эти воздействия антитела равны приблизительно 0,5-4 граммам в каждом случае.

В другом предпочтительном варианте осуществления этих последних способов второе лекарственное средство вводят с первоначальным воздействием и/или более поздними воздействиями, причем первым лекарственным средством является антитело. В предпочтительном варианте осуществления вторым лекарственным средством является одно или несколько лекарственных средств, представленных выше в качестве предпочтительных. В более предпочтительном варианте осуществления вторым лекарственным средством является стероид и/или иммуносупрессивный агент. Еще в одном предпочтительном варианте осуществления стероид вводят с первым воздействием, но не со вторым воздействием, или его вводят в более низких количествах, чем количества, используемые с первоначальным введением.

Еще в одном предпочтительном варианте осуществления этих последних способов индивидуум никогда ранее не лечился CD20-антителом, и/или этому индивидууму для лечения васкулита не вводили другое лекарственное средство, кроме CD20-антитела. В другом предпочтительном варианте осуществления первоначальное и второе воздействия антитела являются воздействиями одного и того же антитела, и более предпочтительно все воздействия антитела являются воздействиями одного и того же антитела. В другом предпочтительном варианте осуществления этот индивидуум находится в стадии ремиссии после первоначального или более позднего воздействия антитела, предпочтительно, после второго воздействия антитела. Более предпочтительно, индивидуум находится в стадии ремиссии при обеспечении всех воздействий антитела. Наиболее предпочтительно, такой индивидуум находится в стадии ремиссии по меньшей мере приблизительно шесть месяцев после последнего воздействия антитела.

Еще в одном предпочтительном варианте осуществления этих последних аспектов индивидуум имеет повышенный уровень антинуклеарных антител (ANA), антител против ревматоидного фактора (RF), креатинина, азота мочевины крови, антиэндотелиальных антител, антинейтрофильных цитоплазматических антител (ANCA) или комбинации двух или нескольких из них.

Кроме того, в дополнительных аспектах данное изобретение относится к изделию, содержащему:

(a) контейнер, содержащий CD-антитело; и

(b) вкладыш упаковки с инструкциями для лечения ANCA-ассоциированного васкулита у индивидуума, причем эти инструкции указывают, что этому индивидууму вводят количество антитела, которое является эффективным для обеспечения первоначального воздействия антитела, с последующим вторым воздействием антитела, причем это второе воздействие антител обеспечивают не ранее чем через 16-54 недели от первоначального воздействия.

Предпочтительно, такой вкладыш упаковки сопровождается инструкциями для лечения ANCA-ассоциированного васкулита у индивидуума, причем в инструкции указывают, что этому индивидууму вводят количество антитела, которое является эффективным для обеспечения первоначального воздействия антитела

приблизительно 0,5-4 г, с последующим вторым воздействием антитела 0,5-4 г, причем это второе воздействие антител обеспечивают не ранее чем через приблизительно 16-54 недели от первоначального воздействия, и каждое из воздействий антитела обеспечивается индивидууму в виде приблизительно одной-
 5 четырех доз, предпочтительно в виде единичной дозы или в виде двух или трех отдельных доз антитела.

В конкретном аспекте обеспечивают изделие, содержащее:

(а) контейнер, содержащий C020-антитело; и

10 (б) вкладыш упаковки с инструкциями для лечения ANCA-ассоциированного васкулита у индивидуума, причем эти инструкции указывают, что этому индивидууму вводят количество антитела, которое является эффективным для обеспечения первоначального воздействия антитела, с последующим вторым воздействием антитела, причем это второе воздействие антител обеспечивают не ранее чем через
 15 приблизительно 16-54 недели от первоначального воздействия и каждое из воздействий антитела обеспечивают индивидууму в виде единичной дозы или в виде двух или трех отдельных доз антитела.

Описанные здесь способы лечения предпочтительно уменьшают, минимизируют или элиминируют необходимость совместного введения, предварительного введения или последующего введения избыточных количеств вторых лекарственных средств, таких как иммуносупрессивные агенты и/или химиотерапевтические агенты, которые являются обычными стандартными способами лечения для таких индивидуумов, во избежание, насколько возможно, побочных эффектов от такого стандартного
 25 лечения, а также для уменьшения расходов и повышения удобства для индивидуума, например удобства времени и частоты введения.

Краткое описание фигур

Фиг.1А является сопоставлением последовательностей, сравнивающим
 30 аминокислотные последовательности варибельного домена легкой цепи (V_L) каждого из мышинового 2H7 (SEQ ID NO:1) гуманизированного варианта 2H7.v16 (SEQ ID NO:2) и легкой цепи каппа подгруппы I человека (SEQ ID NO:3). CDR V_L 2H7 и hu2H7.v16 являются следующими: CDR1 (SEQ ID NO:4), CDR2 (SEQ ID NO:5) и CDR3 (SEQ ID NO:6).

35 Фиг.1В является сопоставлением последовательностей, сравнивающим аминокислотные последовательности варибельного домена тяжелой цепи (V_H) каждого из мышинового 2H7 (SEQ ID NO:7) гуманизированного варианта 2H7.v16 (SEQ ID NO:8) и консенсусной последовательности человека тяжелой цепи подгруппы III (SEQ ID NO:9). CDR V_H 2H7 и hu2H7.v16 являются следующими: CDR1 (SEQ ID NO:
 40 10), CDR2 (SEQ ID NO:11) и CDR3 (SEQ ID NO:12).

На фиг.1А и фиг.1В CDR1, CDR2 и CDR3 в каждой цепи заключены в скобках, фланкированные каркасными районами, FR1-FR4, как указано. 2H7 обозначает мышинное антитело 2H7. Звездочки между двумя рядами последовательностей
 45 указывают положения, которые являются различными между этими двумя последовательностями. Нумерация остатков является нумерацией в соответствии с Kabat et al., Sequences of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991), причем инсерции показаны как a, b, c, d и e.

50 Фиг.2 показывает аминокислотную последовательность L-цепи зрелого 2H7.v16 (SEQ ID NO:13).

Фиг.3 показывает аминокислотную последовательность H-цепи зрелого 2H7.v16 (SEQ ID NO:14).

Фиг.4 показывает аминокислотную последовательность Н-цепи зрелого 2H7.v31 (SEQ ID NO:15). L-цепь 2H7.v31 является такой же, как и для 2H7.v16.

Фиг.5 является сопоставлением последовательностей, сравнивающим аминокислотные последовательности легких цепей гуманизированного варианта 2H7.v16 (SEQ ID NO:2) и гуманизированного варианта 2H7.v138 (SEQ ID NO: 28).

Фиг.6 является сопоставлением последовательностей, сравнивающим аминокислотные последовательности тяжелых цепей гуманизированного варианта 2H7.v16 (SEQ ID NO:8) и гуманизированного варианта 2H7.v138 (SEQ ID NO: 29).

Фиг.7 показывает сопоставление легких цепей зрелых 2H7.V16 и 2H7.v511 (SEQ ID NO:13 и SEQ ID NO:30 соответственно) с нумерацией Kabat остатков варибельного домена и нумерацией Eu константного домена.

Фиг.8 показывает сопоставление тяжелых цепей зрелых 2H7.v16 и 2H7.v511 (SEQ ID NO:14 и SEQ ID NO:31 соответственно) с нумерацией Kabat остатков варибельного домена и нумерацией Eu константного домена.

Фиг.9А показывает последовательность варибельного домена легкой цепи гуманизированного 2H7.v114 (SEQ ID NO:32); фиг.9В показывает последовательность варибельного домена тяжелой цепи гуманизированного 2H7.v114 (SEQ ID NO:33), и фиг.9С показывает последовательность полноразмерной тяжелой цепи гуманизированного 2H7.v114 (SEQ ID NO:34) с нумерацией Kabat остатков варибельного домена и нумерацией Eu константного домена.

Подробное описание предпочтительных вариантов осуществления

I. Определения

«В-клетка» является лимфоцитом, который созревает в костном мозгу, и включает в себя наивную В-клетку, В-клетку памяти или эффекторную В-клетку (плазматические клетки). В-клетка может здесь быть нормальной или незлокачественной В-клеткой.

«Маркер В-клеточной поверхности» или «антиген В-клеточной поверхности» является антигеном, экспрессируемым на поверхности В-клетки, который может быть мишенью антагониста, который связывается с ним. Примеры маркеров В-клеточной поверхности включают в себя поверхностные маркеры лейкоцитов CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD37, CD40, CD53, CD72, CD73, CD74, CDw75, CDw76, CD77, CDw78, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CDw84, CD85 и CD86 (в отношении описаний см. The Leukocyte Antigen Facts Book, 2nd Edition. 1997, ed. Barclay et al. Academic Press, Harcourt Brace & Co., New York). Другие поверхностные маркеры В-клеток включают в себя RP105, FcRH2, B-cell CR2, CCR6, P2X5, HLA-DOB, CXCR5, FCER2, BR3, BtIg, NAG14, SLGC16270, FcRH1, IRTA2, ATWD578, FcRH3, IRTA1, FcRH6, BCMA и 239287. Представляющий особый интерес маркер поверхности В-клеток преимущественно экспрессируется на В-клетках в сравнении с другими не-В-клеточными тканями млекопитающего и может экспрессироваться как на предшественниках В-клеток, так и на зрелых В-клетках. Предпочтительными маркерами В-клеток являются здесь CD20 и CD22.

Антиген «CD20» или «CD20» является негликозилированным фосфопротеином приблизительно 35 кДа, обнаруживаемом на поверхности более чем 90% В-клеток из периферической крови или лимфоидных органов. CD20 присутствует как на нормальных В-клетках, так и на злокачественных В-клетках, но не экспрессируется

на стволовых клетках. Другие названия CD20 в литературе включают в себя «ограниченный В-лимфоцитами антиген» и «Bp35». Антиген CD20 описан, например, в Clark et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 82:1766 (1985).

Антиген «CD20» или «CD20», известный также как BL-CAM или Lyb8, является интегральным мембранным гликопротеином типа 1 с молекулярной массой приблизительно 130 кДа (восстановленный) - 140 кДа (невосстановленный). Он экспрессируется как в цитоплазме, так и в клеточной мембране В-лимфоцитов. Антиген CD20 появляется рано в дифференцировке В-клеточных лимфоцитов на приблизительно той же самой стадии, что и антиген CD19. В отличие от других В-клеточных маркеров мембранная экспрессия CD22 ограничивается поздними стадиями дифференцировки, находящимися между зрелыми В-клетками (CD22+) и плазматическими клетками (CD22-). Антиген CD22 описан, например, в Wilson et al., J. Exp. Med. 173:137 (1991) и Wilson et al., J. Immunol. 150:5013 (1993).

«Антагонист» является молекулой, которая, после связывания с CD20 на В-клетках, разрушает или истощает В-клетки в млекопитающем и/или препятствует одной или нескольким функциям В-клеток, например, уменьшением или предотвращением гуморальной реакции, индуцируемой В-клеткой. Антагонист предпочтительно способен истощать В-клетки (т.е. уменьшать уровни циркулирующих В-клеток) у млекопитающего при его введении. Такое истощение может достигаться через различные механизмы, такие как антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (ADCC) и/или комплементзависимая цитотоксичность (CDC), ингибирование пролиферации В-клеток и/или индукция смерти В-клеток (например, через апоптоз). Антагонисты, включенные в объем данного изобретения, включают в себя антитела, синтетические или имеющие природную последовательность пептиды, иммуноадгезины и антагонисты с малой молекулой, которые связываются с CD20, необязательно конъюгированные или слитые с цитотоксическим агентом. Предпочтительный антагонист содержит антитело.

«Антагонист-антитело» обозначает в данном контексте антитело, которое, после связывания с маркером В-клеточной поверхности на В-клетках, разрушает или истощает В-клетки в млекопитающем и/или препятствует одной или нескольким функциям В-клеток, например, уменьшением или предотвращением гуморальной реакции, индуцируемой В-клеткой. Антагонист-антитело предпочтительно способно истощать В-клетки (т.е. уменьшать уровни циркулирующих В-клеток) у млекопитающего при его введении. Такое истощение может достигаться через различные механизмы, такие как антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (ADCC) и/или комплементзависимая цитотоксичность (CDC), ингибирование пролиферации В-клеток и/или индукция смерти В-клеток (например, через апоптоз).

Термин «антитело» используется в данном контексте в самом широком смысле и конкретно охватывает моноклональные антитела, поликлональные антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела), образованные по меньшей мере из двух интактных антител, и фрагменты антител, пока они проявляют желаемую биологическую активность.

«Фрагменты антител» содержат часть интактного антитела, предпочтительно содержащую его антигенсвязывающий район. Примеры фрагментов антител включают в себя фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv; димерные антитела; линейные антитела; молекулы одноцепочечных антител и мультиспецифические антитела,

образованные из фрагментов антител.

Для целей данного изобретения «интактное антитело» является антителом, содержащим тяжелые и легкие вариабельные домены, а также Fc-район.

«Антитело, которое связывается с маркером В-клеточной поверхности», является молекулой, которая, после связывания с маркером В-клеточной поверхности, разрушает или истощает В-клетки у млекопитающего и/или препятствует одной или несколькими функциям В-клеток, например, уменьшением или предотвращением гуморальной реакции, индуцируемой В-клеткой. Это антитело предпочтительно способно истощать В-клетки (т.е. уменьшать уровни циркулирующих В-клеток) у млекопитающего при его введении. Такое истощение может достигаться через различные механизмы, такие как антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (ADCC) и/или комплементзависимая цитотоксичность (CDC), ингибирование пролиферации В-клеток и/или индукция смерти В-клеток (например, через апоптоз). В одном предпочтительном варианте осуществления это антитело индуцирует обширную клиническую реакцию. В другом предпочтительном варианте осуществления маркером В-клеточной поверхности является CD20, так что антитело, которое связывается с маркером В-клеточной поверхности, является антителом, которое связывается с CD20 или «CD20-антителом». Особенно предпочтительным вариантом осуществления является CD20-антитело, которое индуцирует обширную клиническую реакцию. Для целей данного изобретения «обширная клиническая реакция» определяется как достижение реакции American College Rheumatology 70 (ACR 70) в течение шести последовательных месяцев. Баллы реакции ACR подразделяются на ACR 20, ACR 50 и ACR 70, причем ACR 70 является наивысшим уровнем контроля признаков и симптомов в этой системе оценки. Баллы реакции ACR измеряют улучшение в активности заболевания ревматоидного артрита, в том числе опухании и болезненности суставов, боли, уровне потери трудоспособности и общей оценке пациента и врача. Примером другого типа антитела, которое индуцирует обширную клиническую реакцию, как признано FDA и как определено здесь, является этанерцепт (ENBREL®).

Примеры CD20-антител включают в себя: «C2B8», которое теперь называют «ритуксимабом» ("RITUXIMAB®") (Патент США №5736137); иттрий-[90]-меченое мышинное антитело 2B8, называемое "Y2D8", или "Ibritumomab Tiuxetan" (ZEVALIN®), коммерчески доступное из IDEC Pharmaceuticals, Inc. (Патент США №5736137; 2B8, депонированное ATCC под номером доступа HB11388 22 июня 1993 года); мышинный IgG2a «B1», также называемый "Тозитумомаб," необязательно меченый ¹³¹I для генерирования антитела "¹³¹I-B1", или "Тозитумомаб с ¹³¹I (BEXXAR™), коммерчески доступный из Corixa (см. также Патент США №5595721); мышинное моноклональное антитело "1F5" (Press et al., Blood 69(2):584-591 (1987) и его варианты, в том числе содержащий «участки каркаса» или гуманизированный 1F5 (WO 2003/002607, Leung, S.; депозит ATCC HB-96450); мышинное антитело 2H7 и химерное антитело 2H7 (Патент США №5677180); гуманизированное антитело 2H7 (WO 2004/056312 (Lowman et al.), приведенное ниже; полностью человеческое, высокоаффинное антитело HUMAX-CD20™, нацеленное на молекулу CD20 в клеточной мембране В-клеток (Genmab, Denmark; см., например, Glennie and van de Winkel, Drug Discovery Today 8: 503-510 (2003) и Cragg et al., Blood 101: 1045-1052 (2003)); моноклональные антитела человека описаны в WO 04/035607 (Teeling et al.); антитело AME-133™ (Applied Molecular Evolution); антитело A20 или его варианты, такие как химерное или гуманизированное антитело A20 (сA20, hA20

соответственно) (Патент США 2003/0219433, Immunomedics); и моноклональные антитела L27, G28-2, 93-1B3, B-C1 или NU-B2, доступные из International Leukocyte Typing Workshop (Valentine et al., In: Leukocyte Typing III (McMichael, Ed., p.440, Oxford University Press (1987)). Предпочтительными CD20-антителами здесь являются

5 химерные, гуманизированные или человеческие CD20-антитела, более предпочтительно ритуксимаб, гуманизированное антитело 2H7, химерное или гуманизированное антитело A20 (Immunomedics) и CD20-антитело человека HUMAX-CD20™ (Genmab).

10 Термин «ритуксимаб» или «RITUXAN®» относится здесь к генетически сконструированному химерному мышь/человек моноклональному антителу, направленному против антигена CD20 и обозначаемому "C2B8" в патенте США №5736137, в том числе к его фрагментам, которые сохраняют способность

15 связывать CD20.

Исключительно для целей данного изобретения и если нет других указаний, «гуманизированным 2H7» называют гуманизированное CD20-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где это антитело является эффективным для истощения В-клеток приматов *in vivo*, причем это антитело содержит в его

20 переменном районе Н-цепи (V_H) по меньшей мере последовательность CDR H3 SEQ ID NO:12 (фиг.1B) из антитела против CD20 человека и по существу консенсусные остатки каркасного района (FR) человека тяжелой цепи подгруппы III человека (V_HIII). В предпочтительном варианте осуществления это антитело

25 дополнительно содержит последовательность CDR H1 Н-цепи SEQ ID NO:10 и последовательность CDR H2 SEQ ID NO:11 и более предпочтительно дополнительно содержит последовательность CDR L1 L-цепи SEQ ID NO:4, последовательность CDR L2 SEQ ID NO:5, последовательность CDR L3 SEQ ID NO:6 и по существу консенсусные остатки каркасного района (FR) легкой цепи подгруппы I (VI)

30 человека, где V_H-район может быть присоединен к константному району цепи IgG человека, где этим районом может быть, например, IgG1 или IgG3. См. также WO 2004/056312 (Lowman et al.).

В предпочтительном варианте осуществления такое антитело содержит V_H-последовательность SEQ ID NO:8 (v16, показанную на фиг.1B), необязательно

35 содержит также V_L-последовательность SEQ ID NO:2 (v16, показанную на фиг.1A), которые могут иметь аминокислотные замены D56A и N100A в Н-цепи и S92A в L-цепи (v96). Предпочтительно, это антитело является интактным антителом, содержащим аминокислотные последовательности легкой и тяжелой цепей SEQ ID

40 NO: 13 и 14 соответственно, показанные на фиг.2 и 3. Другим предпочтительным вариантом осуществления является вариант, где этим антителом является 2H7.v31, содержащее аминокислотные последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO:13 и 15 соответственно, показанные на фиг.2 и 4. Это антитело может дополнительно

45 содержать по меньшей мере одну аминокислотную замену в Fc-районе, которая улучшает активность ADCC и/или CDC, например антитело, в котором этими аминокислотными заменами являются S298A/E333A/K334A, более предпочтительно антитело 2H7.v31, имеющее аминокислотную последовательность SEQ ID NO:15 (показанную на фиг.4). Другим предпочтительным вариантом осуществления

50 является антитело 2H7.v138, содержащее аминокислотные последовательности легкой и тяжелой цепей SEQ ID NO:28 и 29 соответственно, показанные на фиг.5 и 6, которые являются сопоставлениями таких последовательностей с соответствующими аминокислотными последовательностями легкой и тяжелой цепей 2H7.v16.

Альтернативно, таким предпочтительным интактным гуманизированным антителом 2Н7 является 2Н7.v477, которое имеет последовательности легкой и тяжелой цепи 2Н7.v138, за исключением аминокислотной замены N434W. Любое из этих антител может дополнительно содержать по меньшей мере одну аминокислотную замену в Fc-районе, которая уменьшает активность CDC, например содержит по меньшей мере замену K322A. См. Патент США №6528624 B1 (Idusogie et al.).

Наиболее предпочтительными гуманизированными вариантами 2Н7 являются варианты, имеющие вариабельный домен легкой цепи SEQ ID NO:2 и вариабельный домен тяжелой цепи SEQ ID NO:8, т.е. варианты с заменами или без замен в Fc-районе, и варианты, имеющие вариабельный домен тяжелой цепи с изменением N100 A или D56A и N100 A в SEQ ID NO:8 и вариабельный домен легкой цепи с изменением M32L, или S92A, или M32L и S92A в SEQ ID NO:2, т.е. с заменами или без замен в Fc-районе. Если в Fc-районе произведены замены, они предпочтительно являются одной из замен, представленных в таблице ниже.

Таким образом, в различных предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения V-район вариантов на основе версии 16 2Н7 будет иметь аминокислотные последовательности v16 за исключением положений аминокислотных замен, которые показаны в таблице ниже. Если нет других указаний, эти варианты 2Н7 будут иметь ту же самую L-цепь, что и L-цепь v16.

Версия 2Н7	Изменения тяжелой цепи (V _H)	Изменения легкой цепи (V _L)	Изменения Fc
16			-
31	-	-	S298A, E333A, K334A
73	N100 A	M32L	
75	N100 A	M32L	S298A, E333A, K334A
96	D56A, N100A	S92A	
114	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A
115	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, E356D, M358L
116	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, K334A, K322A
138	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, K326A
477	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, K326A, N434W
375	-	-	K334L

Особенно предпочтительным гуманизированным 2Н7 является

интактное антитело или фрагмент антитела, содержащие
 переменную последовательность легкой цепи:

5 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFSGSGSGT
 DFTLTISLQPEDFATYYCQQWSFNPPTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:2);

и переменную последовательность тяжелой цепи:

10 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSYNQKFK
 GRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSNSYWFYFDVWGQGLTVTVSS (SEQ ID
 NO:8).

15 Когда гуманизированное антитело 2H7 является интактным
 антителом, предпочтительно оно содержит аминокислотную
 последовательность легкой цепи:

20 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFSGSGSGT
 DFTLTISLQPEDFATYYCQQWSFNPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN
 FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP
 VTKSFNRGEC (SEQ ID NO:13);

25 и аминокислотную последовательность тяжелой цепи:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSYNQKFK
 GRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSNSYWFYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSV
 FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVPSSSL
 30 GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
 VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
 KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
 TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:14)

35 или аминокислотную последовательность тяжелой цепи:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSYNQKFK
 GRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSNSYWFYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSV
 40 FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVPSSSL
 GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
 VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
 KALPAPIAATISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
 TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:15).

45 В другом предпочтительном варианте осуществления, интактное
 гуманизированное антитело 2H7 содержит аминокислотную

50

последовательность легкой цепи:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSR
 FSGSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQQWAFNPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS
 DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLT
 SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:28)

и аминокислотную последовательность тяжелой цепи:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG
 YTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGATSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSL
 RAEDTAVYYCARVVYYASASYWYFDVWVGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA
 LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN
 VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
 VVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
 KVSNAALPAPIAATISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
 ESNQGPENNYKTTTPVLDSGSSFLYSLKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSL
 SLSPGK (SEQ ID NO:29).

«Антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность» и «ADCC» обозначает клеточно-опосредованную реакцию, в которой неспецифические цитотоксические клетки, которые экспрессируют Fc-рецепторы (FcR) (например, природные клетки-киллеры (НК-клетки), нейтрофилы и макрофаги), узнают связанное антитело на клетке-мишени и затем вызывают лизис клетки-мишени. Первичные клетки для опосредования ADCC, НК-клетки, экспрессируют только FcγRIII, тогда как моноциты экспрессируют FcγRI, FcγRII и FcγRIII. Экспрессия FcR на гемопоэтических клетках суммирована в таблице 3 на странице 464 Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457 (1991). Для оценки активности ADCC представляющей интерес молекулы может быть выполнен анализ ADCC in vitro, такой как описанный в Патенте США №5500362 или 5821337. Применимые эффекторные клетки для такого анализа включают в себя моноклеарные клетки периферической крови (PBMC) и природные клетки-киллеры (НК-клетки). Альтернативно или дополнительно активность ADCC представляющей интерес молекулы может оцениваться in vivo, например, в модели животного, такой как описанная в Clynes et al., PNAS (USA) 95:652-656 (1998).

«Эффекторными клетками человека» являются лейкоциты, которые экспрессируют один или несколько FcR и выполняют эффекторные функции. Предпочтительно, эти клетки экспрессируют по меньшей мере FcγRIII и выполняют ADCC-эффекторную функцию. Примеры лейкоцитов человека, которые опосредуют ADCC, включают в себя моноклеарные клетки периферической крови (PBMC), природные клетки-киллеры (НК-клетки), моноциты, цитотоксические Т-клетки и нейтрофилы; причем предпочтительными являются PBMC и НК-клетки.

Термины «Fc-рецептор» или «FcR» используются для описания рецептора, который связывается с Fc-районом антитела. Предпочтительным FcR является FcR человека с нативной последовательностью. Кроме того, предпочтительным FcR является FcR, который связывает IgG-антитело (гамма-рецептор) и включает в себя подклассы FcγRI, FcγRII и FcγRIII, в том числе аллельные варианты и альтернативно сплайсированные формы этих рецепторов. Рецепторы FcγRII включают в себя

FcγRIIA («активирующий рецептор») и FcγRIIB («ингибирующий рецептор»), которые имеют сходные аминокислотные последовательности, которые различаются прежде всего в их цитоплазматических доменах. Активирующий рецептор FcγRIIA содержит имунорецепторный мотив активации на основе тирозина (ITAM) в его цитоплазматическом домене. Ингибирующий рецептор FcγRIIB содержит имунорецепторный мотив ингибирования на основе тирозина (ITIM) в его цитоплазматическом домене (см. Daeron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). FcR обсуждаются в обзоре Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457 (1991); Capel et al., *Immunomethods* 4:25-34 (1994) и de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-341 (1995). Другие FcR, в том числе FcR, которые будут идентифицированы в будущем, включены в используемый здесь термин «FcR». Этот термин включает в себя неонатальный рецептор, FcRn, который является ответственным за перенос материнских IgG в плод (Guyer et al., *J. Immunol.* 117:587 (1976) и Kim et al., *J. Immunol.* 24:249 (1994)).

«Комплементзависимая цитотоксичность» или "CDC" обозначает способность молекулы лизировать мишень в присутствии комплемента. Путь активации комплемента инициируется связыванием первого компонента системы комплемента (C1q) с молекулой (например, антителом), находящейся в комплексе с родственным антигеном. Для оценки активации комплемента может быть выполнен анализ CDC, например анализ, описанный в Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996).

«Ингибирующими рост антителами» являются антитела, которые предотвращают или уменьшают пролиферацию клетки, экспрессирующей антиген, с которым связывается это антитело. Например, это антитело может предотвращать или уменьшать пролиферацию В-клеток *in vitro* и/или *in vivo*.

Антитела, которые «индуцируют апоптоз», являются антителами, которые индуцируют программированную смерть клеток, например В-клетки, как определено стандартными анализами апоптоза, такими как связывание аннексина V, фрагментация ДНК, сжатие клеток, расширение эндоплазматического ретикулума, фрагментация клеток и/или образование мембранных пузырьков (называемых апоптотическими телами).

«Нативные антитела» являются обычно гетеротетрамерными гликопротеинами приблизительно 150000 дальтон, составленными из двух идентичных легких (L) цепей и двух идентичных тяжелых (H) цепей. Каждая легкая цепь связана с тяжелой цепью одной ковалентной дисульфидной связью, в то время как количество дисульфидных связей варьируется среди тяжелых цепей различных изотипов иммуноглобулина. Каждая тяжелая и легкая цепь имеет также расположенные с регулярными интервалами внутрицепочечные дисульфидные мостики. Каждая тяжелая цепь имеет на одном конце переменный домен (V_H), за которым следует ряд константных доменов. Каждая легкая цепь имеет переменный домен на одном конце (V_L) и константный домен на ее другом конце; константный домен легкой цепи выровнен с первым константным доменом тяжелой цепи, а переменный домен легкой цепи выровнен с переменным доменом тяжелой цепи. Считается, что конкретные аминокислотные остатки образуют поверхность раздела между переменными доменами легкой цепи и тяжелой цепи.

Термин «переменные» относится к тому факту, что определенные части переменных доменов различаются в сильной степени по последовательности среди антител и используются в связывании и специфичности каждого конкретного

антитела в отношении его конкретного антигена. Однако эта вариабельность не распределена равномерно по вариабельным доменам антител. Она сконцентрирована в трех сегментах, называемых гипервариабельными районами, в вариабельных доменах как легкой цепи, так и тяжелой цепи. Более высоко консервативные части вариабельных доменов называют каркасными районами (FR). Вариабельные домены нативной тяжелой и легкой цепи каждые содержат четыре FR, в значительной степени принимающих β -складчатую конфигурацию, соединенных тремя гипервариабельными районами, которые образуют петли, соединяющие и в некоторых случаях образующие ее часть, β -складчатую структуру. Эти гипервариабельные районы в каждой цепи удерживаются вместе в тесной близости этими FR и, с гипервариабельными районами из другой цепи, способствуют образованию антигенсвязывающего сайта антител (см. Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Константные домены не участвуют непосредственно в связывании антитела с антигеном, но принимают участие в антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC).

Расщепление папаином антител дает два идентичных антигенсвязывающих фрагмента, названных «Fab»-фрагментами, каждый из которых имеет единственный антигенсвязывающий сайт, и остаточный «Fc»-фрагмент, название которого отражает его способность легко кристаллизоваться. Обработка пепсином дает $F(ab')_2$ фрагмент, который имеет два антигенсвязывающих сайта и сохраняет способность к перекрестному сшиванию антигена.

«Fv» является минимальным фрагментом антитела, который содержит полный сайт узнавания и связывания антигена. Этот район состоит из димера одного вариабельного домена тяжелой цепи и одного вариабельного домена легкой цепи в плотной, нековалентной ассоциации. Именно в этой конфигурации три гипервариабельных района каждого вариабельного домена взаимодействуют для определения антигенсвязывающего сайта на поверхности димера V_H-V_L . Вместе эти шесть гипервариабельных районов придают антителу антигенсвязывающую специфичность. Однако даже единственный вариабельный домен (или половина Fv, содержащая только три гипервариабельных района, специфических в отношении антигена) способен узнавать и связывать антиген, хотя и при более низкой аффинности, чем полный сайт связывания.

Fab-фрагмент содержит также константный домен легкой цепи и первый константный домен (CH1) тяжелой цепи. Fab'-фрагменты отличаются от Fab-фрагментов добавлением нескольких остатков на карбокси-конце домена CH1 тяжелой цепи, включающих в себя один или несколько цистеинов из шарнирной области антитела. Fab'-SH является в данном контексте обозначением Fab', в котором цистеиновый остаток (остатки) константных доменов несут по меньшей мере одну свободную тиоловую группу. $F(ab')_2$ -фрагменты антитела образуются первоначально в виде пары Fab'-фрагментов, которые имеют между ними шарнирные цистеины. Известны также другие химические связывания фрагментов антител.

«Легкие цепи» антител (иммуноглобулинов) из любых видов позвоночных могут быть причислены к одному из двух явно различных типов, названных каппа (κ) и лямбда (λ), на основе аминокислотных последовательностей их константных доменов.

В зависимости от аминокислотной последовательности константного домена их

тяжелых цепей антитела могут быть причислены к различным классам. Имеются пять основных классов интактных антител: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них могут быть дополнительно подразделены на подклассы (изотипы), например IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA и IgA2. Константные домены тяжелой цепи, которые соответствуют различным классам антител, названы α , δ , ϵ , γ и μ соответственно. Субъединичные структуры и трехмерные конфигурации различных классов иммуноглобулинов хорошо известны.

«Одноцепочечные Fv-» или «scFv»-фрагменты антител содержат домены V_H и V_L антитела, где эти домены присутствуют в одноцепочечной полипептидной цепи. Предпочтительно, полипептид Fv дополнительно содержит полипептидный линкер между доменами V_H и V_L , который позволяет scFv образовывать желаемую структуру для связывания антигена. В отношении обзора scFv см. Plucktun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, p.269-315 (1994).

Термин «димерные антитела» относится к малым фрагментам антител с двумя антигенсвязывающими сайтами, причем эти фрагменты содержат вариабельный домен тяжелой цепи (V_H), соединенный с вариабельным доменом легкой цепи (V_L) в одной и той же полипептидной цепи (V_H - V_L). Использование линкера, который является слишком коротким, чтобы сделать возможным спаривание между двумя доменами на одной и той же цепи, заставляет эти домены спариваться с комплементарными доменами другой цепи и создавать два антигенсвязывающих сайта. Димерные антитела описаны более полно, например, в EP 404097; WO 93/11161 и Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993).

Термин «моноклональное антитело» обозначает в данном контексте антитело, полученное из популяции по существу гомогенных антител, т.е. индивидуальные антитела, составляющие эту популяцию, являются идентичными и/или связывают один и тот же эпитоп, за исключением возможных вариантов, которые могут возникать во время получения моноклонального антитела, причем такие варианты обычно присутствуют в минорных количествах. В отличие от поликлонального антитела препараты обычно включают в себя различные антитела, направленные против различных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело направлено против единичной детерминанты на этом антигене. Кроме их специфичности, моноклональные антитела являются предпочтительными вследствие того, что они не имеют примесей других иммуноглобулинов. Определение «моноклональное» указывает на характер этого антитела как полученного по существу из гомогенной популяции антител, которое не должно рассматриваться как требующее получения этого антитела каким-либо конкретным способом. Например, моноклональные антитела, которые должны использоваться в соответствии с данным изобретением, могут быть получены гибридомным способом, впервые описанным Kohler et al., Nature, 256:495 (1975), или могут быть получены способами рекомбинантных ДНК (см., например, Патент США №4816567). «Моноклональные антитела» могут быть выделены из фаговых библиотек антител с использованием способов, описанных, например, в Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991) и Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991).

Моноклональные антитела в данном контексте конкретно включают в себя «химерные» антитела (иммуноглобулины), в которых часть тяжелой и/или часть легкой цепи является идентичной или гомологичной соответствующим последовательностям в антителах, полученных из конкретного вида или

принадлежащих к конкретному классу или подклассу антител, тогда как остальная цепь является идентичной или гомологичной соответствующим последовательностям в антителах, полученных из другого вида или принадлежащих другому классу или подклассу антител, а также фрагменты таких антител, пока они проявляют желаемую биологическую активность (Патент США №4816567; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)). Химерные антитела, представляющие интерес здесь, включают в себя «приматизированные» антитела, содержащие антигенсвязывающие последовательности вариабельного домена, полученные из примата нечеловека (например, низшей узконосой обезьяны (мартышки), такой как павиан, макак резус или собакоголовая обезьяна), и последовательности константного района человека (Патент США №5693780).

«Гуманизированные» формы антител нечеловека (например, мышинных антител) являются химерными антителами, которые содержат минимальную последовательность, полученную из иммуноглобулина нечеловека. Большей частью, гуманизированные антитела являются иммуноглобулинами человека (реципиентное антитело), в которых остатки из гипервариабельного района реципиентного антитела заменены остатками из гипервариабельного района вида нечеловека (донорное антитело), такого как мышь, кролик или примат нечеловек, имеющими желаемую специфичность, аффинность и эффективность. В некоторых случаях остатки каркасного района (FR) иммуноглобулина человека заменены соответствующими остатками нечеловека. Кроме того, гуманизированные антитела могут содержать остатки, которые не обнаруживаются в реципиентном антителе или в донорном антителе. Эти модификации готовят для дополнительного усовершенствования производительности антител. Обычно гуманизированное антитело будет содержать по существу все по меньшей мере из одного и обычно двух вариабельных доменов, в которых все или по существу все из гипервариабельных петель соответствуют гипервариабельным петлям иммуноглобулина нечеловека и все или по существу все из FR являются FR последовательностями иммуноглобулина человека, за исключением замены (замен) FR, указанных выше. Это гуманизированное антитело будет также необязательно содержать по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина, обычно часть константной области иммуноглобулина человека. В отношении дополнительных подробностей см. Jones et al., Nature 321:522- 525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988) и Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992).

Термин «гипервариабельный район» обозначает в данном контексте аминокислотные остатки антитела, которые ответственны за связывание антигена. Гипервариабельный район содержит аминокислотные остатки из «определяющего комплементарность района» или «CDR» (например, остатки 24-34 (L1), 50-56 (L2) и 89-97 (L3) в вариабельном домене легкой цепи и 31-35 (H1), 50-65 (H2) и 95-102 (H3) в вариабельном домене тяжелой цепи; Kabat et. al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) и/или остатки из «гипервариабельной петли» (например, остатки 26-32 (L1), 50-52 (L2) и 91-96 (L3) в вариабельном домене легкой цепи и 26-32 (H1), 53-55 (H2) и 96-101 (H3) в вариабельном домене тяжелой цепи; Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). «Каркасные» или «FR»-остатки являются остатками вариабельного домена, другими, чем остатки гипервариабельного района, определенные здесь.

«Голое антитело» является антителом (определенным здесь), которое не

конъюгировано с гетерологичной молекулой, такой как цитотоксическая часть молекулы или радиоактивная метка.

«Выделенным антителом» является антитело, которое было идентифицировано и выделено и/или извлечено из компонента его природного окружения.

Загрязняющими компонентами его природного окружения являются вещества, которые могли бы препятствовать диагностическим или терапевтическим применениям этого антитела, и могут включать в себя ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворенные вещества. В предпочтительном варианте осуществления это антитело будет очищенным (1) до более чем 95 мас.% антитела, как определено по методу Лоури, и наиболее предпочтительно до более чем 99 мас.%, (2) до степени, достаточной для получения по меньшей мере 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности с использованием секвенатора с вращающейся чашей, или (3) до гомогенности при помощи электрофореза в ДСН-ПААГ при восстанавливающих и невосстанавливающих условиях с использованием Кумасси синего или, предпочтительно, содержащего серебро красителя. Выделенное антитело включает в себя антитело *in situ* в рекомбинантных клетках, так как по меньшей мере один компонент природного окружения этого антитела не будет присутствовать. Однако, обычно, выделенное антитело будет получено с использованием по меньшей мере одной стадии очистки.

«ANCA-ассоциированный васкулит» или «ассоциированный с антинейтрофильными цитоплазматическими антителами васкулит» или «AAV» обозначает в данном контексте аутоиммунное заболевание или нарушение, включающее в себя васкулит (или воспаление стенок кровеносных сосудов), в котором в крови этого индивидуума обычно присутствуют циркулирующие антинейтрофильные цитоплазматические антитела (ANCA) или присутствуют другие клинические проявления, которые определяют васкулит, как отмечается ниже. Термин «ANCA-ассоциированный васкулит» относится в данном контексте к ANCA-ассоциированному васкулиту независимо от типа и стадии или тяжести и независимо от того, какие симптомы являются очевидными, при условии, что диагноз поставлен. Примеры ANCA-ассоциированного васкулита включают в себя микроскопическую полиангиопатию, гранулематоз Вегенера, синдром Churg-Strauss, ограниченный почками васкулит (идиопатический некротизирующий серповидный гломерулонефрит) и некоторые типы индуцированного лекарственными средствами васкулита. Диагностические способы для ANCA-ассоциированного васкулита и его проявлений включают в себя представленные ниже способы диагностики.

Несколько диагностических тестов обычно используют на людях, у которых подозревают наличие ANCA-ассоциированного васкулита. Признаки, которые могут способствовать определению конкретного типа васкулитного нарушения, включают в себя тип вовлечения органа в патологический процесс, присутствие и тип ANCA (миелопероксидазы-ANCA или протеиназы-3-ANCA), присутствие сывороточных криоглобулинов и присутствие доказательства гранулематозного воспаления.

Примеры аутоантител, ассоциированных с ANCA-ассоциированным васкулитом, включают в себя повышенный уровень антинуклеарных антител (ANA), антител против ревматоидного фактора (RF), креатинина, азота мочевины крови, антиэндотелиальных антител, антинейтрофильных цитоплазматических антител (ANCA), таких как аутоантитела, направленные против протеиназы 3 (PR3) или против миелопероксидазы (MPO), или их комбинации.

ANCA-антитела могут быть детектированы с использованием

антигенспецифического иммунохимического анализа для характеристики PR3-ANCA и MPO-ANCA. Niles et al., *supra*. Поскольку тест ELISA для ANCA ассоциирован с существенно более положительной прогностической величиной и коэффициентами вероятности в отношении ANCA-ассоциированного васкулита, тесты ELISA могут выполняться только на пробах, которые являются положительными в отношении ANCA в соответствии с иммунофлуоресценцией. Stone et al., *Arthritis Care and Research*, 13: 424-34 (2000); Comment on *Arthritis Care Res.* 13: 341-342 (2000); Russell et al., *Clin. Immunol.*, 103: 196-203 (2002).

Приблизительно 10 процентов пациентов с микроскопической полиангиопатией (наиболее частым типом ANCA-ассоциированного васкулита) и гранулематозом Вегенера имеют отрицательные анализы на ANCA; однако этот результат не исключает полностью эти заболевания, и титры ANCA не всегда коррелируют с активностью заболевания. Jennette and Falk, *N. Engl J. Med.*, *supra*. С другой стороны, положительный анализ ANCA не является единственно диагностическим для ANCA-ассоциированного васкулита.

Таблица 1 суммирует потенциальные клинические проявления ANCA-ассоциированного васкулита, который должен подозреваться в любом пациенте, который предоставляет мультисистемное заболевание, не обусловленное инфекциями или злокачественным процессом (например, почечная дисфункция, кожные сыпи, легочные проявления или неврологические проявления). Конституциональные симптомы являются обычными. Частота и комбинация вовлечения в патологический процесс различных систем варьируются среди индивидуальных случаев заболевания. См. также Guillevin et al., *Arthritis Rheum.* 42: 421-430 (1999); Pettersson et al., *Clin. Nephrol.* 43:141-149 (1995); Savage et al., *Lancet* 349: 553-558 (1997); Guillevin et al., *Br. J. Rheumatol* 35:958-964 (1996).

Таблица 1

Клинические проявления ANCA-ассоциированного васкулита	
Система	Проявления
Конституциональные	Лихорадка, потеря массы, анорексия, общее недомогание
Мышечно-скелетные	Миалгия, артралгия
Кожа	Пальпируемая пурпура, крапивница
Почки	Протеинурия, гематурия, почечная недостаточность, некротизирующий гломерулонефрит
Дыхательные пути	Одышка, кашель, кровохарканье; инфильтрат легких, интерстициальное легочное заболевание, легочное кровотечение
Нервная система	Периферическая невропатия, в частности мононеврит
Желудочно-кишечный тракт	Кровь в кале, повышенные ферменты печени; диарея, тошнота, рвота, боль в животе

Наиболее общим кожным повреждением является пальпируемая пурпура - слегка повышенная, неотшелушиваемая сыпь, которая обычно начинается на нижних конечностях. Иногда эта сыпь является везикулярной или слегка изъязвленной. Крапивница может быть также проявлением ANCA-ассоциированного васкулита. В отличие от не васкулитной аллергической крапивницы васкулитная крапивница длится более чем один день и может развиваться в пурпурные повреждения. Присутствие гипокомплементемии может указывать на то, что этот васкулит является опосредованным иммунным комплексом, а не ANCA-ассоциированным васкулитом.

Вовлечение почек при васкулите может прогрессировать в почечную недостаточность. Результаты биопсии почки обычно выявляет гломерулонефрит. Очаговый некроз, серповидное формирование и отсутствие или малое количество отложений иммуноглобулина характеризуют гломерулонефрит у пациентов с ANCA-

ассоциированным васкулитом. Pettersson et al., Clin Nephrol. 43:141-149 (1995). Вовлечение легких при патологическом процессе находится в диапазоне от мелких очаговых инфильтратов или интерстициального заболевания до массивного легочного геморрагического альвеолярного капиллярита. Он является наиболее угрожающим жизни васкулитом малых сосудов.

Однако важно дифференцировать ANCA-ассоциированный васкулит от других заболеваний, которые приводят к мультисистемным проявлениям. Заболевания с широко распространившейся в различные органы эмболизацией (например, атероземболическое заболевание, эндокардит, антифосфолипидный синдром и атриальная миксома) могут давать сходные клинические проявления. Kelly, "Vasculitis and related disorders" In: Textbook of Rheumatology. 5th ed. (Philadelphia: Saunders, 1997), p.1079-1101. Лица с сепсисом могут также проявлять мультисистемное вовлечение. Важно также понимать, что ANCA-ассоциированный васкулит может быть вторичным относительно инфекций или злокачественности. Некоторые вирусные, бактериальные и грибковые инфекции могут быть осложнены васкулитом, который является предпочтительно дермальным васкулитом. Этот диагноз предполагают на основании клинического анамнеза. Злокачественность, например лимфомы, лейкозы, миелопролиферативные и миелодиспластические синдромы, могут быть ассоциированы с ANCA-ассоциированным васкулитом; но солидные опухоли менее часто ассоциированы с таким васкулитом. Основные инфекции или случаи рака должны быть тщательно оценены перед установлением диагноза ANCA-ассоциированного васкулита, даже если анализ на ANCA является положительным.

Таблица 2 изображает некоторые клинические признаки, которые могут помочь в диагностике конкретного типа васкулита. Лабораторная оценка должна включать в себя полный анализ крови и рутинный химический профиль, анализ мочи, тест на фекальную скрытую кровь и рентгенографию грудной клетки. Может присутствовать нормоцитарная анемия, тромбоцитоз, повышенная скорость седиментации эритроцитов, увеличенная функция печени или доказательство вовлечения в патологический процесс почек. Должны быть также измерены сывороточные уровни ANCA. Другие лабораторные тесты, которые должны быть также выполнены для исключения ANCA-ассоциированного васкулита, включают в себя тестирование на антинуклеарное антитело, ревматоидный фактор, криоглобулины, комплемент, антитела к гепатиту В и С и вирус иммунодефицита человека (ВИЧ). Могут быть также выполнены необязательно компьютерные томографические сканирования грудной клетки и синусов. Исследование на патологию пораженной ткани (например, кожи, нервной ткани, легкого или почки) может способствовать в установлении типа ANCA-ассоциированного васкулита. Должна быть получена биопсия из симптоматических и доступных участков. Биопсии из бессимптомных участков имеют низкий выход положительных результатов.

Таблица 2

Клинические признаки, которые способствуют диагностике конкретного типа васкулита

Клинические признаки	Возможный тип васкулита
Легочные и почечные симптомы	Гранулематоз Вегенера; Микроскопическая полиангиопатия
Легочно-дермальные симптомы	Криоглобулинемия; пурпура Геноха-Шенлейна
Астма и эозинофилия	Синдром Churg-Strauss
Поражение верхних дыхательных путей	Гранулематоз Вегенера (например, синусит и отит среднего уха)

Информация в таблице 2 взята из Jennette and Falk, N. Engl. J. Med., *supra* и Kelly, *supra*.

Гранулематоз Вегенера характеризуется некротизирующими гранулемами
 5 верхних и нижних дыхательных путей вместе с гломерулонефритом и системным
 васкулитом, который поражает обычно сосуды среднего размера, с образованием
 гранулем и некрозом паренхимы. Kelly, *supra*. Признаки и симптомы верхних
 10 дыхательных путей включают в себя синусит, назальные язвы, отит среднего уха или
 потерю слуха. Признаки и симптомы верхних дыхательных путей наблюдаются у 70
 процентов пациентов, а легочные инфильтраты или узелки, которые могут
 образовывать полости, развиваются у 85 процентов пациентов. Kelly, *supra*.
 Сывороточное антитело ANCA против протеазы 3 (c-ANCA) является
 15 положительным в 75-90 процентах, хотя 20 процентов могут иметь положительное
 антитело p-ANCA. Наиболее характерным диагностическим тестом является
 открытая биопсия легкого. Синусная биопсия является диагностической только в 30
 процентах случаев, так как обнаруживаемые воспалительные явления являются
 часто неспецифическими, а почечная биопсия является также относительно
 20 неспецифической. Результаты рентгенографии показывают затемнения средней и
 нижней зоны, которые являются диффузными и как альвеолярными, так и
 интерстициальными. Узелки, которые могут образовывать полости, являются
 редкими у детей. Компьютерно-томографическое сканирование может показывать
 25 диффузные, плохо ограниченные периваскулярные затемнения. Гранулематоз
 Вегенера может поражать пациентов в любом возрасте с пиком встречаемости во
 время четвертой декады жизни и является не много более частым у мужчин. Duna et
 al., *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 21:949-986 (1995). Наиболее определяющим способом
 30 диагностики гранулематоза Вегенера является выполнение биопсии пораженного
 участка органа (обычно синусов, легкого или почки) для подтверждения
 присутствия васкулита и гранулем, которые вместе являются диагностическими
 признаками этого заболевания.

Микроскопическая полиангиопатия характеризуется присутствием ANCA и малым
 количеством или отсутствием иммунных отложений в пораженных органах. Savage et
 35 al., *Lancet* 349:553-558 (1997). У 90 процентов пациентов, которые имеют этот тип
 васкулита, почки являются наиболее часто поражаемыми органами. Kelly, *supra*.
 Пациенты представляют вариабельные комбинации почечных проявлений,
 пальпируемой пурпуры, боли в животе, кашля и кровохарканья. Большинство
 40 пациентов имеют положительные MPO-ANCA (p-ANCA), хотя у 40 процентов
 пациентов могут также присутствовать PR3-ANCA (c-ANCA). Наиболее частым
 возрастом появления являются 40-60 лет, и наиболее частым полом пациентов
 является мужской пол.

Синдром Churg-Strauss является редким заболеванием и имеет три фазы:
 45 аллергический ринит и астма, эозинофильное инфильтративное заболевание,
 похожее на пневмонию, и системный васкулит малых сосудов с гранулематозным
 воспалением. Guillevin et al., *Br. J. Rheumatol* 35:958-964 (1996). Васкулитная фаза
 обычно развивается в пределах трех лет с момента возникновения астмы. Почти все
 50 пациенты имеют более 10 процентов эозинофилов в крови. Коронарный артериит и
 миокардит являются основными причинами болезненности и смертности. Возраст
 появления варьируется от 15 до 70 лет, и это заболевание чаще встречается у
 мужчин. Индуцированный лекарственными средствами васкулит обычно развивается

в пределах семи дней - 21 дня после начала приема лекарственного средства и может ограничиваться кожей. Jennette and Falk, N. Engl J Med., supra. Кожные повреждения идентичны повреждениям, наблюдаемым в системном васкулите малых сосудов.

Лекарственные средства вызывают приблизительно 10 процентов васкулитных повреждений кожи. Лекарственные средства, которые могут вызывать васкулит, включают в себя пенициллин, аминопенициллин, сульфонамиды, аллопуринол, тиазиды, хинолоны, гидантоины и пропилтиоурацил. Некоторые лекарственные средства, такие как пропилтиоурацил и гидралазин (APRESOLINE™), по-видимому, вызывают васкулит индукцией ANCA.

Другим путем для тестирования на активное заболевание и определения, какие пациенты/индивидуумы могут быть выбраны для лечения, является определение величины Бирмингемского балла активности васкулита/гранулематоза Вегенера (BVAS/WG) пациента, большой или малой. Этот балл является показателем активности васкулита и предназначен для документирования клинических признаков, которые непосредственно связаны с активным гранулематозом Вегенера. Было обнаружено, что он является валидным и надежным болезнь-специфическим показателем в отношении гранулематоза Вегенера. Stone et al., Arthritis & Rheumatism, 44: 912-920 (2001). Он может быть также использован для других заболеваний ANCA-ассоциированного васкулита. Этот инструмент отделяет признаки, которые представляют новую или ухудшенную активность заболевания, от признаков, которые представляют персистирующую (стойкую) активность. Обычно балл BVAS/WG равен 3 или более (или был равен 3 или более в пределах 28 дней лечения). Каждый значительный результат в формате оценки BVAS/WG оценивается 3 баллами. Каждый минорный результат оценивается 1 баллом. Однако другим используемым результатом является то, что острое заболевание, либо первое представление, либо рецидив, показывает BVAS/WG по меньшей мере 10, тогда как персистирующее заболевание показывает BVAS/WG по меньшей мере 4. Хорошим маркером для гранулематоза Вегенера может быть также лимфопения. Izzedine et al., Nephron 92:466-471 (2002).

Термин «индивидуум» относится в данном контексте к индивидууму-человеку, в том числе пациенту, подходящему для лечения ANCA-ассоциированного васкулита, который испытывает или испытывал один или несколько признаков, симптомов или других показателей ANCA-ассоциированного васкулита, был диагностирован как имеющий ANCA-ассоциированный васкулит, независимо от того, например, был ли он диагностирован впервые или диагностирован ранее и испытывает теперь рецидив или возврат болезни, или находится при риске развития ANCA-ассоциированного васкулита. Этот индивидуум, возможно, лечился или не лечился ранее CD20-антителом. Индивидуум, подходящий для лечения ANCA-ассоциированного васкулита, может быть необязательно идентифицирован как индивидуум, который был подвергнут скринингу, например, крови на повышенные уровни инфильтрирующих CD20+ клеток или скринингу с использованием анализа для детектирования аутоантител, в котором продуцирование аутоантител оценивают качественно и, предпочтительно, количественно.

«Пациентом» называют в данном контексте индивидуума-человека, подходящего для лечения ANCA-ассоциированного васкулита, который испытывает или испытывал один или несколько признаков, симптомов или других показателей ANCA-ассоциированного васкулита, независимо от того, например, был ли он диагностирован впервые или диагностирован ранее и испытывает теперь

рецидив или возврат болезни. Этот пациент, возможно, лечился или не лечился ранее CD20-антителом. Пациент, подходящий для лечения ANCA-ассоциированного васкулита, может быть необязательно идентифицирован как индивидуум, который был подвергнут скринингу с использованием анализа для детектирования аутоантител, например, как отмечалось выше, в котором продуцирование аутоантител оценивают качественно и, предпочтительно, количественно.

«Лечение» индивидуума в данном контексте относится как к терапевтическому лечению, так и профилактическим или превентивным мерам. Индивидуумы, нуждающиеся в лечении, включают в себя индивидуумов, уже имеющих ANCA-ассоциированный васкулит, а также индивидуумов, у которых должен быть предотвращен ANCA-ассоциированный васкулит. Таким образом, индивидуум может быть диагностирован как имеющий ANCA-ассоциированный васкулит или может быть предрасположенным или восприимчивым к ANCA-ассоциированному васкулиту. Лечение индивидуума включает в себя соответствующую обработку пациента.

«Лечение» пациента обозначает в данном контексте терапевтическое лечение. Пациентами, нуждающимися в терапевтическом лечении, являются пациенты, имеющие диагноз ANCA-ассоциированного васкулита.

Для целей данного изобретения пациент или индивидуум находится в стадии «ремиссии», если он не имеет симптомов активного заболевания ANCA-ассоциированного васкулита, таких как симптомы, детектируемые описанными здесь способами, и не имел рецидива титров ANCA или повышения титров ANCA, совпадающих с восстановлением В-клеток или после восстановления В-клеток, так как было обнаружено, что поддерживаемые или рецидивирующие уровни ANCA являются прогностическими в отношении рецидивов у пациентов, находящихся в клинических стадиях ремиссии при гранулематозе Вегенера. Boomsma et al., Arthritis Rheum., 43: 2025-2033 (2000). Пациенты, которые не находятся в стадии ремиссии, включают в себя, например, пациентов, которые испытывают внезапное обострение заболевания после восстановления В-клеток, пациентов, страдающих от повреждения органов, например повреждения почек, или пациентов, которые являются бессимптомными, но имели рецидив ANCA или повышение титра ANCA, совпадающее с восстановлением В-клеток или после восстановления В-клеток. Такие индивидуумы и пациенты, испытывающие возврат симптомов, включающих в себя активное заболевание и/или повреждение органов, или проявляющие рецидивы, или повышение титров ANCA, являются пациентами, которые имеют «возврат заболевания» или имели «рецидив».

«Симптомом» ANCA-ассоциированного васкулита является любой болезненный феномен или отклонение от нормы в структуре, функции или ощущении, испытываемые индивидуумом или пациентом и свидетельствующие о заболевании, такие как указанные выше.

Выражение «эффективное количество» относится к количеству антитела или антагониста, которое является эффективным для лечения ANCA-ассоциированного васкулита.

«Воздействие антитела» обозначает в данном контексте контактирование с антителом или воздействие антитела в виде одной или нескольких доз, вводимых на протяжении периода времени приблизительно 1 день - приблизительно 5 недель. Эти дозы могут предоставляться один раз или при фиксированных или нерегулярных интервалах времени на протяжении этого периода воздействия, например в виде

одной дозы в неделю в течение четырех недель или в виде двух доз в неделю, разделенных интервалом времени приблизительно 13-17 дней. Первоначальное и последнее воздействия антитела разделены во времени одно от другого, как описано подробно здесь.

- 5 Воздействие, не обеспечиваемое до определенного времени «от первоначального воздействия» или от любого предыдущего воздействия, означает, что время для второго или более позднего воздействия измеряется от времени любой из доз из предыдущего воздействия, если в этом воздействии вводили более одной дозы.
- 10 Например, при введении двух доз при первоначальном воздействии второе воздействие осуществляют не ранее чем через по меньшей мере 16-54 недели от времени введения первой или второй дозы при этом более раннем воздействии. Подобным образом, при введении трех доз время второго воздействия может быть измерено от времени первой, второй или третьей дозы в более раннем воздействии.
- 15 Предпочтительно, время «от первоначального воздействия» или от любого предыдущего воздействия измеряют от времени первой дозы.

Термин «иммуносупрессивный агент», применяемый здесь в отношении дополнительной терапии, относится к веществам, которые действуют, подавляя или маскируя иммунную систему млекопитающего, которому их вводят. Они включают в себя вещества, которые подавляют продуцирование цитокинов, отрицательно регулируют или подавляют экспрессию аутоантигенов или маскируют антигены МНС. Примеры таких агентов включают в себя 2-амино-6-арил-5-замещенные пиримидины (см. Патент США №4665077); нестероидные противовоспалительные лекарственные средства (NSAID); ганцикловир, такролимус, глюкокортикоиды, такие как кортизол или альдостерон, противовоспалительные агенты, такие как ингибитор циклооксигеназы, ингибитор 5-липоксигеназы или антагонист рецептора лейкотриенов; пуриновые антагонисты, такие как азатиоприн или микофенолят-мофетил (MMF); алкилирующие агенты, такие как циклофосфамид; бромкриптин; даназол; дапсон; глутаровый альдегид (который маскирует антигены МНС, как описано в Патенте США №4120649); антиидиотипические антитела для антигенов МНС и фрагментов МНС; циклоспорин А; стероиды, такие как кортикостероиды или глюкокортикостероиды или аналоги глюкокортикоидов, например преднизон, метилпреднизон, в том числе SOLUMEDROL®, метилпреднизолон натрия-сукцинат и дексаметазон; ингибиторы дигидрофолатредуктазы, такие как метотрексат (для перорального или подкожного введения); противомаларийные агенты, такие как хлорохин и гидроксихлорохин; сульфасалазин; лефлуномид; антитела к цитокинам или рецепторам цитокинов, в том числе антитела против интерферона-альфа, -бета или -гамма, антитела против фактора некроза опухолей (TNF- α) (инфликсимаб (REMICADE®) или адалимумаб), анти-TNF- α - иммуноадгезин (этанерцепт), анти-TNF- β -антитела, анти-интерлейкин-2 (IL-2)-антитела и анти-IL-2-рецептор-антитела и анти-интерлейкин-6 (IL-6)-рецептор-антитела и антагонисты; анти-LFA-1-антитела, в том числе анти-CD11a- и анти-CD18-антитела; анти-L3T4-антитела; гетерологичный анти-лимфоцит-глобулин; пан-Т-антитела, предпочтительно анти-D3- или анти-CD4/CD4a-антитела; растворимый пептид, содержащий LFA-3-связывающий агент (WO 90/08187, опубликованный 7/26/90); стрептокиназу; трансформирующий фактор роста бета (TGF-бета); стрептодорназу; РНК или ДНК из хозяина; FK506; RS-61443; хлорамбуцил; деоксиспергуалин; рапамицин; Т-клеточный рецептор (Cohen et al., Патент США №5114721); фрагменты Т-клеточного рецептора (Offner et al., Science, 251: 430-432 (1991); WO 90/11294;

Ianeway, Nature, 341: 482 (1989) и WO 91/01133); антагонисты BAFF, такие как BAFF-антитела и BR3-антитела и антагонисты zTNF4 (в отношении обзора см. Mackay and Mackay, Trends Immunol., 23:113-5 (2002) и см. также определение ниже);

биологические агенты, которые препятствуют сигналам Т-клеток-хелперов, такие как анти-CD40-рецептор или анти-CD40-лиганд (CD154), в том числе блокирующие антитела к комплексу CD40-CD40-лиганд (например, Durrie et al., Science, 261: 1328-30 (1993); Mohan et al., J. Immunol., 154: 1470-80 (1995)) и CTLA4-Ig (Finck et al., Science, 265: 1225-7 (1994)); и антитела к Т-клеточному рецептору (EP 340109), такие как T10B9. Некоторые предпочтительные здесь иммуносупрессивные агенты включают в себя циклофосфамид, хлорамбуцил, азатиоприн, лефлуномид, MMF или метотрексат.

Термин «цитотоксический агент» относится в данном контексте к веществу, которое ингибирует или предотвращает функцию клеток и/или вызывает деструкцию клеток. Предполагается, что этот термин включает в себя радиоактивные изотопы (например, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³² и радиоактивные изотопы Lu), химиотерапевтические агенты и токсины, такие как токсины с малой молекулой или ферментативно активные токсины бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения или их фрагменты.

«Химиотерапевтический агент» является химическим соединением, применимым для лечения рака. Примеры химиотерапевтических агентов включают в себя алкилирующие агенты, такие как тиотепа и циклофосфамид (CYTOXAN®); алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодоба, карбохон, метуредоба и уредоба; этиленимины и метиламеламины, в том числе алтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилентифосфорамид и триметилломеламин; ацетогенины (в частности, буллатадин и буллатаинон); дельта-9-тетрагидроканнабинол (дронабинол, MARINOL®); бета-лапахон; лапахол; колхицины; бетулиновую кислоту; камптотецин (в том числе синтетический аналог топотекан (HUSAMTIN®), CPT-11 (иринотекан, CAMTOSAR®), ацетилкамптотецин, скополектин и 9-аминокамптотецин); бриостатин; каллистатин; CC-1065 (в том числе его синтетические аналоги адозелезин, карзелезин и бизелезин); подофиллотоксин; подофиллиновую кислоту; криптофицины (в частности, криптофицин 1 и криптофицин 8); доластин; дуокармицин (в том числе синтетические аналоги, KW-2189 и CB1-TM1); элеутеробин; панкреатистатин; саркодиктиин; спонгистатин; азотные аналоги иприта, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, хлорфосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлоретамин, мехлоретамин-оксида гидрохлорид, мелфалан, новембихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урацилпиприт; нитромочевина, такие как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин и ранимустин; антибиотики, такие как энедииновые антибиотики (например, калихеамицин, в частности калихеамицин гамма II и калихеамицин омега II (см., например, Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)); динемидин, в том числе динемидин А; эсперамицин; а также хромофор неокарзиностатина и родственные хромопротеиновые хромофоры энедииновых антибиотиков), аклациномизины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, карабицин, карминомицин, карцинофилин, хромомицинин, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин (в том числе ADRIAMYCIN®, морфолинодоксорубицин, цианоморфолинодоксорубицин, 2-пирролинодоксорубицин, липосомный инъекционный раствор доксорубина-HCl

(DOXIL®) и деоксидоксорубицин), эпирубицин, эзорубицин, идарубицин, марцелломицин, митомицины, такие как митомицин С, микофеноловую кислоту, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, потфиромицин, пуромицин, квеламицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат, гемцитабин (GEMZAR®), тегафур (UFTORAL®), капецитабин (XELODA®), эпотилон и 5-фторурацил (5-ФУ); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметрексат; пуриновые аналоги, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; пиримидиновые аналоги, такие как анцитабин, азаситидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидеоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин; антиадренали, такие как аминоклутетимид, митотан, трилостан; добавку к фолиевой кислоте, такую как фролиновая кислота; ацеглатон; альдофосфамид-гликозид; аминоклевулиновую кислоту; энилурацил; амсакрин; бестрабуцил; бисантрон; эдатраксат; дефофамин; демеколцин; диазиквон; элфорнитин; эллиптиниума ацетат; этоглуцид; нитрат галлия; гидроксимочевину; лентинан; лонидаинин; майтансиноиды, такие как майтансин и ансамитоцины; митогуазон; митоксантрон; мопиданмол; нитразерин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; лозоксантрон; 2-этилгидразид; прокарбазин; полисахаридный комплекс PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); разоксан; ризоксин; сизофиран; спирогерманий; тенуазоновую кислоту; триазиквон; 2,2',2"-трихлортриэтиламин; трихотецены (в частности, токсин Т-2, верракурин А, роридин А и ангуидин); уретан; виндесин (ELDISINE®, FILDESIN®); дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид ("Ага-С"); тиотепа; таксоиды, например паклитаксел (TAXOL®), сконструированный с альбумином препарат наночастиц паклитаксела (ABRAXANE™) и доксетаксел (TAXOTERE®); хлоранбуцил; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платины, такие как цисплатин и карбоплатин; винбластин (VELBAN®); платину; этопозид (VP-16); ифосфамид; митоксантрон; винкристин (ONCOVIN®); оксалиплатин; лейковоин; винорелбин (NAVELBINE®); новантрон; эдатрексат; дауномицин; аминоклутерин; ибандронат; ингибитор топоизомеразы RFS 2000; дифторметилорнитин (DMFO); ретиноиды, такие как ретиноевая кислота; фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеуказанных; а также комбинации двух или более из вышеуказанных, такие как CHOP, аббревиатура для комбинированной терапии с использованием циклофосфамида, доксорубицина, винкристина и преднизолона, и FOLFOX, аббревиатура для схемы лечения оксалиплатином (ELOXATIN™), объединенным с 5-ФУ и лейковоином.

В это определение включены также антигормональные агенты, которые действуют, регулируя, уменьшая, блокируя или ингибируя действия гормонов, которые могут стимулировать рост рака и часто находятся в форме системного лечения, или лечения всего тела. Они сами могут быть гормонами. Примеры включают в себя антиэстрогены и селективные модуляторы рецептора эстрогена (SERM), в том числе, например, тамоксифен (в том числе тамоксифен NOVADEX®), ралоксифен (EVISTA®), дролоксифен, 4-гидроксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон и торемифен (FARESTON®); антипрогестероны; отрицательные регуляторы рецептора эстрогена (ERD); антагонисты рецептора эстрогена, такие как фулфестрант (FASLODEX®); агенты, которые функционируют, подавляя или прекращая работу яичников, например агонисты гормона, высвобождающего лютеинизирующий гормон (LHRH), такие как лейпролида

ацетат (LUPRON® и ELIGARD®), гoserелина ацетат и триптерелин; антиандрогены, такие как флутамид, нифлутамид и бикалутамид; и ингибиторы ароматазы, которые ингибируют ароматазу, регулируя производство эстрогена в надпочечниках, такие как, например, 4(5)-имидазолы, аминоклотеимид, мегестрола ацетат (MEGASE®), эксеместан (AROMASIN®), форместанин, фадрозол, ворозол (RIVISOR®), летрозол (FEMARA®) и анастрозол (ARMIDEX®). Кроме того, такое определение химиотерапевтических агентов включает в себя бисфосфонаты, такие как клодронат (например, BONEFOS® или OSTAC®), этидронат (DIDROCAL®), NE-58095, золедроновую кислоту/золедронат (ZOMETA®), алендронат (FOSMAX®), памидронат (AREDIA®), тилудронат (SKELID®) или ризедронат (ACTONEL®); а также троксацитабин (аналог цитозина 1,3-оксоланнуклеозид); антисмысловые олигонуклеотиды, в частности антисмысловые олигонуклеотиды, которые ингибируют экспрессию генов в путях передачи сигналов, участвующих в отклоняющейся от нормы пролиферации клеток, такие как, например, PKC-альфа, RAF, H-Ras и рецептор эпидермального фактора роста (EGF-R); вакцины, такие как вакцина THERATOPE® и вакцины генотерапии, например вакцина ALLOVECTIN®, вакцина LEUVECTIN® и вакцина VAXID®; ингибитор топоизомеразы 1 (например, LURTOTECAN®); rnrH (например, ABARELIX®); лапатиниб-дитосилат (двойной тирозинкиназный низкомолекулярный ингибитор рецепторов Erb-2 и EGFR, также известный как GW572016); и фармацевтические соли, кислоты или производные любого из вышеуказанных.

Термин «цитокин» является общим термином для белков, высвобождаемых популяцией одной клетки, которые действуют на другую клетку в качестве межклеточных медиаторов. Примерами таких цитокинов являются лимфокины, монокины; интерлейкины (IL), такие как IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-15, в том числе rIL-2 PROLEUKIN®; фактор некроза опухоли, такой как TNF- α или TNF- β ; и другие полипептидные факторы, в том числе LIF и kit-лиганд (KL). В данном контексте термин цитокин включает в себя белки из природных источников или из культуры рекомбинантных клеток и биологически активные эквиваленты этих цитокинов с нативной последовательностью, в том числе синтетически полученные низкомолекулярные частицы и их фармацевтически приемлемые производные и соли.

Термин «гормон» относится к полипептидным гормонам, которые обычно секретируются glandулярными (железистыми) органами с протоками. Гормоны включают в себя, например, гормон роста, такой как гормон роста человека, N-метионилгормон роста человека и бычий гормон роста; паратиреоидный гормон; тироксин; инсулин; проинсулин; релаксин; эстрадиол; заместительную гормональную терапию; андрогены, такие как калустерон, дромостанолон пропионат, эпитиостанол, мепитиостан или тестостерон; прорелаксин; гликопротеиновые гормоны, такие как фолликулостимулирующий гормон (FSH), тиреоидстимулирующий гормон (TSH) и лютеинизирующий гормон (LH); пролактин, плацентарный лактоген, мышечный гонадотропин-ассоциированный пептид, гонадотропин-высвобождающий гормон; ингибин; активин; ингибирующее клетки Мюллера вещество и тромбopoэтин. В данном контексте термин гормон включает в себя белки из природных источников или из культуры рекомбинантных клеток и биологически активные эквиваленты этих цитокинов с нативной последовательностью, в том числе синтетически полученные низкомолекулярные частицы и их фармацевтически приемлемые производные и соли.

Термин «фактор роста» относится к белкам, которые стимулируют рост и включают в себя, например, фактор роста печени; фактор роста фибробластов; васкулярный эндотелиальный фактор роста; фактор роста нервов, такой как NGF- β ; тромбоцитарный фактор роста; трансформирующие факторы роста (TGF), такие как TGF- α и TGF- β ; инсулин-подобный фактор роста I и II; эритропоэтин (EPO); остеоиндуктивные факторы; интерфероны, такие как интерферон- α , - β и - γ ; и колониестимулирующие факторы (CSF), такие как макрофагальный CSF (M-CSF); гранулоцитарно-макрофагальный CSF (GM-CSF) и гранулоцитарный CSF (G-CSF). В данном контексте термин фактор роста включает в себя белки из природных источников или из культуры рекомбинантных клеток и биологически активные эквиваленты фактора роста с нативной последовательностью, в том числе синтетически полученные низкомолекулярные частицы и их фармацевтически приемлемые производные и соли.

Термин «интегрин» относится к рецепторному белку, который позволяет клеткам как связываться с внеклеточным матриксом, так и отвечать на внеклеточный матрикс и участвует в разнообразных клеточных функциях, таких как заживление ран, дифференцировка клеток, хоминг опухолевых клеток и апоптоз. Интегрины являются частью большого семейства рецепторов клеточной адгезии, которые участвуют во взаимодействиях клетка-внеклеточный матрикс и клетка-клетка. Функциональные интегрины состоят из двух трансмембранных гликопротеиновых субъединиц, называемых альфа и бета, которые нековалентно связаны. Все альфа-субъединицы имеют некоторую общую гомологию друг с другом, как и бета-субъединицы. Эти рецепторы всегда содержат одну альфа-цепь и одну бета-цепь. Примеры включают в себя альфа-6-бета-1, альфа-3-бета-1, альфа-7-бета-1, LFA-1 и т.д. В данном контексте термин «интегрин» включает в себя белки из природных источников или из культуры рекомбинантных клеток и биологически активные эквиваленты интегрин с нативной последовательностью, в том числе синтетически полученные низкомолекулярные частицы и их фармацевтически приемлемые производные и соли.

Для целей данного изобретения «фактор некроза опухолей альфа (TNF- α)» относится к молекуле TNF- α человека, содержащей аминокислотную последовательность, описанную в Pennica et al., Nature, 312:721 (1984) или Aggarwal et al., JBC, 260:2345 (1985). В данном контексте «ингибитор TNF- α » является агентом, который ингибирует, до некоторой степени, биологическую функцию TNF- α , обычно через связывание с TNF- α и нейтрализацию его активности. Примерами ингибиторов TNF, специфически рассматриваемыми здесь, являются этанерцепт (ENBREL®), инфликсимаб (REMICADE®) и адалимумаб (HUMIRA™).

Примеры «модифицирующих заболевание противоревматических лекарственных средств» или «DMARD» включают в себя гидроксихлорохин, сульфасалазин, метотрексат, лефлуномид, этанерцепт, инфликсимаб (плюс вводимый перорально и подкожно метотрексат), азатиоприн, D-пеницилламин, соли золота (для перорального применения), соли золота (для внутримышечного применения), миноциклин, циклоспорин, в том числе циклоспорин А и циклоспорин для местного применения, стафилококковый белок А (Goodyear and Silverman, J. Exp. Med., 197, (9), p.1125-39 (2003)), в том числе их соли и производные, и т.д.

Примеры «нестероидных противовоспалительных лекарственных средств» или «NSAID» включают в себя аспирин, ацетилсалициловую кислоту, ибупрофен, напроксен, индометацин, сулиндак, толметин, ингибиторы COX-2, такие как

целекосиб (CELEBREX®; 4-(5-(4- метилфенил)-3-(трифторметил)-1Н-пиразол-1-ил)бензолсульфонамид, валдекоксиб (BEXTRA®) и мелоксикам (MOBIC®), в том числе их соли и производные, и т.д. Предпочтительно, они являются аспирином, напроксеном, ибупрофеном, индометацином или толметином.

Примеры «антагонистов или антител интегринов» включают в себя в данном контексте LFA-1-антитело, такое как эфализумаб (RAPTIVA®), коммерчески доступный из Genentech, или альфа-4-интегрин-антитело, такое как натализумаб (ANTEGREN®), доступное из Biogen, или диазациклические производные фенилаланина (WO 2003/89410), производные фенилаланина (WO 2003/70709, WO 2002/28830, WO 2002/16329 и WO 2003/53926), производные фенилпропионовой кислоты (WO 2003/10135), производные енамина (WO 2001/79173), производные пропановой кислоты (WO 2000/37444), производные алкановой кислоты (WO 2000/32575), замещенные фенилпроизводные (Патенты США с номерами 6677339 и 6348463), производные ароматического амина (Патент США №6369229), полипептиды домена дисинтегрина ADAM (US 2002/0042368), антитела к интегрину альфабета3 (EP 633945), имеющие аза-мостиковую связь бициклические аминокислотные производные (WO 2002/02556) и т.д.

«Кортикостероид» обозначает любое из нескольких синтетических или природно встречающихся веществ с общей химической структурой стероидов, которые имитируют или увеличивают действия природно встречающихся кортикостероидов. Примеры синтетических кортикостероидов включают в себя преднизон, преднизолон (в том числе метилпреднизолон, такой как метилпреднизолон-натрийсукцинат SOLU-MEDROL®), дексаметазон или дексаметазон-триамцинолон, гидрокортизон и бетаметазон. Предпочтительными кортикостероидами являются здесь преднизон, метилпреднизолон, гидрокортизон или дексаметазон.

Используемые в настоящем описании термины «BAFF», «полипептид BAFF», "TALL-1" или "полипептид TALL-1" и "BLyS" включают в себя в данном контексте «полипептиды BAFF с природной последовательностью» и «варианты BAFF». «BAFF» является обозначением полипептидов, которые имеют любую из показанных ниже аминокислотных последовательностей.

Последовательность BAFF человека (SEQ ID NO:16):

```

1  MDDSTEREQSRLTSCCLKREEMKLKECVSILPRKESPSVRSSKDGKLLAATLLLALLSCC
61  LTVVSFYQVAALQGDASLRaelQGHNAEKLPAGAGAPKAGLEEAPAVTAGLKIFEPAP
121 GEGNSSQNSRNKRAVQGPEETVTQDCLQLIADSETPTIQKGSYTFVPWLLSFKRGSAL EE
181 KENKILVKETGYFFIYGQVLYTDKTYAMGHILQRKKVHVFGDELSLVTLFRCIQNMPETL
241 PNNSCYSAGIAKLEEGDELQLAIPRENAQISLDGDVTFFGALKLL

```

Последовательность BAFF мыши (SEQ ID NO:17):

```

1  MDESAKTLPPPCLCFCSEKGEDMKVGYDPITPQKEEGAWFGICRDGRLLAATLLLALLSS
61  SFTAMSLYQLAALQADLMNLRMELQSYRGSA TPAAAGAPELTAGVKLLTPAAPRPHNSSR
121 GHRNRRAFQGPEETE QDVL SAPPAPCLPGCRHSQHDDNGMNLRNIIQDCLQLIADSDTP
181 TIRKGT YTFVPWLLSFKRGNAL EEKENKIVVRQTGYFFIYSQVLYTDP IFAMGHV IQRKK
241 VHVFGDELSLVTLFRCIQNMPKTL PNNSCYSAGIARLEEGDEIQLAIPRENAQISRNGDD
301 TFFGALKLL

```

и их гомологи и их фрагменты и варианты, которые имеют биологическую активность нативного BAFF. Биологическая активность BAFF может быть выбрана из группы, состоящей из стимуляции выживаемости В-клеток, стимуляции созревания В-клеток и связывания с BR3. Варианты BAFF будут предпочтительно иметь по меньшей мере 80% или любое последовательное целое число до 100%, в том числе, более предпочтительно, по меньшей мере 90% и даже более предпочтительно по

меньшей мере 95% идентичность аминокислотной последовательности с нативной последовательностью полипептида BAFF.

«Нативная последовательность» полипептида BAFF содержит полипептид, имеющий ту же самую аминокислотную последовательность, что и соответствующий полипептид BAFF, полученный из природного источника. Например, BAFF существует в растворимой форме после отщепления от клеточной поверхности протеазами типа фурина. Такие полипептиды BAFF с нативной последовательностью могут быть выделены из природы или могут быть получены рекомбинантными и/или синтетическими способами.

Термин «полипептид BAFF с нативной последовательностью» или «нативный BAFF» включает в себя конкретно природно встречающиеся укороченные или секретируемые формы (например, последовательность внеклеточного домена), природно встречающиеся вариантные формы (например, альтернативно сплайсированные формы) и природно встречающиеся аллельные варианты этого полипептида. Термин «BAFF» включает в себя полипептиды, описанные в Shu et al., J. Leukocyte Biol., 65:680 (1999); GenBank Accession No. AF136293; WO 1998/18921, опубликованном 7 мая 1998 года; EP 869180, опубликованном 7 октября 1998 года; WO 1998/27114, опубликованном 25 июня 1998 года; WO 1999/12964, опубликованном 18 марта 1999 года; WO 1999/33980, опубликованном 8 июля 1999 года; Moore et al., Science, 285:260-263 (1999); Schneider et al., J. Exp. Med., 189:1747-1756 (1999) и Mukhopadhyay et al., J. Biol. Chem., 274:15978-15981 (1999).

Термин «антагонист BAFF» в данном контексте используется в самом широком смысле и включает в себя любую молекулу, которая (1) связывает полипептид BAFF с нативной последовательностью или связывает BR3 с нативной последовательностью для частичного или полного блокирования взаимодействия BR3 с полипептидом BAFF и (2) частично или полностью блокирует, ингибирует или нейтрализует активность BAFF с нативной последовательностью. В одном предпочтительном варианте осуществления рецептор BAFF, который должен быть блокирован, является рецептором BR3. Активность нативного BAFF стимулирует, среди прочего, выживаемость В-клеток и/или созревание В-клеток. В одном варианте осуществления этого изобретения блокада или нейтрализация активности BAFF приводит к уменьшению количества В-клеток. Антагонист BAFF в соответствии с этим изобретением будет частично или полностью блокировать, ингибировать или нейтрализовать одну или несколько биологических активностей полипептида BAFF, *in vitro* и/или *in vivo*. В одном варианте осуществления биологически активный BAFF потенцирует любое из комбинации следующих событий *in vitro* и/или *in vivo*: увеличенную выживаемость В-клеток, увеличенный уровень IgG и/или IgM, увеличенные количества плазматических клеток и процессинг NF- κ B2/100 в p52 NF- κ B в В-клетках селезенки (например, Batten et al., J. Exp. Med. 192:1453-1465 (2000); Moore et al., Science 285:260-263 (1999); Kayagaki et al., Immunity 17:515-524 (2002)).

Как упоминалось выше, антагонист BAFF может функционировать прямым или косвенным образом для частичного или полного блокирования, ингибирования или нейтрализации передачи сигнала BAFF, *in vitro* или *in vivo*. Например, антагонист BAFF может непосредственно связывать BAFF. Например, рассматриваются BAFF-антитела, которые связываются в районе BAFF человека, содержащем остатки 162-275 и/или соседний остаток остатка, выбранного из группы,

состоящей из 162, 163, 206, 211, 231, 233, 264 и 265 BAFF человека, так что это антитело стерически (пространственно) мешает связыванию BAFF с BR3, где такие номера остатков относятся к SEQ ID NO:16. В другом примере соединением прямого связывания является полипептид, содержащий любую часть рецептора BAFF, которая связывает BAFF, например внеклеточный домен рецептора BAFF или его фрагменты и варианты, которые связывают нативный BAFF. В другом примере антагонисты BAFF включают в себя полипептиды, имеющие последовательность полипептида, содержащего последовательность Формулы I:

$X_1-C-X_3-D-X_5-L-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}-C-X_{14}-X_{15}-X_{16}-X_{17}$ (Формула I)
(SEQ ID NO:18)

где $X_1, X_3, X_5, X_7, X_8, X_9, X_{10}, X_{11}, X_{12}, X_{14}, X_{15}$ и X_{17} являются любой аминокислотой, за исключением цистеина; и где X_{16} обозначает аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из L, F, I и V; и где этот полипептид не содержит цистеина в семи аминокислотных остатках слева от наиболее N-концевого цистеина C и справа от наиболее C-концевого цистеина C Формулы I.

В одном варианте осуществления полипептид, содержащий последовательность Формулы I, имеет два цистеина (C), соединенных дисульфидной связью; $X_5LX_7X_8$, образующие конформацию структуры бета-витка типа I с центром этого витка между L и X_7 ; и имеет положительную величину для двугранного угла ϕ X_8 . В одном варианте осуществления X_{10} выбран из группы, состоящей из W, F, V, L, I, Y, M и неполярной аминокислоты. В другом варианте осуществления X_{10} является W. В другом варианте осуществления X_3 является аминокислотой, выбранной из группы, состоящей из M, V, L, I, Y, F, W и неполярной аминокислоты. В другом варианте осуществления X_5 выбран из группы, состоящей из V, L, P, S, I, A и R. В другом варианте осуществления X_7 выбран из группы, состоящей из V, T, I и L. В другом варианте осуществления X_8 выбран из группы, состоящей из R, K, G, N, H и D-аминокислоты. В другом варианте осуществления X_9 выбран из группы, состоящей из H, K, A, R и Q. В другом варианте осуществления X_{11} является I или V. В другом варианте осуществления X_{12} выбран из группы, состоящей из P, A, D, E и S. В другом варианте осуществления X_{16} является L. В одном конкретном варианте осуществления последовательность Формулы I является последовательностью, выбранной из группы, состоящей из:

ECFDLLVRAWVPCSVLK (SEQ ID NO:19), ECFDLLVRHWVPCGLLR (SEQ ID NO:20), ECFDLLVRRWVPCSEMLG (SEQ ID NO:21), ECFDLLVRSWVPCCHMLR (SEQ ID NO:22), ECFDLLVRHWVACGLLR (SEQ ID NO:23) И QCDFRLNAWVPCSVLK (SEQ ID NO:24).

В предпочтительном варианте осуществления антагонист BAFF содержит любую из аминокислотных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO:19, 20, 21, 22 и 23.

Еще в одном примере антагонисты BAFF включают в себя полипептиды, имеющие последовательность полипептида, содержащего последовательность Формулы II:
 $X_1-C-X_3-D-X_5-L-V-X_8-X_9-W-V-P-C-X_{14}-X_{15}-L-X_{17}$ (Формула II)
(SEQ ID NO:25)

где $X_1, X_3, X_5, X_8, X_9, X_{14}, X_{15}$ и X_{17} являются любой аминокислотой, за исключением цистеина; и где этот полипептид не содержит цистеина в семи аминокислотных остатках слева от наиболее N-концевого цистеина C и справа от наиболее C-концевого цистеина C Формулы II.

В одном варианте осуществления полипептид, содержащий последовательность Формулы II, имеет дисульфидную связь между двумя С и имеет конформацию $X_5LX_7X_8$, образующую структуру бета-витка типа I с центром этого витка между L и X_7 ; и имеет положительную величину для двугранного угла ϕ X_8 . В другом варианте Формулы II X_3 является аминокислотой, выбранной из группы, состоящей из M, A, V, L, I, Y, F, W и неполярной аминокислоты. В другом варианте Формулы II X_5 выбран из группы, состоящей из V, L, P, S, I, A и R. В другом варианте Формулы II X_8 выбран из группы, состоящей из R, K, G, N и D-аминокислоты. В другом варианте Формулы II X_9 выбран из группы, состоящей из H, K, A, R и Q.

В следующем варианте осуществления рецептором BAFF, из которого получен внеклеточный домен, или BAFF-связывающий фрагмент, или его BAFF-связывающий вариант, является TACI, BR3 или BCMA. Альтернативно, антагонист BAFF может связывать внеклеточный домен BR3 с нативной последовательностью для частичного или полного блокирования, ингибирования или нейтрализации связывания BAFF3 с BR3 *in vitro*, *in situ* или *in vivo*. Например, таким непрямым антагонистом является анти-BR3-антитело, которое связывается в районе BR3, содержащем остатки 23-38 BR3 человека, определенные ниже (SEQ ID NO:26), или в соседнем районе этих остатков, так что связывание BR3 человека с BAFF является пространственно затрудненным.

В некоторых вариантах осуществления антагонист BAFF по этому изобретению включает в себя BAFF-антитела и иммуноадгезины, содержащие внеклеточный домен BAFF-рецептора, или его фрагменты или варианты, которые связывают нативный BAFF. В дополнительном варианте осуществления BAFF-рецептором, из которого получен внеклеточный домен, или BAFF-связывающий фрагмент, или его BAFF-связывающий вариант, является TACI, BR3 или BCMA. Еще в одном варианте осуществления иммуноадгезин содержит аминокислотную последовательность Формулы I или Формулы II, приведенных выше, в том числе аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:19, 20, 21, 22, 23 и 24.

Согласно одному варианту осуществления антагонист BAFF связывается с полипептидом BAFF или полипептидом BR3 с аффинностью связывания 100 нМ или менее. Согласно другому варианту осуществления антагонист BAFF связывается с полипептидом BAFF или полипептидом BR3 с аффинностью связывания 10 нМ или менее. Согласно еще одному варианту осуществления антагонист BAFF связывается с полипептидом BAFF или полипептидом BR3 с аффинностью связывания 1 нМ или менее.

Термины «BR3», «полипептид BR3» или «рецептор BR3» включают в себя в данном контексте «полипептиды BR3 с нативной последовательностью» и «варианты BR3» (которые дополнительно определены здесь). «BR3» является обозначением полипептидов, содержащих следующую аминокислотную последовательность и ее гомологи и ее варианты или фрагменты, которые связывают нативный BAFF.

Последовательность BR3 человека (SEQ ID NO:26):

```

1  MRRGPRSLRGRDAPARTPCVPAECFDLLVRHCVACGLLRTPRPKPAGASSPAPRTALQPQ
61  ESVGAGAGEAALPLPGLLFGAPALLGLALVLALVLGLVSWRRRQRRLRGASSAEAPDGD
121  KDAPEPLDKVILSPGISDATAWPPPGEDPGTTPPGHVSVPVATELGSTELVTTKTAG
181  PEQQ.

```

Полипептиды BR3 этого изобретения могут быть выделены из различных

источников, например из типов тканей человека или из другого источника, или получены рекомбинантными и/или синтетическими способами. Термин BR3 включает в себя полипептиды BR3, описанные в WO 2002/24909 и WO 2003/14294.

«Нативная последовательность» полипептида BR3 или «нативный BR3» содержит полипептид, имеющий ту же самую аминокислотную последовательность, что и соответствующий полипептид BR3, полученный из природного источника. Такие полипептиды BR3 с нативной последовательностью могут быть выделены из природы или могут быть получены рекомбинантными и/или синтетическими способами. Термин «полипептид BR3 с нативной последовательностью» включает в себя конкретно природно встречающиеся укороченные, растворимые или секретируемые формы (например, последовательность внеклеточного домена), природно встречающиеся варианты формы (например, альтернативно сплайсированные формы) и природно встречающиеся аллельные варианты этого полипептида. Полипептиды BR3 данного изобретения включают в себя полипептид BR3, содержащий смежную последовательность аминокислотных остатков 1-184 BR3 человека или состоящий из смежной последовательности аминокислотных остатков 1-184 BR3 человека (SEQ ID NO:26).

«Внеклеточный домен» BR3 или «ECD» обозначает форму полипептида BR3, которая по существу не содержит трансмембранного и цитоплазматического доменов. ECD-формы BR3 включают в себя полипептид, содержащий любую из аминокислотных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из аминокислот 1-77, 2-62, 2-71, 1-61, 7-71, 23-38 и 2-63 BR3 человека. Данное изобретение рассматривает антагонисты BAFF, которые являются полипептидами, содержащими любую из вышеуказанных ECD-форм BR3 человека и их варианты и фрагменты, которые связывают нативный BAFF.

Мини-BR3 является состоящим из 26 остатков внутренним районом BAFF-связывающего домена BR3, т.е. аминокислотную последовательность: TPCVPAECFDLLVRHCVACGLLRTPR (SEQ ID NO:27).

«Вариант BR3» обозначает полипептид BR3, имеющий по меньшей мере приблизительно 80% идентичность аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью имеющего нативную последовательность, полноразмерного BR3 или ECD BR3 и связывает полипептид BAFF с нативной последовательностью. Необязательно, вариант BR3 включает в себя единственный обогащенный цистеином домен. Такие варианты полипептиды BR3 включают в себя, например, полипептиды BR3, в которых один или несколько аминокислотных остатков добавлены или делетированы на N-конце и/или C-конце, а также в одном или нескольких внутренних доменах, полноразмерной аминокислотной последовательности. Рассматриваются также фрагменты ECD BR3, которые связывают полипептид BAFF с нативной последовательностью. Согласно одному варианту осуществления вариант полипептид BR3 будет иметь по меньшей мере приблизительно 80% идентичность аминокислотной последовательности, по меньшей мере приблизительно 81% идентичность аминокислотной последовательности, по меньшей мере приблизительно 82% идентичность аминокислотной последовательности, по меньшей мере приблизительно 83% идентичность аминокислотной последовательности, по меньшей мере приблизительно 84% идентичность аминокислотной последовательности, по меньшей мере приблизительно 85% идентичность аминокислотной последовательности, по меньшей мере приблизительно 86% идентичность

аминокислотной последовательности, по меньшей мере приблизительно 87% идентичность аминокислотной последовательности, по меньшей мере приблизительно 88% идентичность аминокислотной последовательности, по меньшей мере приблизительно 89% идентичность аминокислотной последовательности, по меньшей мере приблизительно 90% идентичность аминокислотной последовательности, по меньшей мере приблизительно 91% идентичность аминокислотной последовательности, по меньшей мере приблизительно 92% идентичность аминокислотной последовательности, по меньшей мере приблизительно 93% идентичность аминокислотной последовательности, по меньшей мере приблизительно 94% идентичность аминокислотной последовательности, по меньшей мере приблизительно 95% идентичность аминокислотной последовательности, по меньшей мере приблизительно 96% идентичность аминокислотной последовательности, по меньшей мере приблизительно 97% идентичность аминокислотной последовательности, по меньшей мере приблизительно 98% идентичность аминокислотной последовательности, по меньшей мере приблизительно 99% идентичность аминокислотной последовательности с полипептидом BR3 человека или его указанным фрагментом (т.е. ECD). Вариантные полипептиды BR3 не включают в себя нативную последовательность полипептида BR3. Согласно другому варианту осуществления вариантные полипептиды BR3 имеют длину по меньшей мере приблизительно 10 аминокислот, по меньшей мере приблизительно 20 аминокислот, по меньшей мере приблизительно 30 аминокислот, по меньшей мере приблизительно 40 аминокислот, по меньшей мере приблизительно 50 аминокислот, по меньшей мере приблизительно 60 аминокислот или по меньшей мере приблизительно 70 аминокислот.

В одном предпочтительном варианте осуществления антагонистами BAFF в данном контексте являются иммуноадгезины, содержащие часть BR3, TACI или BCMA, которая связывает BAFF, или их варианты, которые связывают BAFF. В других вариантах осуществления антагонистом BAFF является BAFF-антитело. «BAFF-антителом» является антитело, которое связывает BAFF и предпочтительно связывает BAFF в районе BAFF человека, содержащем остатки 162-275 последовательности BAFF человека, описанной здесь под названием «BAFF» (SEQ ID NO:16). В другом варианте осуществления антагонистом BAFF является BR3-антитело. «BR3-антителом» является антитело, которое связывает BR3 и является антителом, которое связывает BR3 в районе BR3 человека, содержащем остатки 23-38 последовательности BR3 человека, описанной здесь под названием «BR3» (SEQ ID NO:26). Обычно положения аминокислот BAFF человека и BR3 человека, указанные здесь, соответствуют нумерации последовательности под BAFF человека и BR3 человека, SEQ ID NO:16 и 26 соответственно, описанные здесь под названиями «BAFF» и «BR3».

Другие примеры BAFF-связывающих полипептидов или BAFF-антител могут быть найдены, например, в WO 2002/092620, WO 2003/014294, Gordon et al., Biochemistry 42(20):5977-5983 (2003), Kelly et al., J. Biol. Chem., 279(16):16727-16735 (2004), WO 1998/18921, WO 2001/12812, WO 2000/68378 и WO 2000/40716.

«Вкладыш упаковки» является инструкциями, обычно включаемыми в коммерческие упаковки терапевтических продуктов, которые содержат информацию о показаниях, применении, дозе, введении, противопоказаниях, других терапевтических продуктах, которые могут комбинироваться с упакованным

продуктом, и/или предостережениях, касающихся использования таких терапевтических продуктов, и т.д.

«Медикамент» («лекарственное средство») является активным лекарственным средством для лечения ANCA-ассоциированного васкулита, или его симптомов, или побочных эффектов.

II. Терапия

В одном аспекте данное изобретение относится к способу лечения ANCA-ассоциированного васкулита у пациента, предусматривающему введение этому пациенту антагониста, предпочтительно антитела, которое связывается с маркером В-клеточной поверхности (более предпочтительно CD20-антитела), в дозе приблизительно 400 мг - 1,3 г при частоте одна-три дозы в период приблизительно одного месяца.

Таким образом, данное изобретение рассматривает способ лечения ANCA-ассоциированного васкулита у пациента, предусматривающий введение этому пациенту антитела, которое связывается с маркером В-клеточной поверхности, в дозе приблизительно 400 мг - 1,3 г при частоте одна-три дозы в период приблизительно одного месяца.

Данное изобретение рассматривает также способ лечения ANCA-ассоциированного васкулита у пациента, предусматривающий введение пациенту антагониста, который связывается с маркером В-клеточной поверхности, в дозе приблизительно 400 мг - 1,3 г при частоте одна-три дозы в период приблизительно одного месяца.

Данное изобретение рассматривает также способ лечения ANCA-ассоциированного васкулита у пациента, предусматривающий введение пациенту CD20-антитела в дозе приблизительно 400 мг - 1,3 г при частоте одна-три дозы в период приблизительно одного месяца.

В предпочтительном варианте осуществления каждого из этих аспектов эта доза равна приблизительно 500 мг - 1,2 г, более предпочтительно приблизительно 750 мг - 1,1 г. В другом предпочтительном варианте осуществления антитело вводят в двух-трех дозах, более предпочтительно двух дозах, но альтернативно трех дозах. Еще в одном предпочтительном варианте осуществления антитело вводят в период приблизительно 2-3 недель, более предпочтительно приблизительно двух недель, но альтернативно трех недель.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения ANCA-ассоциированного васкулита у индивидуума, подходящему для лечения, предусматривающему введение индивидууму эффективного количества антитела, которое связывается с маркером В-клеточной поверхности (более предпочтительно CD20-антитела), для первоначального воздействия антитела (предпочтительно приблизительно 0,5-4 г, более предпочтительно приблизительно 1,5-3,5 г и еще более предпочтительно приблизительно 1,5-2,5 г) с последующим вторым воздействием антитела (предпочтительно приблизительно 0,5-4 г, более предпочтительно приблизительно 1,5-3,5 г и еще более предпочтительно приблизительно 1,5-2,5 г), причем второе воздействие обеспечивают не ранее чем через приблизительно 16-54 недели (предпочтительно приблизительно через 20-30 недель, более предпочтительно приблизительно через 46 недель - 54 недели) от первоначального воздействия.

Для целей настоящего изобретения второе воздействие антитела является следующим воздействием CD20-антитела на индивидуума после первоначального

воздействия антитела, причем нет промежуточного лечения или воздействия CD20-антитела между первоначальным и вторым воздействиями. Такое повторяемое лечение или воздействие может быть запланированным или незапланированным, но предпочтительно является запланированным повторяемым введением дозы, в частности, для защиты органов, таких как почки, от повреждения.

Этот способ предпочтительно предусматривает введение индивидууму эффективного количества CD20-антитела для обеспечения третьего воздействия антитела (предпочтительно приблизительно 0,5-4 г, более предпочтительно приблизительно 1,5-3,5 г и еще более предпочтительно приблизительно 1,5-2,5 г), причем третье воздействие обеспечивают не ранее чем через приблизительно 46-60 недель (предпочтительно приблизительно через 46-55 недель, более предпочтительно приблизительно через 46 недель - 52 недели) от первоначального воздействия. Предпочтительно, дополнительное воздействие антитела обеспечивают не ранее чем через по меньшей мере приблизительно 70-75 недель от первоначального воздействия, и еще более предпочтительно дополнительное воздействие антитела обеспечивают не ранее чем через приблизительно 74-80 недель от первоначального воздействия.

Любое одно или несколько воздействий антитела, описанных здесь, могут быть обеспечены индивидууму в виде единичной дозы антитела или в виде отдельных доз, например приблизительно 1 дозы - 4 доз антитела (например, в виде первой дозы и второй дозы, или первой, второй и третьей дозы, или первой, второй, третьей или четвертой дозы и т.д.). Конкретное число доз (одна, две или три и более), используемое для каждого воздействия антитела, зависит, например, от типа ANCA-ассоциированного васкулита, типа используемого антитела, от того, используют ли второе лекарственное средство, от типа и количества этого второго лекарственного средства, как отмечается ниже, и от способа и частоты введения. При введении отдельных доз более позднюю дозу (например, вторую или третью дозу) предпочтительно вводят с интервалом приблизительно 1 день - 20 дней, более предпочтительно приблизительно 6-16 дней и наиболее предпочтительно приблизительно 14-16 дней от времени введения предыдущей дозы. Отдельные дозы предпочтительно вводят в пределах общего периода приблизительно 1 дня - 4 недель, более предпочтительно приблизительно 1 дня - 20 дней (например, в период 6-18 дней). В одном таком аспекте отдельные дозы вводят приблизительно один раз в неделю, причем вторую дозу вводят спустя одну неделю после первой дозы, а любую третью или последующую дозу вводят приблизительно спустя одну неделю после второй дозы. Каждая такая отдельная доза антитела равна предпочтительно приблизительно 0,5-1,5 г, более предпочтительно приблизительно 0,75-1,3 г.

В наиболее предпочтительном варианте осуществления предложен способ лечения ANCA-ассоциированного васкулита у индивидуума, предусматривающий введение этому индивидууму эффективного количества антитела, которое связывается с маркером В-клеточной поверхности (более предпочтительно CD20-антитела), для обеспечения первоначального воздействия антитела с последующим воздействием антитела, причем это второе воздействие антитела обеспечивают не ранее чем через приблизительно 16-54 недели от первоначального воздействия и каждое из воздействий антитела обеспечивают индивидууму в виде единичной дозы или в виде двух или трех отдельных доз антитела. Предпочтительно, в таком способе воздействия антитела составляют приблизительно 0,5-4 г, каждое, и наиболее

предпочтительно количества, приведенные выше.

В одном варианте осуществления индивидуума обеспечивают по меньшей мере приблизительно тремя воздействиями антитела, например приблизительно 3-60 воздействиями и, более конкретно, приблизительно 3-40 воздействиями, наиболее конкретно, приблизительно 3-20 воздействиями. Предпочтительно, такие воздействия проводят при интервалах в каждом случае в 24 недели. В одном варианте осуществления каждое воздействие антитела обеспечивают в виде единичной дозы этого антитела. В альтернативном варианте осуществления каждое воздействие антитела обеспечивают в виде отдельных доз этого антитела. Однако не каждое воздействие антитела должно быть обеспечено в виде единичной дозы или в виде отдельных доз.

В одном предпочтительном варианте осуществления приблизительно 2-3 грамма CD20-антитела вводят в качестве первоначального воздействия. Если вводят приблизительно 3 грамма в качестве первоначального воздействия, то приблизительно 1 грамм CD20-антитела вводят один раз в неделю в течение приблизительно трех недель. Если вводят приблизительно 2 грамма CD20-антитела в качестве первоначального воздействия, то тогда вводят приблизительно 1 грамм CD20-антитела в течение приблизительно 2 недель, а затем еще приблизительно 1 грамм антитела в качестве первоначального воздействия. В предпочтительном аспекте второе воздействие выполняют в течение приблизительно шести месяцев от первоначального воздействия и вводят в количестве приблизительно 2 грамма. В альтернативном предпочтительном варианте осуществления второе воздействие выполняют в течение приблизительно шести месяцев от первоначального воздействия и вводят в количестве приблизительно 1 грамм антитела с последующим введением через приблизительно две недели еще приблизительно 1 грамма антитела.

Во всех способах по настоящему изобретению, изложенных здесь, CD20-антитело или антитело к маркеру В-клеточной поверхности может быть голым антителом или может быть конъюгировано с другой молекулой, такой как цитотоксический агент, такой как радиоактивное соединение. Предпочтительным CD20-антителом здесь является химерное, гуманизированное антитело или CD20-антитело человека, более предпочтительно ритуксимаб, гуманизированное антитело 2H7 (например, содержащее последовательности переменных доменов SEQ ID NO:2 и 8 или содержащее переменный домен тяжелой цепи с изменением N100A, или D56A и N100A

в SEQ ID NO:8, и переменный домен легкой цепи с изменением M32L, или S92A, или M32L и S92A в SEQ ID NO:2), химерное или гуманизированное антитело A20 (Immunomedics) или CD20-антитело человека HUMAX-CD20™ (Genmab). Еще более предпочтительным является ритуксимаб или гуманизированное антитело 2H7. Кроме того, хотя ANCA-ассоциированный васкулит во всех способах, описанных здесь, может быть любым подобным заболеванием, в одном предпочтительном варианте осуществления им является гранулематоз Вегенера или микроскопическая полиангиопатия.

В следующем варианте осуществления всех описанных здесь способов индивидуум или пациент никогда ранее не лечился лекарственным средством (лекарственными средствами), таким как иммуносупрессивный агент (иммуносупрессивные агенты), для лечения ANCA-ассоциированного васкулита и/или никогда ранее не лечился антагонистом (например, антителом) в отношении маркера В-клеточной

поверхности (например, никогда ранее не лечился CD20-антителом). Еще в одном аспекте этот индивидуум или пациент мог иметь рецидив с ANCA-ассоциированным васкулитом или мог страдать от повреждения органа, например повреждения почки, перед лечением в любом из описанных выше способов, в том числе после
 5 первоначального или более позднего воздействия антитела. Однако предпочтительно этот пациент или индивидуум не имел рецидива с васкулитом и более предпочтительно не имел такого рецидива перед по меньшей мере первоначальным лечением.

В другом варианте осуществления этот индивидуум или пациент лечился ранее лекарственным средством (лекарственными средствами) для лечения васкулита и/или лечился ранее таким антителом или антагонистом. В другом варианте осуществления этот антагонист (например, CD20-антитело) является единственным лекарственным
 10 средством, вводимым этому индивидууму или пациенту для лечения васкулита. В другом варианте осуществления этот антагонист (например, CD-20-антитело) является одним из лекарственных средств, использованных для лечения васкулита. В следующем варианте осуществления этот индивидуум или пациент не имеет ракового заболевания. Еще в одном варианте осуществления этот индивидуум или пациент не
 15 имеет ревматоидного артрита. Еще в одном варианте осуществления этот индивидуум или пациент не имеет рассеянного склероза. Еще в одном варианте осуществления этот индивидуум или пациент не имеет обыкновенной системной красной волчанки или синдрома Шегрена. В другом варианте осуществления этот индивидуум или пациент не имеет аутоиммунного заболевания, кроме ANCA-ассоциированного васкулита. Еще в одном аспекте данного изобретения ANCA-ассоциированный васкулит не связан с другим аутоиммунным заболеванием или с
 20 риском развития другого аутоиммунного заболевания. Для целей этих последних утверждений «аутоиммунным заболеванием» в данном контексте является заболевание или нарушение, возникающее из собственных тканей или органов индивидуума или направленное на собственные ткани или органы индивидуума, или его ко-сегрегация или манифестация или возникающее из него нарушение. Без
 25 ограничения себя какой-либо теорией, авторы считают, что В-клетки демонстрируют патогенное действие в аутоиммунных заболеваниях человека через множество механистических путей, в том числе продуцирование аутоантител, образование иммунных комплексов, активацию дендритных клеток и Т-клеток, синтез цитокинов, прямое высвобождение хемокинов и обеспечение центра патологического процесса для эктопического неопимфогенеза. Каждый из этих путей участвует в различной
 30 степени в патологии аутоиммунных заболеваний.

Еще в одном варианте осуществления индивидуум или пациент имеет балл BVAS/WG, меньший чем 3, более предпочтительно меньший чем приблизительно 2, еще более предпочтительно 0 (стадия полной ремиссии) в течение
 35 приблизительно трех месяцев, предпочтительно приблизительно шести месяцев и наиболее предпочтительно в течение приблизительно одного года или более, после введения антагониста или антитела. Конкретные варианты реакции BVAS достигают балла BVAS/WG, меньшего чем 2, в течение трех месяцев после введения, или меньшего чем 1 (например, 0,2 или 0,4) в течение 14 недель или трех месяцев после
 40 введения, или меньшего, чем 1 (например, 0,6), в течение 6 месяцев после введения, или, наиболее предпочтительно, 0 в течение трех или шести месяцев после введения. В другом варианте осуществления количество стероида, такого как преднизон, в сравнении с началом лечения, уменьшается, по существу не влияя на пониженный

балл BVAS/WG. Таким образом, индивидуум или пациент при установленном интервале после лечения (например, трех месяцев или шести месяцев после лечения) имеет пониженный балл BVAS/WG в сравнении с фоном при введении меньшей дозы стероида в сравнении с фоном (фоном считают величину при начале введения). Еще в одном варианте осуществления в этот способ лечения включена стадия для определения, какой уровень реакции является эффективным для лечения васкулита. Например, включена стадия для тестирования балла BVAS/WG после введения и сравнения его с баллом BVAS/WG фона, полученным перед введением, для определения, является ли лечение эффективным, посредством измерения, уменьшился ли и насколько уменьшился балл BVAS/WG. Этот тест может повторяться в различных запланированных или незапланированных временных интервалах после введения для определения поддержания стадии частичной или полной ремиссии. Альтернативно, описанные здесь способы предусматривают стадию тестирования пациента или индивидуума перед введением, чтобы определить, присутствуют ли один или несколько биомаркеров в отношении ANCA-ассоциированного васкулита, таких как одно или несколько аутоантител, балл BVAS/WG или симптомы, уникальные для ANCA-ассоциированного васкулита, описанные выше. В другом способе может быть включена стадия проверки истории болезни пациента или индивидуума, как подробно описано выше, например, для исключения инфекций или злокачественности в качестве причин, например первичных причин, состояния этого пациента или индивидуума, перед введением антитела или антагониста этому индивидууму или пациенту. Предпочтительно, ANCA-ассоциированный васкулит является первичным (т.е. основным заболеванием), а не вторичным, например вторичным относительно инфекции или злокачественности, например солидных или жидкостных опухолей.

В предпочтительном варианте описанного здесь способа с множественными воздействиями индивидуум находится в стадии ремиссии после первоначального или любого более позднего воздействия антитела. Более предпочтительно, описанный здесь способ с множественными воздействиями предусматривает запланированное повторяемое введение доз или повторяемое лечение, так что пациент находится в стадии ремиссии после второго воздействия и предпочтительно всех воздействий антитела. Такое повторяемое введение доз планируется для предотвращения какого-либо рецидива, возврата патологического процесса или повреждения органа, а не для его терапевтического лечения. Наиболее предпочтительно, индивидуум находится в стадии ремиссии в течение по меньшей мере приблизительно шести месяцев и еще более предпочтительно по меньшей мере девяти месяцев и даже наиболее предпочтительно по меньшей мере около года от последнего воздействия антитела, используемого в этом способе с повторяемым лечением.

Еще в одном варианте осуществления индивидуума лечат одним и тем же CD20-антителом в течение по меньшей мере двух воздействий антитела и предпочтительно в течение каждого воздействия антитела. Таким образом, первоначальное и второе воздействия антитела выполняют предпочтительно с использованием одного и того же антитела, и более предпочтительно все воздействия антитела выполняют с использованием одного и того же антитела, т.е. лечение для первых двух воздействий, и предпочтительно для всех воздействий выполняют с одним типом антитела, которое связывает маркер В-клеточной поверхности, таким как CD20-антитело, например, все воздействия являются воздействиями ритуксимаба или все воздействия являются воздействиями гуманизированного 2H7.

В любом из описанных здесь способов можно вводить индивидууму или пациенту вместе с антагонистом или антителом, которое связывает маркер В-клеточной поверхности, эффективное количество второго лекарственного средства (причем этот антагонист или антитело, которое связывает маркер В-клеточной поверхности (например, CD20-антитело) является первым лекарственным средством). Это второе лекарственное средство может быть одним или несколькими лекарственными средствами и включает в себя, например, цитотоксический агент, химиотерапевтический агент, иммуносупрессивный агент, цитокин, антагонист цитокина или антитело против цитокина, фактор роста, гормон, интегрин, антагонист интегрина или антитело против интегрина или любая их комбинация. Тип такого второго лекарственного средства зависит от различных факторов, в том числе от типа васкулита, тяжести васкулита, состояния и возраста пациента, типа и дозы первого используемого лекарственного средства и т.д.

Примеры таких дополнительных лекарственных средств включают в себя химиотерапевтический агент, лекарственное средство класса интерферонов, такое как интерферон-альфа (например, Amarillo Biosciences, Inc.), IFN- β -1a (REBIF® и AVONEX®) или IFN- β -1b (BETASERON®), олигопептид, такой как глатирамера ацетат (COPAXON®), агент, блокирующий CD40-CD40-лиганд, цитотоксический или иммуносупрессивный агент (такой, как митоксантрон (NOVANTRONE®), метотрексат, циклофосфамид, хлорамбуцил, лефлуномид и азатиоприн), внутривенный иммуноглобулин (гамма-глобулин), истощающую лимфоциты терапию (например, митоксантрон, циклофосфамид, антитела CAMPATH™, анти-CD4, кладрибин, полипептидную конструкцию по меньшей мере с двумя доменами, содержащую деиммунизированный, аутореактивный антиген или его фрагмент, который специфически распознается Ig-рецепторами аутореактивных В-клеток (WO 2003/68822), облучение всего тела, трансплантацию костного мозга), антагонист или антитело интегрина (например, LFA-1-антитело, такое как эфалициумаб/RAPTIVA®, коммерчески доступный из Genentech, или альфа-4-интегрин-антитело, такое как наталициумаб/ANTEGREN®, доступный из Biogen, или другие, такие как упоминаемые выше), лекарственные средства, которые лечат симптомы, вторичные или относящиеся к ANCA-ассоциированному васкулиту (например, грибковые или другие инфекции), такие как указанные здесь, стероид, например кортикостероид (например, преднизолон, метилпреднизолон, такой как метилпреднизолон-натрийсукцинат SOLU-MEDROL™ для инъекций, преднизон, например преднизон в низкой дозе, дексаметазон или глюкокортикоид, например, посредством инъекции в суставы, в том числе системную кортикостероидную терапию), не истощающую лимфоциты иммуносупрессивную терапию (например, MMF или циклоспорин), снижающее холестерин лекарственное средство класса «статинов» (которое включает в себя цервистатин (BAYCOL™), флувастатин (LESCOL™), аторвастатин (LIPITOR™), ловастатин (MEVACOR™), правастатин (PRAVACHOL™) и симвастатин (ZOCOR™), эстрадиол, тестостерон (необязательно в повышенных дозах); Stuve et al., Neurology 8:290-301 (2002), андроген, гормональную заместительную терапию, ингибитор TNF, такой как антитело к TNF- α , DMARD, NSAID, плазмаферез или плазмообмен, триметоприм-сульфаметоксазол (BACTRIM™, SEPTA™), микофенолят-мофетил, H2-блокаторы или ингибиторы протонного насоса (во время применения потенциально вызывающей образование язв иммуносупрессивной терапии), левотироксин, циклоспорин А (например, SANDIMMUNE®), аналог соматостатина, цитокин,

антицитокиновый антагонист или антитело, антиметаболит, иммуносупрессивный агент, реабилитационную терапию, радиоид, тиреоидэктомия, антагонист BAFF, такой как BAFF- или BR3-антитела или иммуноадгезины, анти- CD40-рецептор или анти-CD40-лиганд (CD154), анти-IL-6-рецептор-антагонист/антитело, другой
 5 антагонист или другое антитело В-клеточной поверхности, такое как гуманизированное антитело 2H7 или другое гуманизированное CD20-антитело или CD20-антитело человека с ритуксимабом и т.д.

Предпочтительными подобными лекарственными средствами являются
 10 химиотерапевтический агент, цитотоксический агент, антиинтегрин, гамма-глобулин, анти-CD4, кладрибин, триметопримсульфаметоксазол, H2-блокатор, ингибитор протонного насоса, кортикостероид, циклоспорин, снижающее холестерин лекарственное средство класса статинов, эстрадиол, тестостерон, андроген, лекарственное средство для заместительной гормональной терапии, ингибитор TNF,
 15 DMARD, NSAID (для лечения, например, мышечно-скелетных симптомов), левотироксин, циклоспорин А, аналог соматостатина, антагонист цитокина или антагонист рецептора цитокина, антиметаболит, антагонист BAFF, такой как BAFF-антитело или BR3-антитело, в частности BAFF-антитело, иммуносупрессивный агент и другое антитело против маркера В-клеток, например комбинация ритуксимаба и гуманизированного 2H7 или другого гуманизированного CD20-антитела.

Более предпочтительными подобными лекарственными средствами являются химиотерапевтический агент, иммуносупрессивный агент, в том числе антитело против TNF-ф, антитело против CD40-CD40-лиганда и антагонист BAFF, такой
 25 как BAFF- или BR3-антитело, DMARD, цитотоксический агент, антагонист интегрина, NSAID, антагонист цитокина или гормон или их комбинация. Иммуносупрессоры могут требоваться, например, для очень активного заболевания с вовлечением в патологический процесс основных органов, и они включают в себя такие агенты, как циклофосфамид (CYTOXAN®), хлорамбуцил, лефлуномид, MMF, азатиоприн (IMURANE®) и метотрексат. Антагонисты BAFF могут быть полезными в комбинации с первым лекарственным средством для эффективности.

Еще более предпочтительными являются стероид, химиотерапевтический агент, иммуносупрессивный агент, цитотоксический агент, антагонист интегрина,
 35 антагонист цитокина или гормон или их комбинация, наиболее предпочтительно стероид и/или иммуносупрессивный агент, наиболее предпочтительно кортикостероид и/или иммуносупрессивный агент.

В одном особенно предпочтительном варианте осуществления это второе лекарственное средство является стероидом или содержит один или более стероидов,
 40 например кортикостероид, который предпочтительно является преднизолоном, преднизолоном, метилпреднизолоном, гидрокортизоном или дексаметазоном. Такой стероид предпочтительно вводят в более низких количествах, чем количества, используемые, когда первое лекарственное средство, например CD20-антитело, не вводят пациенту, которого лечат стероидом. В предпочтительном аспекте этот
 45 стероид не вводят с любым вторым воздействием антитела или вводят со вторым воздействием антитела, но в более низких количествах, чем при их использовании с первоначальным воздействием антитела. Предпочтительно также не вводить стероид с третьим или более поздними воздействиями антитела.

Еще в одном особенно предпочтительном аспекте вторым лекарственным средством является иммуносупрессивный агент, более предпочтительно циклофосфамид, MMF, хлорамбуцил, азатиоприн, лефлуномид или метотрексат, и

его предпочтительно вводят по меньшей мере с первоначальным воздействием антитела. В одном варианте осуществления используют предпочтительно азатиоприн, метотрексат или MMF вместо циклофосфида для поддержания стадии ремиссии.

Еще в одном предпочтительном аспекте вторым лекарственным средством является комбинация одного или нескольких стероидов и иммуносупрессивного агента.

Может быть также использовано профилактическое лечение ANCA-ассоциированного васкулита флуконазолом (DIFLUCAN™) перорально против грибковой инфекции, а также триметоприм-сульфаметоксазолом (480 мг) три раза в неделю для профилактического лечения пациентов с *Pneumocystis carinii*. Jayne and Rasmussen, supra.

Все эти вторые лекарственные средства могут быть использованы в комбинации друг с другом или по отдельности с первым лекарственным средством, так что выражение «второе лекарственное средство» не означает в этом контексте только единственное лекарственное средство, кроме первого лекарственного средства соответственно. Таким образом, второе лекарственное средство не должно быть обязательно одним лекарственным средством, но может состоять из более чем одного такого лекарственного средства или может содержать более чем одно такое лекарственное средство.

Эти вторые лекарственные средства, представленные здесь, используют обычно в тех же самых дозах и с теми же самыми способами введения, какие использовали выше, или при приблизительно от 1 до 99% используемых до сих пор доз. Если вообще используют такие вторые лекарственные средства, предпочтительно их используют в более низких количествах, чем в том случае, когда первое лекарственное средство не присутствует, особенно в последующих введениях доз с первым лекарственным средством, для устранения или уменьшения вызываемых ими побочных эффектов.

Для описанного здесь способа повторяемого лечения, в котором второе лекарственное средство вводят в эффективном количестве с воздействием антитела, оно может вводиться с любым воздействием, например только с одним воздействием или с более чем одним воздействием антитела. В одном варианте осуществления второе лекарственное средство вводят с первоначальным воздействием антитела. В другом варианте осуществления второе лекарственное средство вводят с первоначальным и вторым воздействиями. Еще в одном варианте осуществления второе лекарственное средство вводят со всеми воздействиями антитела.

Предпочтительно, после первоначального воздействия, например, стероида количество такого второго лекарственного средства уменьшают или элиминируют, чтобы уменьшить воздействие на индивидуум побочных эффектов этого агента, такого как преднизон, преднизолон, метилпреднизолон и циклофосфамид.

В качестве конкретного примера лечение пациентов с микроскопической полиангиопатией и гранулематозом Вегенера имеет три фазы: (1) индукция ремиссии, (2) поддержание ремиссии и (3) лечение рецидива. Существующая индукционная терапия часто состоит из циклофосфида (CYTOXAN®) и кортикостероидов. Она включает в себя высокую дозу внутривенного метилпреднизолона в течение нескольких дней (например, одного-пяти дней), плюс пероральный преднизон, постепенно уменьшающийся в дозе на протяжении периода времени, такого как 3-5 месяцев. Для агрессивного заболевания рекомендуется

использование внутривенного метилпреднизолона в высоких дозах в течение трех дней в комбинации с внутривенно или перорально вводимым циклофосфамидом.

Постепенное уменьшение доз преднизона предпочтительно следует, вместе с сохранением циклофосфамида, в течение 12-18 месяцев. При использовании первого лекарственного средства такое количество и частоту введения доз предпочтительно уменьшают дополнительно, так как должна быть использована наиболее низкая доза стероидов, которая контролирует это заболевание. Если эти симптомы кажутся обостряющимися, должна рассматриваться инфекция. Для пациентов в стойкой стадии ремиссии в течение 12 месяцев предпочтительно прекращение использования всех таких вторых лекарственных средств, более быстрое в случае введения при этом первого лекарственного средства, чем без него. Пациенты, симптомы которых находятся под хорошим контролем, должны тем не менее внимательно наблюдаться при шестимесечных интервалах в отношении признаков и симптомов рецидива. Во время лечения этими агентами должны проводиться полные анализы крови и функции печени.

Комбинированное введение второго лекарственного средства включает в себя совместное введение (одновременное введение) с использованием отдельных композиций или единой фармацевтической композиции и последовательное введение в любом порядке, где предпочтительно имеется период времени, когда оба (или все) активные агенты (лекарственные средства) одновременно проявляют их биологические активности.

Антитело или антагонист вводят здесь любыми подходящими способами, в том числе парентеральным, подкожным, внутривенным, внутримышечным, интраназальным введением и/или введением в повреждение. Парентеральные инфузии включают в себя внутримышечное, внутривенное (i.v.), внутриартериальное, внутривенное или подкожное введение. Рассматривается также внутривенное введение (см., например, US 2002/0009444, Grillo-Lopez, относительно внутривенной доставки CD20-антитела). Кроме того, антитело или антагонист могут быть подходящим образом введены пульсирующей инфузией, например уменьшающимися дозами антитела или антагониста. Предпочтительно, дозы вводят внутривенно или подкожно и более предпочтительно внутривенной инфузией (внутривенными инфузиями).

Если осуществляются множественные воздействия антитела, каждое воздействие может быть обеспечено с использованием одних и тех же или различных способов введения. В одном варианте осуществления каждое воздействие является внутривенным введением. В другом варианте осуществления эти воздействия выполняются подкожным введением. Еще в одном варианте осуществления эти воздействия выполняются как внутривенным, так и подкожным введением.

В одном варианте осуществления CD20-антитело вводят в виде медленной внутривенной инфузии, а не в виде внутривенного укола или болюсного введения в высокой дозе. Например, стероид, такой как преднизолон или метилпреднизолон (например, приблизительно 80-120 мг i.v., более предпочтительно приблизительно 100 мг i.v.), вводят за приблизительно 30 минут перед любой инфузией CD20-антитела. CD20-антитело вводят, например, инфузией через специально предназначенную для этого линию.

Для первоначальной дозы мультидозового воздействия CD20-антитела или для единичной дозы, если воздействие включает в себя только одну дозу, такую инфузию предпочтительно начинают при скорости приблизительно 50 мг/час. Эта скорость

может быть повышена, например, при скорости увеличений приблизительно на 50 мг/час приблизительно каждые 30 минут до максимума приблизительно 400 мг/час. Однако, если индивидуум испытывает связанную с инфузией реакцию, скорость инфузии предпочтительно уменьшают, например, до половины существующей скорости, например с 100 мг/час до 50 мг/час. Предпочтительно, инфузию такой дозы CD20-антитела (например, приблизительно 1000 мг общей дозы) завершают в течение приблизительно 255 минут (4 часов 15 минут). Необязательно, индивидуумы получают профилактическое лечение в виде ацетаминофена/парацетамола (например, приблизительно 1 г) и дифенгидрамина-HCl (например, приблизительно 50 мг или эквивалентную дозу сходного агента) перорально приблизительно за 30-60 минут до начала инфузии.

Если предоставляется более чем одна инфузия (доза) CD20-антитела для достижения общего воздействия, вторую или последующие инфузии CD20-антитела в этом варианте инфузии предпочтительно начинают при более высокой скорости, чем скорость первоначальной инфузии, например при приблизительно 100 мг/час. Эта скорость может быть повышена, например, при скорости увеличений приблизительно на 100 мг/час приблизительно каждые 30 минут до максимума приблизительно 400 мг/час. Индивидуумам, которые испытывают связанную с инфузией реакцию, скорость инфузии предпочтительно уменьшают до половины существующей скорости, например с 100 мг/час до 50 мг/час. Предпочтительно, инфузию такой второй или последующей дозы CD20-антитела (например, приблизительно 1000 мг общей дозы) завершают в течение приблизительно 195 минут (3 часов 15 минут).

Далее следует обсуждение способов получения, модификации и приготовления препаратов таких антител.

III. Получение антител

Способы и изделия данного изобретения используют или включают в себя антитело, которое связывается с маркером поверхности В-клеток, в частности антитело, которое связывается с CD20. Таким образом, здесь будут описаны способы получения таких антител.

CD20-антигеном для использования для получения антитела (антител) или скрининга на антитело (антитела) может быть, например, растворимая форма CD20 или ее часть, содержащая желаемый эпитоп. Альтернативно или дополнительно, клетки, экспрессирующие CD20 на их клеточной поверхности, могут быть использованы для генерирования антитела (антител) или скрининга на антитело (антитела). Другие формы CD20, применимые для генерирования антител, будут очевидными лицам с квалификацией в данной области.

Далее следует описание примерных способов для получения антител, используемых в соответствии с данным изобретением.

(i) Поликлональные антитела

Поликлональные антитела предпочтительно индуцируют в животных множественными подкожными (s.c) или внутривенными (i.v) инъекциями релевантного антигена и адъюванта. Может быть полезным конъюгирование релевантного антигена с белком, который является иммуногенным в видах, подлежащих иммунизации, например гемоцианином фиссуреллы, сывороточным альбумином, бычьим тироглобулином или ингибитором трипсина сои, с использованием бифункционального или дериватирующего агента, например сложного эфира малеимидобензоилсульфосукцинимид (конъюгацией через остатки

цистеина), N-гидроксисукцинимид (через остатки лизина), глутарового альдегида, янтарного ангидрида, SOCl_2 или $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, где R и R^1 являются различными алкильными группами.

Животных иммунизируют против этого антигена, иммуногенных конъюгатов или производных объединением, например, 100 мкг или 5 мкг белка или конъюгата (для кроликов или мышей соответственно) с 3 объемами полного адьюванта Фрейнда и инъекцией этого раствора интрадермально во множественных местах. Спустя один месяц этих животных повторно иммунизируют 1/5-1/10 исходного количества пептида или конъюгата в полном адьюванте Фрейнда подкожной инъекцией во множественных местах. Спустя 7-14 дней у этих животных берут кровь и сыворотку анализируют на титр антител. Животных повторно иммунизируют, пока не наблюдают плато титра. Предпочтительно, животное иммунизируют конъюгатом одного и того же антигена, но конъюгированного с отличающимся белком, и/или с использованием отличающегося сшивающего реагента. Конъюгаты могут быть также получены в культуре рекомбинантных клеток в виде слитых белков. Для усиления иммунной реакции используют также агрегирующие агенты, такие как квасцы.

(ii) Моноклональные антитела

Моноклональные антитела получают из популяции по существу гомогенных антител, т.е. отдельные антитела, составляющие эту популяцию, являются идентичными и/или связываются с одним и тем же эпитопом, за исключением возможных вариантов, которые возникают во время получения моноклонального антитела, причем такие варианты обычно присутствуют в минорных количествах. Таким образом, определение «моноклональное» указывает на характер антитела как не являющегося смесью дискретных или поликлональных антител.

Например, моноклональные антитела могут быть получены с использованием гибридного способа, описанного впервые Kohler et al., Nature, 256:495 (1975), или могут быть получены способами рекомбинантных ДНК (Патент США №4816567).

В гибридном способе мышь или другое подходящее животное-хозяин иммунизируют, как описано здесь выше, для индукции лимфоцитов, которые продуцируют или способны продуцировать антитела, которые будут специфически связываться с белком, используемым для иммунизации. Альтернативно, лимфоциты могут быть иммунизированы *in vitro*. Затем лимфоциты сливают с миеломными клетками с использованием подходящего агента слияния, такого как полиэтиленгликоль, с получением гибридной клетки (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, p.59-103 (Academic Press, 1986)).

Полученные таким образом гибридные клетки высевают и выращивают в подходящей культуральной среде, которая предпочтительно содержит одно или несколько веществ, которые ингибируют рост или выживание неслитых, исходных миеломных клеток. Например, если исходные миеломные клетки лишены фермента гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазы (HGPRT или HPRT), то культуральная среда для этих гибридом обычно будет включать в себя гипоксантин, аминоптерин и тимидин (среда HAT), причем эти вещества предотвращают рост HGPRT-недостаточных клеток.

Предпочтительными миеломными клетками являются клетки, которые эффективно сливаются, поддерживают стабильное продуцирование высокого уровня антитела выбранными антителопродуцирующими клетками и являются чувствительными к такой среде, как среда HAT. Среди них предпочтительными

миеломными клеточными линиями являются мышинные миеломные линии, такие как линии, полученные из опухолей мышей МОРС-21 и МРС-11, доступные из Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA, и клетки SP-2 или X63-Ag8-653, доступные из Американской Коллекции Типовых культур, Rockville Maryland USA. Миеломные клеточные линии человека и гетеромиеломные мышь-человек клеточные линии были описаны также для получения моноклональных антител человека (Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, p.51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

Культуральную среду, в которой выращивают гибридомные клетки, анализируют на продуцирование моноклональных антител, направленных против этого антигена. Предпочтительно, специфичность связывания моноклональных антител, продуцированных гибридомными клетками, определяют иммунопреципитацией или анализом связывания *in vitro*, таким как радиоиммуноанализ (RIA) или твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA).

Аффинность связывания моноклонального антитела может быть определена, например, анализом Скетчарда Munson et al., Anal. Biochem., 107:220 (1980).

После идентификации гибридомных клеток, которые продуцируют антитела желаемой специфичности, аффинности и/или активности, эти клоны могут быть субклонированы процедурами лимитирующих разведений и выращены стандартными способами (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, p.59-103 (Academic Press, 1986)). Подходящие культуральные среды для этой цели включают в себя, например, среду D-MEM или среду RPMI-1640. Кроме того, гибридомные клетки могут быть выращены *in vivo* в виде асцитных опухолей у животного.

Моноклональные антитела, секретируемые этими субклонами, подходящим образом выделяют из культуральной среды, асцитной жидкости или сыворотки общепринятыми процедурами очистки иммуноглобулинов, такими как, например, хроматография на белок A-SEPHAROSE™, гидроксипатитная хроматография, гель-электрофорез, диализ или аффинная хроматография.

ДНК, кодирующую эти моноклональные антитела, легко выделяют и секвенируют с использованием общепринятых процедур (например, с использованием олигонуклеотидных зондов, которые способны связываться специфически с генами, кодирующими тяжелую и легкую цепи мышинных антител). Гибридомные клетки служат в качестве предпочтительного источника такой ДНК. После выделения эта ДНК может быть помещена в экспрессионные векторы, которые затем трансфицируют в клетки-хозяева, такие как клетки *E. coli*, клетки COS обезьяны, клетки яичника Китайского хомячка (СНО) или миеломные клетки, которые в противном случае не продуцируют белок иммуноглобулина, для получения синтеза моноклональных антител в рекомбинантных клетках-хозяевах. Обзорные статьи по рекомбинантной экспрессии в бактериях ДНК, кодирующей это антитело, включают в себя Skerra et al., Curr. Opinion in Immunol., 5:256-262 (1993) и Pluckthun, Immunol. Revs., 130:151-188 (1992).

В следующем варианте осуществления антитела или фрагменты антител могут быть выделены из фаговых библиотек антител, генерированных с использованием способов, описанных в McCafferty et al., Nature, 348:552-554 (1990). Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991) и Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991) описывают выделение мышинных антител и антител человека соответственно с использованием фаговых библиотек. Следующие публикации описывают получение

высокоаффинных (нМ-диапазона) антител человека перетасовкой цепи (Marks et al., Bio/Technology, 10:779-783 (1992)), а также комбинаторной инфекцией и *in vivo* рекомбинацией в качестве стратегии для конструирования очень больших фаговых библиотек (Waterhouse et al., Nuc. Acids, Res., 21:2265-2266 (1993)). Таким образом, эти

5 способы представляют собой жизнеспособные альтернативы традиционным гибридным способам моноклональных антител для выделения моноклональных антител.

Эта ДНК может быть также модифицирована, например, введением кодирующей

10 последовательности константных доменов тяжелой и легкой цепей человека вместо гомологичных мышинных последовательностей (Патент США №4816567; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851 (1984)) или ковалентным присоединением к кодирующей последовательности иммуноглобулина всей или части кодирующей последовательности полипептида неиммуноглобулина.

15 Обычно такими полипептидами неиммуноглобулина заменяют константные домены антитела или ими заменяют переменные домены одного антигенсвязывающего сайта антитела для создания химерного двухвалентного антитела, содержащего один антигенсвязывающий сайт, имеющий специфичность в отношении одного антигена, и другой антигенсвязывающий сайт, имеющий

20 специфичность в отношении другого антигена.

Кроме того, антитела, содержащие вариантный Fc-район с высокой аффинностью в отношении FcγR, применимы для лечения заболеваний, где желательной является

25 повышенная эффективность функции эффекторных клеток, таких как аутоиммунные заболевания, как описано, например, в US 2005/0037000 и WO 2004/63351 (MacroGenics, Inc. STAVENHAGEN et al.).

(iii) Гуманизированные антитела

Способы гуманизации антител нечеловека были описаны в данной области.

30 Предпочтительно, гуманизированное антитело имеет один или несколько аминокислотных остатков, введенных в него из источника, который не является человеком. Эти аминокислотные остатки нечеловека часто называют «импортными» остатками, которые обычно берутся из «импортного» переменного домена.

Гуманизацию в основном выполняют согласно способу Winter et al. (Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeven et al., Science, 239:1534-1536 (1988)), заменой последовательностями гиперварибельного

35 района соответствующих последовательностей антитела человека. Таким образом, такие «гуманизированные» антитела являются химерными антителами (Патент США №4816567), в которых по существу менее чем интактный переменный домен человека был заменен соответствующей последовательностью из вида нечеловека.

40 На практике гуманизированные антитела являются обычно антителами человека, в которых некоторые остатки гиперварибельного района и, возможно, некоторые остатки FR заменены остатками из аналогичных сайтов в антителах грызунов.

45 Выбор переменных доменов человека как легких, так и тяжелых, для применения в получении гуманизированных антител является очень важным для уменьшения антигенности. Согласно так называемому способу наилучшей подгонки ("best-fit") последовательность переменного домена антитела грызуна подвергают скринингу против полной библиотеки известных последовательностей

50 переменных доменов человека. Затем последовательность человека, которая является наиболее близкой к последовательности грызуна, принимают в качестве каркасного района (FR) человека для гуманизированного антитела (Sims et al., J.

Immunol., 151:2296 (1993); Chothia et al., J. Mol. Biol., 196:901 (1987)). Другой способ использует конкретный каркасный район, полученный из консенсусной последовательности всех антител человека конкретной подгруппы вариабельных районов легкой или тяжелой цепи. Один и тот же каркас может быть использован для нескольких различных гуманизированных антител (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); Presta et al., J. Immunol., 151:2623 (1993)).

Кроме того, важно, чтобы эти антитела были гуманизированы с сохранением высокой аффинности в отношении антигена и других полезных биологических свойств. Для достижения этой задачи согласно предпочтительному способу гуманизированные антитела получают способом анализа исходных последовательностей и различных концептуальных гуманизированных продуктов с использованием трехмерных моделей исходных и гуманизированных последовательностей. Трехмерные модели иммуноглобулинов являются обычно доступными и известны специалистам с квалификацией в данной области. Доступны компьютерные программы, которые иллюстрируют и изображают возможные трехмерные конформационные структуры выбранных кандидатных последовательностей иммуноглобулинов. Исследования этих изображений позволяют анализировать вероятную роль остатков, которые влияют на способность кандидатного иммуноглобулина связывать его антиген. Таким путем FR-остатки могут быть выбраны и комбинированы из реципиентных и импортных остатков таким образом, чтобы получить желаемое свойство антитела, например увеличенную аффинность в отношении антигена-мишени (антигенов-мишеней). Обычно остатки гипервариабельного района прямо и наиболее существенно участвуют во влиянии на связывание антигена.

(iv) Антитела человека

В качестве альтернативы гуманизации могут быть генерированы антитела человека. Например, в настоящее время можно получать трансгенных животных (например, мышей), которые способны, после иммунизации, продуцировать полный спектр антител человека в отсутствие продуцирования эндогенного иммуноглобулина. Например, было описано, что гомозиготная делеция гена J-сегмента тяжелой цепи антитела (J_H) в химерных и мутированных в зародышевой линии мышей приводит к полному ингибированию продуцирования эндогенных антител. Перенос набора генов иммуноглобулинов зародышевой линии человека в таких мутированных в зародышевой линии мышей будет приводить к продуцированию антител человека после введения антигена. См., например, Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362: 255-258 (1993); Bruggermann et al., Year in Immuno., 7:33 (1993) и Патенты США с номерами 5591669, 5589369 и 5545807.

Альтернативно, технология фагового дисплея (McCafferty et al., Nature 348:552-553 (1990)) может быть использована для получения антител человека и фрагментов антител *in vitro* из спектров генов вариабельных (V) доменов иммуноглобулинов из неиммунизированных доноров. Согласно этому способу гены V-домена антитела клонируют в рамке считывания в ген либо большого, либо минорного белка оболочки нитевидного бактериофага, такого как M13 или fd, и представляют в виде функциональных фрагментов антител на поверхности фаговой частицы. Поскольку эта нитевидная частица содержит одноцепочечную ДНК-копию генома фага, отборы на основе функциональных свойств этого антитела также приводят к отбору гена, кодирующего антитело, проявляющее эти свойства. Таким образом, этот фаг

имитирует некоторые из свойств В-клетки. Фаговый дисплей может выполняться в различных форматах; в отношении их обзора см., например, Jonson et al. *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571 (1993). Несколько источников сегментов V-генов могут быть использованы для фагового дисплея. Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991) выделили разнообразный набор антиоксазолоновых антител из малой случайной комбинированной библиотеки V-генов, полученной из селезенки иммунизированных мышей. Удалось сконструировать спектр V-генов из неиммунизированных доноров-людей, и антитела к разнообразному набору антигенов (в том числе аутоантигенов) можно было выделить в основном в соответствии со способами, описанными Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991) или Griffith et al., *EMBO J.* 12:725-734 (1993). См. также Патенты США с номерами 5565332 и 5573905.

Антитела человека могут также генерироваться *in vitro* активированными В-клетками (см. Патенты США с номерами 5567610 и 5229275).

(v) Фрагменты антител

Были разработаны различные способы для получения фрагментов антител. Обычно эти фрагменты получают протеолитическим расщеплением интактных антител (см., например, Morimoto et al., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 24:107-117 (1992) и Brennan et al., *Science*, 229:81 (1985)). Однако эти фрагменты могут быть теперь продуцированы непосредственно рекомбинантными клетками-хозяевами. Например, фрагменты антител могут быть выделены из фаговых библиотек антител, описанных выше. Альтернативно, Fab'-SH-фрагменты могут быть непосредственно извлечены из *E. coli* и химически связаны с образованием F(ab')₂-фрагментов (Carter et al., *Bio/Technology*, 10:163-167 (1992)). В соответствии с другим подходом F(ab')₂-фрагменты могут быть выделены непосредственно из культуры рекомбинантных клеток-хозяев. Другие способы получения фрагментов антител будут очевидными для квалифицированного практика. В других вариантах осуществления предпочтительным антителом является одноцепочечный Fv-фрагмент (scFv). См. WO 93/16185, Патент США №5571894 и Патент США №5587458.

Фрагмент антитела может быть также «линейным антителом», например, как описано в Патенте США 5641870. Такие линейные фрагменты антител могут быть специфическими или биспецифическими.

(vi) Биспецифические антитела

Биспецифические антитела являются антителами, которые имеют специфичности связывания в отношении по меньшей мере двух разных эпитопов. Примеры биспецифических антител могут связываться с двумя разными эпитопами антигена CD20. Другие такие антитела могут связывать CD20 и дополнительно связывать второй маркер В-клеточной поверхности. Альтернативно, анти-CD20-связывающее плечо может быть комбинировано с плечом, которое связывается со стимулирующей молекулой на лейкоцитах, такой как молекула Т-клеточного рецептора (например, CD2 или CD3) или Fc-рецептор для IgG (FcγR), такой как FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) и FcγR III (CD16), так чтобы сфокусировать механизмы защиты на В-клетке. Биспецифические антитела могут быть также использованы для локализации цитотоксических агентов в отношении В-клетки. Эти антитела имеют CD20-связывающее плечо и плечо, которое связывает цитотоксический агент (например, сапорин, анти-интерферон-α, винкалкалоид, цепь А рицина, метотрексат или радиоактивный изотопный гаптен). Биспецифические антитела могут быть получены в виде полноразмерных антител или фрагментов антител (например,

F(ab')₂-биспецифических антител).

Способы получения биспецифических антител известны в данной области.

Традиционное получение полноразмерных биспецифических антител основано на коэкспрессии двух пар тяжелая цепь - легкая цепь иммуноглобулинов, где эти две

цепи имеют разные специфичности (Millstein et al., Nature, 305:537-539 (1983)).
Вследствие случайного ассортимента тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов эти гибридомы (квадромы) продуцируют потенциальную смесь из 10 различных молекул антител, из которых только одна имеет правильную биспецифическую структуру.

Очистка правильной молекулы, которая выполняется обычно стадиями аффинной хроматографии, является довольно трудоемкой, а выходы продукта являются низкими. Подобные процедуры описаны в WO 93/08829 и в Traunecker et al., EMBO J., 10:3655-3659 (1991).

Согласно другому подходу вариабельные домены антител с желаемыми специфичностями связывания (антитело-антигенсвязывающие сайты) сливают с последовательностями константных доменов иммуноглобулинов. Это слияние производят предпочтительно с константным доменом тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащим по меньшей мере часть шарнирного района, СН2- и СН3-районы. Предпочтительно иметь первый константный район тяжелой цепи (СН1), содержащий сайт, необходимый для связывания легкой цепи, присутствующий по меньшей мере в одном из этих слияний. ДНК, кодирующие слияния тяжелых цепей иммуноглобулинов и, если желательно, легкую цепь иммуноглобулина, встраивают в отдельные векторы экспрессии и котрансфицируют в подходящий организм-хозяин. Это обеспечивает большую гибкость в установлении взаимных пропорций трех полипептидных фрагментов в вариантах, когда неравные соотношения этих трех полипептидных цепей, используемых в конструировании, обеспечивают оптимальные выходы. Однако можно встраивать эти кодирующие последовательности для двух или всех трех полипептидных цепей в один вектор экспрессии, когда экспрессия по меньшей мере двух полипептидных цепей в равных соотношениях приводит к высоким выходам или когда эти соотношения не имеют особого значения.

В предпочтительном варианте осуществления этого подхода биспецифические антитела состоят из гибридной тяжелой цепи иммуноглобулина с первой специфичностью связывания в одном плече и гибридной парой тяжелая цепь-легкая цепь иммуноглобулина (обеспечивающая вторую специфичность связывания) в другом плече. Было обнаружено, что эта асимметричная структура облегчает отделение этого желаемого биспецифического соединения от нежелательных комбинаций цепей иммуноглобулина, так как присутствие легкой цепи иммуноглобулина только в половине этой биспецифической молекулы обеспечивает легкий путь отделения. Этот подход описан в WO 94/04690. В отношении дополнительных подробностей генерирования биспецифических антител см., например, Surech et al., Methods in Enzymology, 121:210 (1986).

В соответствии с другим подходом, описанным в Патенте США №5731168, поверхность раздела между парой молекул антител может быть сконструирована для максимизации процента гетеродимеров, которые извлекают из культуры рекомбинантных клеток. Предпочтительная поверхность раздела содержит по меньшей мере часть домена С_H3 константного домена антитела. В этом способе одну или несколько малых боковых цепей аминокислот из поверхности раздела первой молекулы антитела заменяют большими боковыми цепями (например,

тирозина или триптофана). Компенсаторные «полости» идентичного или сходного размера относительно этих больших боковых цепей создают на поверхности раздела второй молекулы антитела заменой больших боковых цепей аминокислот малыми боковыми цепями (например, аланина или треонина). Это обеспечивает механизм

увеличения выхода гетеродимера в сравнении с другими нежелательными конечными продуктами, такими как гомодимеры.

Биспецифические антитела включают в себя сшитые или «гетероконъюгатные» антитела. Например, одно из этих антител в гетероконъюгате может быть сопряжено с авидином, а другое - с биотином. Такие антитела были, например, предложены для нацеливания клеток иммунной системы на нежелательные клетки (Патент США №4676980) и для лечения ВИЧ-инфекции (WO 91/00360, WO 92/200373 и EP 03089). Гетероконъюгатные антитела могут быть получены любыми подходящими способами сшивания. Подходящие сшивающие агенты хорошо известны в данной области и описаны в Патенте США №4676980 вместе с рядом способов сшивания.

Способы генерирования биспецифических антител из фрагментов антител также были описаны в литературе. Например, биспецифические антитела могут быть получены с использованием образования химической связи. Brennan et al., Science, 229:81 (1985) описывают процедуру, в которой интактные антитела протеолитически расщепляют для получения F(ab')₂-фрагментов. Эти фрагменты восстанавливают в присутствии комплексирующего дитиола агента арсенита натрия для стабилизации соседних дитиолов и предотвращения межмолекулярного образования дисульфидной связи. Затем полученные Fab'-фрагменты превращают в производные тионитробензоата (TNB). Затем одно из Fab'-TNB-производных повторно превращают в Fab'-тиол восстановлением меркаптоэтиламинам и смешивают с эквимольным количеством другого Fab'-TNB-производного с получением биспецифического антитела. Полученные биспецифические антитела могут быть использованы в качестве агентов для селективной иммобилизации ферментов.

Были также описаны различные способы получения и выделения фрагментов биспецифических антител непосредственно из культуры рекомбинантных клеток. Например, биспецифические антитела получали с использованием «лейциновых молний». Kostelny et al., J. Immunol., 148 (5):1547-1553 (1992). Пептиды лейциновых молний из белков Fos и Jun связывали с Fab'-частями двух разных антител посредством слияния генов. Гомодимеры антител восстанавливали в шарнирной части с получением мономеров и затем повторно окисляли с получением гетеродимеров антител. Этот способ может быть также использован для получения гомодимеров антител. Технология «димерных антител», описанная Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993), обеспечила альтернативный механизм для получения фрагментов биспецифических антител. Эти фрагменты содержат переменный домен тяжелой цепи (V_H), соединенный с переменным доменом легкой цепи (V_L) линкером, который является слишком коротким, чтобы позволить спаривание между этими двумя доменами на одной и той же цепи. Таким образом, домены V_H и V_L одного фрагмента вынуждены спариваться с комплементарными доменами V_L и V_H другого фрагмента с образованием посредством этого двух антигенсвязывающих сайтов. Сообщалась также другая стратегия получения фрагментов биспецифических антител с использованием одноцепочечных димеров Fv (sFv). См. Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994).

Также возможны антитела с более чем двумя валентностями, например могут

быть получены трехспецифичные антитела. Tutt et al., J. Immunol. 147:60 (1991).

IV. Конъюгаты и другие модификации антитела

Антитело, используемое в способах или включенное в изделия, описанные здесь, необязательно конъюгируют с цитотоксическим агентом. Например, CD20-антитело
5 может быть конъюгировано с лекарственным средством, как описано в WO 2004/032828.

Химиотерапевтические агенты, применимые в генерировании таких конъюгатов антитело-цитотоксический агент, были описаны выше.

10 Конъюгаты антитела и одного или нескольких низкомолекулярных токсинов, таких как калихеамицин, майтансин (Патент США №5208020), трихотен и CC1065, также рассматриваются здесь. В одном варианте осуществления этого изобретения это антитело конъюгировано с одной или несколькими молекулами майтансина (например, приблизительно 1 - приблизительно 10 молекулами майтансина на
15 молекулу антитела). Майтансин может быть, например, превращен в May-SS-Me, который может быть восстановлен до May-SH3 и использован в реакции с модифицированным антителом (Chari et al., Cancer Research 52: 127-131 (1992)) для генерирования конъюгата майтансиноид-антитело.

20 Альтернативно, это антитело конъюгируют с одной или несколькими молекулами калихеамицина. Семейство калихеамицина антибиотиков способно продуцировать разрывы двухцепочечной ДНК при субмикомолярных концентрациях. Структурные аналоги калихеамицина, которые могут быть использованы, включают в себя, но не ограничиваются ими, γ_2^1 , α_2^1 , α_3^1 , N-ацетил- γ_1^1 , PSAG и θ^1_1 (Hinman et al., Cancer
25 Research 53: 3336-3342 (1993) и Lode et al., Cancer Research 58: 2925-2928 (1998)).

Ферментативно активные токсины и их фрагменты, которые могут быть использованы, включают в себя А-цепь дифтерийного токсина, несвязывающие активные фрагменты дифтерийного токсина, А-цепь экзотоксина (из *Pseudomonas aeruginosa*), А-цепь рицина, А-цепь абрина, А-цепь модесцина, альфа-сарцин,
30 белки *Aleurites fordii*, белки диантина, белки *Phytolacca officinalis* (PAPI, PAPII и PAP-S), ингибитор *Momordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор *Saponaria officinalis*, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин, эномицин и трикотецены. См., например, WO 93/21232, опубликованный 28 октября 1993 года.

35 Данное изобретение рассматривает дополнительно антитело, конъюгированное с соединением с нуклеолитической активностью (например, рибонуклеазой или ДНК-эндонуклеазой, такой как дезоксирибонуклеаза; ДНКаза).

Различные радиоактивные изотопы доступны для получения радиоактивных
40 конъюгированных антител. Примеры включают в себя At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} и радиоактивные изотопы Lu.

Конъюгаты антитела и цитотоксического агента могут быть получены с использованием различных бифункциональных белоксвязывающих агентов, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитиол)пропионат (SPDP), сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат, иминотиолан (ИТ), бифункциональных производных имидоэфиров (таких, как диметиладипимидат-HCl), активных эфиров (таких, как дисукцинимидилсуберат), альдегидов (таких, как глутаровый альдегид), бис-азидосоединений (таких, как бис(п-азидобензоил)гександиамин), производных бис-диазония (таких, как бис(п-диазонийбензоил)этилендиамин), диизоцианатов (таких, как толуол-2,6-диизоцианат) и бис-активных соединений фтора (таких, как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол). Например, иммунотоксин рицин может быть получен, как описано Vitetta et al., Science 238: 1098 (1987). ^{14}C -меченая 1-

изотиоцианатобензил-3-метилдиэтилентриаминпентауксусная кислота (MX-DTPA) является примером хелатообразующего агента для конъюгирования радионуклеотида с антителом. См. WO 94/11026. Линкером может быть «расщепляемый линкер», облегчающий высвобождение цитотоксичного лекарственного средства в клетке. Например, могут быть использованы кислотолабильный линкер, чувствительный к пептидазе линкер, диметилсодержащий линкер или дисульфидсодержащий линкер (Chari et al., Cancer Research 52: 127-131 (1992)).

Альтернативно, может быть приготовлен слитый белок, содержащий антитело и цитотоксический агент, например, рекомбинантными способами или пептидным синтезом.

Еще в одном варианте осуществления это антитело может быть конъюгировано с «рецептором» (таким, как стрептавидин) для использования в предварительном нацеливании на опухоль, где этот конъюгат антитело-рецептор вводят индивидууму с последующим удалением несвязанного конъюгата из кровотока с использованием выводящего агента и затем введением «лиганда» (например, авидина), который конъюгирован с цитотоксическим агентом (например, радионуклеотидом).

Антитела данного изобретения могут быть также конъюгированы с активирующим пролекарство ферментом, который превращает пролекарство (например, пептидилсодержащий химиотерапевтический агент, см. WO 81/01145) в активное противораковое лекарственное средство. См., например, WO 88/07378 и Патент США №4975278.

Ферментный компонент таких конъюгатов включает в себя любой фермент, способный действовать на пролекарство таким образом, что оно превращается в его более активную цитотоксическую форму.

Ферменты, которые применимы в способе этого изобретения, включают в себя, но не ограничиваются ими, щелочную фосфатазу, применимую для превращения фосфатсодержащих пролекарств в свободные лекарственные средства; арилсульфатазу, применимую для превращения сульфатсодержащих пролекарств в свободные лекарственные средства; цитозиндеаминазу, применимую для превращения нетоксичного 5-фторцитозина в противораковое лекарственное средство, 5-фторурацил; протеазы, такие как протеаза *Serratia*, термоллизин, субтилизин, карбоксипептидазы и катепсины (например, катепсины В и L), которые применимы для превращения пептидсодержащих пролекарств в свободные лекарственные средства; D-аланилкарбоксипептидазы, применимые для превращения пролекарств, которые содержат D-аминокислотные заместители; расщепляющие углеводы ферменты, такие как β -галактозидаза и нейраминидаза, применимые для превращения гликозилированных пролекарств в свободные лекарственные средства; β -лактамазу, применимую для превращения лекарственных средств, дериватизованных β -лактамами, в свободные лекарственные средства; и пенициллинамидазы, такие как пенициллин V-амидаза или пенициллин G-амидаза, применимые для превращения лекарственных средств, дериватизованных в их аминных атомах азота феноксиацетильной или фенилацетильной группами соответственно, в свободные лекарственные средства. Альтернативно, антитела с ферментативной активностью, также известные в данной области как «абзимы», могут быть использованы для превращения пролекарств данного изобретения в свободные активные лекарственные средства (см., например, Massey, Nature 328: 457-458 (1987)). Конъюгаты антитело-абзим могут быть получены, как описано здесь,

для доставки абзима в популяцию опухолевых клеток.

Ферменты данного изобретения могут быть ковалентно связаны с антителом способами, хорошо известными в данной области, такими как способы с использованием гетеробифункциональных сшивающих агентов, обсуждаемых выше.

Альтернативно, слитые белки, содержащие по меньшей мере антигенсвязывающий район антитела этого изобретения, связанный по меньшей мере с одной функционально активной частью фермента данного изобретения, могут быть сконструированы с использованием способов рекомбинантных ДНК, хорошо известных в данной области (см., например, Neuberger et al., Nature, 312: 604-608 (1984)).

Здесь рассматриваются и другие модификации антитела. Например, это антитело может быть связано с одним из различных небелковых полимеров, например, полиэтиленгликолем (ПЭГ), пропиленгликолем, полиоксикалкетонами или сополимерами полиэтиленгликоля и полипропиленгликоля. Фрагменты антител, такие как Fab', связанные с одной или несколькими молекулами ПЭГ, являются особенно предпочтительным вариантом осуществления данного изобретения.

Описанные здесь антитела могут быть также приготовлены в виде липосом. Липосомы, содержащие это антитело, получают способами, известными в данной области, такими как описанные в Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4030 (1980); Патентах США с номерами 4485045 и 4544545; и WO 97/38731, опубликованном 23 октября 1997 года. Липосомы с увеличенным временем циркуляции описаны в Патенте США №5013556.

Особенно применимые липосомы могут быть получены способом выпаривания с обращенной фазой с липидной композицией, содержащей фосфатидилхолин, холестерин и ПЭГ-дериватизованный фосфатидилэтаноламин (ПЭГ-ФЕ). Липосомы экстрадируют через фильтры с определенным размером пор с получением липосом желаемого диаметра. Fab'-фрагменты антитела данного изобретения могут быть конъюгированы с этими липосомами, как описано в Martin et al., J. Biol. Chem., 257: 286-288 (1982), посредством реакции дисульфидного обмена. В этой липосоме может необязательно содержаться химиотерапевтический агент. См. Gabizon et al., J. National Cancer Inst. 81(19) 1484 (1989).

Рассматриваются модификации аминокислотной последовательности описанных здесь белковых или пептидных антител. Например, может быть желательным улучшение аффинности связывания и/или других биологических свойств антитела. Варианты аминокислотной последовательности антитела получают введением подходящих нуклеотидных замен в нуклеиновую кислоту антитела или пептидным синтезом. Такие модификации включают в себя, например, делеции, и/или инсерции, и/или замены остатков в аминокислотных последовательностях антитела. Любые комбинации делеции, инсерции и замены производят для получения конечной конструкции, при условии, что эта конечная конструкция имеет желаемые характеристики. Эти аминокислотные замены могут также изменять посттрансляционные процессы антитела, например, изменением номера или положения сайтов гликозилирования.

Один применимый способ идентификации определенных остатков или районов антитела, которые являются предпочтительными местоположениями для мутагенеза, назван «аланинсканирующим мутагенезом», описанным Cunningham and Wells, Science, 244:1081- 1085 (1989). Здесь идентифицируют остаток или группу остатков (например, заряженных остатков, таких как arg, asp, his, lys и glu) и заменяют

нейтральной или отрицательно заряженной аминокислотой (наиболее предпочтительно аланином или полиаланином) для влияния на взаимодействие этих аминокислот с антигеном. Затем положения аминокислот, демонстрирующие функциональную чувствительность к этим заменам, улучшают введением дополнительных или других вариантов в сайтах замены или вместо сайтов замены. Таким образом, хотя сайт введения вариации аминокислотной последовательности является заранее определенным, характер самой мутации не должен быть предопределенным. Например, для анализа эффективности мутации в конкретном сайте проводят ala-сканирующий или случайный мутагенез в кодоне-мишени или районе-мишени и экспрессируемые варианты антитела подвергают скринингу на желаемую активность.

Аминокислотные инсерции включают в себя амино- и/или карбоксил-концевые слияния в пределах длин от одного остатка до полипептидов, содержащих сотню или более остатков, а также инсерции внутри последовательности единственного или множественных аминокислотных остатков. Примеры концевых инсерций включают в себя антитело с N-концевым метионильным остатком или антитело, слитое с цитотоксическим полипептидом. Другие инсерционные варианты молекулы антитела включают в себя слияние с N-концом или C-концом антитела фермента или полипептида, который увеличивает полупериод существования в сыворотке этого антитела.

Другим типом варианта является вариант с аминокислотной заменой. Эти варианты имеют по меньшей мере один аминокислотный остаток в молекуле антитела, замененный другим остатком. Представляющие особый интерес сайты существенного мутагенеза антитела включают в себя гипервариабельные районы, но обсуждаются также изменения в FR. Консервативные замены показаны в Таблице 3 под заголовком «предпочтительные замены». Если такие замены приводят к изменению в биологической активности, то существенные замены, названные «примерными заменами» в таблице 3 или дополнительно описанные ниже в отношении классов аминокислот, могут быть введены, и эти продукты могут быть подвергнуты скринингу.

Таблица 3		
Исходный остаток	Примерные замены	Предпочтительные замены
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gin; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; Gln; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala;	Leu
	Phe; Norleucine	
Leu (L)	Norleucine; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Tip; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr

Tyr(Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucine	Leu

Существенные модификации в биологических свойствах антитела выполняют
 5 выбором замен, которые значимо отличаются в их действии на поддержание (a)
 структуры полипептидного скелета в зоне замены, например, в виде складчатой или
 спиральной конформации, (b) заряда или гидрофобности этой молекулы в сайте-
 мишени или (c) объема боковой цепи. Аминокислоты могут быть разделены на
 группы в соответствии со сходствами в свойствах их боковых цепей (A.L.Lehninger, in
 10 Biochemistry, second ed., p.73-75, Worth Publishers, New York (1975)):

(1) неполярные: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M);
 (2) незаряженные полярные: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln
 (Q);

(3) кислотные: Asp (D), Glu (E);
 15 (4) основные: Lys (K), Arg (R), His (H).

Альтернативно, природно встречающиеся остатки могут быть разделены на
 группы на основе общих свойств боковых цепей:

(1) гидрофобные: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
 20 (2) нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
 (3) кислотные: Asp, Glu;
 (4) основные: His, Lys, Arg;
 (5) остатки, которые влияют на ориентацию цепи: Gly, Pro;
 25 (6) ароматические: Trp, Tyr, Phe.

Неконсервативные замены могут повлечь за собой замену членом одного из этих
 классов другого класса.

Любой остаток цистеина, не участвующий в поддержании правильной
 конформации этого антитела, также может быть заменен, обычно серином, для
 30 улучшения стабильности к окислению этой молекулы и предотвращения
 аберрантного сшивания. Напротив, цистеиновая связь (цистеиновые связи) могут
 быть добавлены к антителу для улучшения его стабильности (в частности, когда
 этим антителом является фрагмент антитела, такой как Fv-фрагмент).

Особенно предпочтительный тип существенного (улучшенного) варианта
 35 включает в себя замену одного или нескольких остатков гипервариабельного района
 исходного антитела. Обычно полученный вариант (полученные варианты),
 выбранный для дополнительного развития, будет иметь улучшенные биологические
 свойства относительно исходного антитела, из которого он получены. Подходящим
 40 способом генерирования таких существенных вариантов является созревание
 аффинности с использованием фагового дисплея. Вкратце, несколько сайтов
 гипервариабельного района (например, 6-7 сайтов) мутируют для генерирования
 всех возможных аминокислотных замен в каждом сайте. Полученные таким образом
 варианты антител представляют моновалентным образом из частиц нитевидных
 45 фагов в виде слияний с продуктом гена III M13, упакованного в каждой частице.
 Затем представленные фагом варианты подвергают скринингу на их биологическую
 активность (например, аффинность связывания), как описано здесь. Для
 идентификации кандидатных сайтов гипервариабельного района может выполняться
 50 аланинсканирующий мутагенез для идентификации остатков гипервариабельного
 района, значимо способствующих связыванию антигена. Альтернативно или
 дополнительно, может быть полезным анализ кристаллической структуры
 комплекса антиген-антитело для идентификации точек контакта между антителом и

антигеном. Такие контактные остатки и соседние остатки являются кандидатами на замену в соответствии с разработанными здесь способами. После генерирования таких вариантов эту панель вариантов подвергают скринингу, как описано здесь, и антитела с улучшенными свойствами в одном или нескольких релевантных анализах могут быть отобраны для дополнительного развития.

Другой тип аминокислотного варианта этого антитела изменяет исходное распределение гликозилирования антитела. Такое изменение включает в себя делецию одной или нескольких углеводных частей молекулы, обнаруженных в этом антителе, и добавление одного или нескольких сайтов гликозилирования, которые не присутствуют в этом антителе.

Гликозилирование полипептидов является обычно N-связанным или O-связанным. N-связанное гликозилирование обозначает присоединение углеводной части к боковой цепи остатка аспарагина. Трипептидные последовательности аспарагин-X-серина и аспарагин-X-треонина, где X обозначает любую аминокислоту, кроме пролина, являются последовательностями узнавания для ферментативного присоединения углеводной части к боковой цепи аспарагина. Таким образом, присутствие любой из этих трипептидных последовательностей в полипептиде создает потенциальный сайт гликозилирования. O-связанное гликозилирование обозначает присоединение одного из сахаров, N-ацетилгалактозамина, галактозы или ксилозы к гидроксикарбоксильной группе, наиболее часто серину или треонину, хотя могут быть также использованы 5-гидроксипролин или 5-гидроксилизин.

Добавление сайтов гликозилирования к антителу удобным образом выполняют изменением аминокислотной последовательности таким образом, что она содержит одну или несколько вышеописанных трипептидных последовательностей (для N-связанных сайтов гликозилирования). Это изменение может быть также произведено добавлением, или заменой, одного или нескольких остатков серина или треонина к последовательности исходного антитела (для O-связанного гликозилирования).

Когда антитело содержит Fc-район, углевод, присоединенный к нему, может быть изменен. Например, антитела со зрелой углеводной структурой, которая лишена фукозы, присоединенной к Fc-району этого антитела, описаны в Заявке на патент США № US 2003/0157108 (Presta, L.). См. также Патент США 2004/0093621 (Kuowa Nakko Kogyo Co. Ltd.). Антитела с разделяющим N-ацетилглюкозамином (GlcNAc) в углеводе, присоединенном к Fc-району этого антитела, упоминаются в WO 2003/011878, Jean-Mairet et al. и Патенте США №6602684, Umana et al. Антитела с по меньшей мере одним остатком галактозы в олигосахариде, присоединенном к Fc-району антитела, сообщаются в WO 1997/30087, Patel et al. См. также WO 1998/58964 (Raju, S.) и WO 1999/22764 (Raju, S.) в отношении антител с измененным углеводом, присоединенным к его Fc-району. См. также US 2005/0123546 (Umana et al.) в отношении антигенсвязывающих молекул с модифицированным гликозилированием.

Предпочтительный вариант гликозилирования здесь содержит Fc-район, причем углеводная структура, присоединенная к этому Fc-району, лишена фукозы. Такие варианты имеют улучшенную функцию ADCC. Необязательно, этот Fc-район дополнительно содержит одну или несколько аминокислотных замен, которые дополнительно улучшают ADCC, например замены в положениях 298, 333 и/или 334 Fc-района (Eu-нумерация остатков). Примеры публикаций, относящихся к «дефукозилированным» или «фукозонедедостаточным» антителам, включают в себя US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US

2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO 2005/053742; Okazaki et al. J. Mol Biol 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004). Примеры клеточных линий, продуцирующих дефукозилированные антитела, включают в себя клетки CHO Lec13, дефектные по фукозилированию белка (Ripka et al., Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986); Заявка на патент США №US 2003/0157108 A1, Presta, L. и WO 2004/056312 A1, Adams et al., в частности, в Примере 11), и линии клеток с нокаутом, такие как клетки CHO с нокаутом гена альфа-1,6-фукозилтрансферазы, FUT8 (Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)).

Молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие варианты аминокислотных последовательностей этого антитела, получают различными способами, известными в данной области. Эти способы включают в себя, но не ограничиваются ими, выделение из природного источника (в случае природно встречающихся вариантов аминокислотной последовательности) или получение при помощи олигонуклеотид-опосредованного (или сайт-направленного) мутагенеза, ПЦР-мутагенеза и кассетного мутагенеза ранее полученной вариантной или невариантной версии этого антитела.

Может быть желательной модификация антитела данного изобретения в отношении эффекторной функции, например, для усиления таким образом антигензависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC) и/или комплементзависимой цитотоксичности (CDC) антитела. Это может быть достигнуто введением одной или нескольких аминокислотных замен в Fc-район антитела. Альтернативно или дополнительно, остаток (остатки) цистеина могут быть введены в Fc-район, что делает возможным образование межцепочечной дисульфидной связи в этом районе. Полученное таким образом гомодимерное антитело может иметь улучшенную способность интернализации и/или увеличенное комплементзависимое убивание клеток и увеличенную антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC). См. Caron et al., J. Exp. Med. 176:1191-1195 (1992) и Shopes, J. Immunol. 148:2918-2922 (1992). Гомодимерные антитела с повышенной противоопухолевой активностью могут быть также получены с использованием гетеробифункциональных сшивающих линкеров, как описано в Wolff et al., Cancer Research 53:2560-2565 (1993). Альтернативно, может быть сконструировано антитело, которое имеет двойные Fc-районы и может посредством этого иметь усиленные способности лизиса комплемента и ADCC. См. Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design 3:219-230 (1989).

WO 00/42072 (Presta, L.) описывает антитела с улучшенной функцией ADCC в присутствии эффекторных клеток человека, где эти антитела содержат аминокислотные замены в их Fc-районе. Предпочтительно, антитело с улучшенной ADCC содержит замены в положениях 298, 333 и/или 334 Fc-района. Предпочтительно, измененным Fc-районом является Fc-район IgG1 человека, содержащий замены в одном, двух или трех положениях или состоящий из замен в одном, двух или трех положениях.

Антитела с измененным связыванием C1q и/или комплементзависимой цитотоксичности (CDC) описаны в WO 99/51642, Патенте США №6194551 B1, Патенте США №6242195 B1, Патенте США №6528624 B1 и Патенте США №6538124 (Idusogie et al.). Эти антитела содержат аминокислотную замену в одном или нескольких положениях 270, 322, 326, 327, 329, 313, 333 и/или 334 их Fc-района.

Для увеличения полупериода существования в сыворотке этого антитела можно включать в это антитело (в частности, во фрагмент антитела) связывающий рецептор спасения эпитоп, как описано, например, в Патенте США 5739277. В данном контексте термин «связывающий рецептор спасения эпитоп» относится к эпитопу Fc-района молекулы IgG (например, IgG₁, IgG₂, IgG₃ или IgG₄), который является ответственным за увеличение полупериода существования в сыворотке молекулы IgG in vivo. Антитела с заменами в их Fc-районе и увеличенными полупериодами существования в сыворотке также описаны в WO 00/42072 (Presta, L.).

Рассматриваются также сконструированные антитела с тремя или более (предпочтительно четырьмя) функциональными антигенсвязывающими сайтами (Заявка на Патент США №US 2002/0004587 A1, Miller et al.).

V. Фармацевтическая композиция

Терапевтические композиции, используемые в соответствии с данным изобретением, готовят для хранения смешиванием антитела, имеющего желаемую степень чистоты, с фармацевтически приемлемыми носителями, эксципиентами или стабилизаторами (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1989)) в форме лиофилизированных готовых форм или водных растворов. Приемлемые носители, эксципиенты или стабилизаторы являются нетоксичными для реципиентов в используемых дозах и концентрациях и включают в себя буферы, такие как фосфатный, цитратный буферы и содержащие другие органические кислоты буферы; антиоксиданты, в том числе аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие, как хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония, хлорид бензэтония; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехин; резорцинол; циклогексано́л; 3-пентано́л и м-крезо́л); низкомолекулярные полипептиды (содержащие менее чем приблизительно 10 остатков); белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, в том числе глюкозу, маннозу или декстрины; хелатообразующие агенты, такие как ЭДТА; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, комплексы Zn-белок); и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN[™], PLURONICS[™] или полиэтиленгликоль (ПЭГ).

Примерные композиции анти-CD20-антител описаны в WO 98/56418. Эта публикация описывает жидкую многодозовую композицию, содержащую 40 мг/мл ритуксимаба, 25 mM ацетат, 150 mM трегалозу, 0,9% бензиловый спирт, 0,02% полисорбат 20 при pH 5,0, которая имеет минимальный период хранения два года при 2-8°C. Другая представляющая интерес композиция анти-CD20-антитела содержит 10 мг/мл ритуксимаба в растворе 9,0 мг/мл хлорида натрия, 7,35 мг/мл дигидрата цитрата натрия, 0,7 мг/мл полисорбата 80 и стерильной воде для инъекции, pH 6,5.

Лиофилизированные композиции, адаптированные для подкожного введения, описаны в Патенте США №6267958 (Andya et al.). Такие лиофилизированные композиции могут быть воссозданы с использованием подходящего растворителя до высокой концентрации белка, и эта воссозданная композиция может вводиться подкожно для его лечения.

Рассматриваются также кристаллизованные формы этого антитела. См.,

например, US 2002/0136719 A1 (Shenoy et al.).

Описанные здесь композиции могут также содержать более чем одно активное соединение (второе лекарственное средство, как отмечалось выше), по мере необходимости, предпочтительно лекарственные средства с дополняющими активностями, которые не оказывают вредное действие друг на друга. Тип и эффективные количества таких лекарственных средств зависят, например, от количества антитела, присутствующего в этой композиции, и от клинических показателей индивидуумов. Подобные предпочтительные лекарственные средства описаны выше.

Активные ингредиенты могут быть также заключены в микрокапсулы, приготовленные, например, способами коацервации или межфазной полимеризации, например гидроксиметилцеллюлозные или желатиновые микрокапсулы и поли(метилметакрилатные) микрокапсулы соответственно в коллоидальных системах доставки лекарственных средств (например, липосомах, альбуминовых микросферах, микроэмульсиях, наночастицах и микрокапсулах) или в макроэмульсии. Такие способы описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1989).

Могут быть приготовлены препараты поддерживаемого высвобождения. Подходящие примеры препаратов поддерживаемого высвобождения включают в себя полупроницаемые матрицы твердых гидрофобных полимеров, содержащие антитело, причем эти матрицы находятся в виде сформованных изделий, например пленок или микрокапсул. Примеры матриц поддерживаемого высвобождения включают в себя сложные полиэферы, гидрогели (например, поли(2-гидроксиэтилметакрилат) или поли(виниловый спирт)), полилактиды (Патент США №3773919), сополимеры L-глутаминовой кислоты и γ -этил-L-глутамата, недеградируемый этиленвинилацетат, деградируемые сополимеры молочной кислоты и гликолевой кислоты, такие как LUPRON DEPOTTM (инъектируемые микросферы, состоящие из сополимера молочной кислоты и гликолевой кислоты и лейпролидацетата) и поли-D-(-)-3-гидроксимасляную кислоту.

Композиции для использования во введении *in vivo* должны быть стерильными. Это легко выполняется фильтрованием через мембраны для стерильного фильтрования.

VI. Изделия

В другом варианте осуществления данного изобретения обеспечены изделия, содержащие материалы, применимые для лечения ANCA-ассоциированного васкулита, описанного выше. В одном аспекте это изделие содержит (а) контейнер, содержащий антагонист, который связывается с маркером В-клеточной поверхности (например, антитело, которое связывается таким образом, в том числе CD20-антитело) (предпочтительно этот контейнер содержит антагонист или антитело и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель в этом контейнере); и (b) вкладыш упаковки с инструкциями в отношении лечения ANCA-ассоциированного васкулита у пациента, где эти инструкции указывают, что дозу этого антагониста или антитела приблизительно 400 мг - 1,3 грамма при частоте 1-3 дозы вводят этому пациенту в период приблизительно одного месяца.

Таким образом, данное изобретение относится к изделию, содержащему: контейнер, содержащий CD20-антитело, или антитело, или антагонист, который связывается с маркером В-клеточной поверхности; и вкладыш упаковки с инструкциями в отношении лечения ANCA-ассоциированного васкулита у пациента,

где эти инструкции указывают, что дозу CD20-антитела, или антитела, или антагониста, который связывается с маркером В-клеточной поверхности, приблизительно 400 мг - 1,3 грамма при частоте 1-3 дозы вводят этому пациенту в период приблизительно одного месяца.

В предпочтительном варианте осуществления описанное здесь изделие дополнительно содержит контейнер, содержащий второе лекарственное средство, причем антагонист или антитело является первым лекарственным средством. Это изделие дополнительно содержит инструкции на вкладыше упаковки в отношении лечения этого пациента вторым лекарственным средством, в эффективном количестве. Второе лекарственное средство может быть любым из указанных выше вторых лекарственных средств, причем примером второго лекарственного средства является химиотерапевтический агент, иммуносупрессивный агент, цитотоксический агент, антагонист интегрина, антагонист цитокина или гормон. Предпочтительными вторыми лекарственными средствами являются вторые лекарственные средства, описанные выше, и наиболее предпочтительным является стероид, или иммуносупрессивный агент, или оба.

В другом аспекте данное изобретение относится к изделию, содержащему: (а) контейнер, содержащий антитело, которое связывается с маркером В-клеточной поверхности (например, CD20-антитело) (предпочтительно этот контейнер содержит это антитело и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель в этом контейнере); и (b) вкладыш упаковки с инструкциями в отношении лечения ANCA-ассоциированного васкулита у индивидуума, где инструкции указывают, что этому индивидууму вводят количество антитела, которое является эффективным для обеспечения первоначального воздействия антитела, с последующим вторым воздействием антитела, где это второе воздействие обеспечивают не ранее чем через приблизительно 16-54 недели от первоначального воздействия.

Предпочтительно, такой вкладыш упаковки обеспечен инструкциями для лечения ANCA-ассоциированного васкулита у индивидуума, где эти инструкции указывают, что этому индивидууму вводят количество этого антитела, которое является эффективным для обеспечения первоначального воздействия антитела приблизительно 0,5-4 грамма, с последующим вторым воздействием антитела приблизительно 0,5-4 грамма, где это второе воздействие обеспечивают не ранее чем через приблизительно 16-54 недели от первоначального воздействия и каждое из воздействий антитела обеспечивают этому индивидууму в виде приблизительно одной-четырёх доз, предпочтительно в виде единичной дозы или в виде двух или трех отдельных доз антитела.

В конкретном аспекте обеспечено изделие, содержащее:

(а) контейнер, содержащий антитело, которое связывается с маркером В-клеточной поверхности (например, CD20-антитело) (предпочтительно этот контейнер содержит это антитело и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель в этом контейнере); и

(b) вкладыш упаковки с инструкциями в отношении лечения ANCA-ассоциированного васкулита у пациента, где эти инструкции указывают, что этому индивидууму вводят количество этого антитела, которое является эффективным для обеспечения первоначального воздействия антитела, с последующим вторым воздействием антитела, где это второе воздействие обеспечивают не ранее чем через приблизительно 16-54 недели от первоначального воздействия и каждое из воздействий антитела обеспечивают этому индивидууму в виде единичной дозы или в

виде двух или трех отдельных доз антитела. Предпочтительно эти воздействия антитела составляют приблизительно 0,5-4 грамма.

В предпочтительном варианте осуществления аспектов настоящего изобретения это изделие дополнительно содержит контейнер, содержащий второе лекарственное средство, причем это антитело является первым лекарственным средством, и это изделие дополнительно содержит инструкции на вкладыше упаковки в отношении лечения этого индивидуума вторым лекарственным средством, в эффективном количестве. Второе лекарственное средство может быть любым из указанных выше вторых лекарственных средств, причем примером второго лекарственного средства является химиотерапевтический агент, иммуносупрессивный агент, цитотоксический агент, антагонист интегрина, антагонист цитокина или гормон, наиболее предпочтительно стероид, или иммуносупрессивный агент, или оба.

Во всех этих аспектах вкладыш упаковки находится на этом контейнере или присоединен к этому контейнеру. Подходящие контейнеры включают в себя, например, бутылочки, флаконы, шприцы и т.д. Эти контейнеры могут быть изготовлены из таких материалов, как стекло или пластик. Этот контейнер удерживает или содержит композицию, которая является эффективной для лечения ANCA-ассоциированного васкулита и может иметь стерильное отверстие доступа (например, контейнер может быть мешком для внутривенного раствора или флаконом, имеющим крышку, прокалываемую иглой для гиподермальной инъекции). По меньшей мере один активный агент в этой композиции является антагонистом или антителом. Этикетка или вкладыш упаковки указывает, что эту композицию используют для лечения ANCA-ассоциированного васкулита у пациента или индивидуума, подходящего для лечения, причем обеспечено конкретное указание относительно количеств доз и интервалов антагониста или антитела и любого другого лекарственного средства. Это изделие может еще содержать дополнительный контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый буфер-разбавитель, такой как бактериостатическая вода для инъекционных растворов (BWFI), забуференный фосфатом солевой раствор, раствор Рингера и/или раствор декстрозы. Это изделие может дополнительно содержать другие материалы, желаемые с коммерческой точки зрения и с точки зрения пользователя, в том числе другие буферы, разбавители, наполнители, иглы и шприцы.

Дополнительные подробности этого изобретения иллюстрируются следующими неограничивающими примерами. Описания всех цитируемых работ в данном описании специально включены здесь в качестве ссылок.

Пример 1

Исследование эффективности ритуксимаба у пациентов с гранулематозом Вегенера

Данное исследование оценивает превосходство эффективности и безопасности ритуксимаба (MAVThera®/RITUXAN®) в определенной схеме введения доз в сравнении с плацебо для лечения признаков и симптомов у пациентов с гранулематозом Вегенера, проявляющих один или несколько симптомов системного заболевания.

Ритуксимаб (1000 мг i.v. × 2) вводят i.v. в двух первоначальных дозах в дни 1 и 15 с 1 мг/кг перорально вводимого преднизона один раз в день (который уменьшают до 40 мг/день в течение 4 недель и постепенно уменьшают с использованием стандартизированной схемы постепенного уменьшения дозы, приводящей к полному прекращению преднизона на протяжении следующих 3-5 месяцев). Эту

экспериментальную схему сравнивают с той же самой схемой, за исключением использования плацебо ритуксимаба вместо ритуксимаба, с рандомизацией 1:1 между двумя плечами этого исследования, с приблизительно 48 пациентами на плече (всего 96 пациентов). Активное заболевание определяется как Бирмингемский балл активности васкулита/гранулематоза Вегенера (BVAS/WG), больший чем 0. Для включения в испытание пациента его балл BVAS/WG должен быть равен 3 или более (или был 3 или более в пределах 28 дней рандомизации). Каждая большая составляющая на форме оценки BVAS/WG оценивается как 3 балла. Каждая минорная составляющая оценивается как 1 балл. В определении степени активности заболевания исследователь будет проводить различие между активным васкулитом (новые/ухудшенные составляющие BVAS/WG в сравнении с персистирующими составляющими) и перманентным повреждением органа (обусловленным ранее активным васкулитом).

Тяжелым внезапным обострением является новое появление одной или нескольких больших составляющих BVAS/WG. (Большие составляющие имеют* на таблице оценок BVAS/WG). Обычно такие внезапные обострения лечат увеличениями дозы преднизона или дозы циклофосфамида.

Тяжелый гранулематоз Вегенера встречается у пациента, заболевание которого не классифицируется как ограниченное в соответствии с приведенным ниже определением.

Ограниченным обострением является новое появление одной или нескольких минорных составляющих BVAS/WG. Обычно такие обострения лечат увеличениями дозы преднизона или увеличением дозы метотрексата.

Ограниченный гранулематоз Вегенера встречается у пациента, который удовлетворяет модифицированным критериям Американского колледжа ревматологии (ACR) в отношении диагноза гранулематоза Вегенера, но который не имеет заболевания, которое представляет непосредственную угрозу либо критическому отдельному органу, либо жизни пациента. Конкретно это означает, что:

- этот пациент не имеет цилиндров эритроцитов (RBC) в моче.
- Если присутствует гематурия (но без +RBC-цилиндров), креатинин сыворотки должен быть меньшим или равным 1,4, и должно быть доказательство отсутствия повышения креатинина на более чем 25% в сравнении с фоном пациента.
- Легочное вовлечение в патологический процесс должно быть ограниченным, так чтобы рО₂ комнатного воздуха было равно >70 мм ртутного столба или О₂-насыщение комнатного воздуха при пульсовой оксиметрии было равно >92%.
- Легочное кровотечение может лечиться как ограниченное заболевание при условии, что не имеется доказательства прогрессирования этого процесса. В отсутствие данных по прогрессированию легочное кровотечение может лечиться как тяжелое заболевание по усмотрению врача.
- В любом другом критическом органе может не быть заболевания (например, в желудочно-кишечном тракте, глазах, центральной нервной системе), которое, без немедленного назначения максимальной терапии (т.е. метилпреднизолона в импульсном режиме и ежедневного перорального введения циклофосфамида), угрожает функции этого органа и/или жизни пациента.

Впервые диагностированным пациентом является пациент, проходящий его/ее первый курс лечения кортикостероидами и/или химиотерапевтическим или иммуносупрессивным агентом в отношении гранулематоза Вегенера, без наличия в

истории болезни увеличения иммуносупрессивной терапии перед вступлением в данное исследование.

Для целей оценки BVAS/WG персистирующее заболевание определяется как присутствие имеющейся активности заболевания, которая присутствовала при предыдущей оценке испытания (т.е. неновая или ухудшенная активность).

Кожный тест на производное очищенного белка может быть использован для детектирования латентной туберкулезной инфекции.

Трудноизлечимым пациентом является пациент с историей иммуносупрессивной терапии (кортикостероидами и/или иммуносупрессивным агентом или химиотерапевтическим агентом) перед началом лечения в отношении активности гранулематоза Вегенера, которая делает этого пациента подходящим для этого исследования.

Считается, что пациенты находятся в стадии ремиссии, когда их балл BVAS/WG равен 0.

Схема на основе ритуксимаба бросает вызов существующему стандарту лечения и предназначена для ограничения воздействия на пациента стероидами и их известными токсичностями и для демонстрации улучшенной общей клинической пользы. Пациентов подвергают мониторингу на активность заболевания, применение дополнительных иммуносупрессоров, использование стероидов и событий безопасности на протяжении продолжительности испытания один год, с первичной конечной точкой эффективности этого испытания, измеряемой в течение 3 месяцев, с последующим наблюдением до 16,8 месяцев. Последующее наблюдение безопасности требуется в течение не менее 12 месяцев после последней дозы ритуксимаба или до возврата ANCA в нормальный диапазон, в зависимости от того, что имеет место позднее.

Первичной целью является определение доли пациентов, достигающих балла BVAS/WG 0, успешное снижение преднизона при 6 месяцах и отсутствие указанных ранее вредных событий.

Предсказывается и ожидается, что ритуксимаб (или гуманизированное антитело 2H7 вместо ритуксимаба) является эффективным в индукции ремиссии (достигающей оценок балла BVAS/WG 0) по меньшей мере в 80% внесенных в список пациентов с гранулематозом Вегенера и в создании возможности уменьшения доз стероидов относительно контрольного плеча. Ожидается, что BVAS/WG уменьшится с балла, имеющегося при вступлении в испытание, до приблизительно 0,2-0,4 в течение 14 недель. Ожидается, что С-реактивный белок (мг/л) уменьшится от уровня, имеющегося при вступлении, до диапазона приблизительно 3-11 в течение 14 недель. Ожидается, что доза преднизолона (мг/день) уменьшится от величины имеющегося при вступлении до статистически значимой более низкой величины в течение 14 недель. Ожидается, что рецидив будет иметь место у менее пяти пациентов в среднем после 27 недель. Если средний балл BVAS/WG при вступлении в исследование равен 3,6, в течение 6 месяцев лечения ожидается уменьшение до статистически значимой величины 0,6. Ожидается, что периодически активное заболевание будет наблюдаться у менее 70% пациентов. В противоположность этому ожидается, что контрольное плечо испытания обнаружит гораздо меньшее уменьшение BVAS/WG и С-реактивного белка и в использовании стероидов и меньшее количество пациентов будет находиться в стадии ремиссии.

Пример 2

Исследование эффективности ритуксимаба у пациентов с микроскопической

полиангиопатией

Исследование проводили согласно протоколу Примера 1, за исключением того, что этих пациентов лечили в отношении микроскопической полиангиопатии.

Ожидается, что будут наблюдаться сходные результаты с результатами для гранулематоза Вегенера, т.е. ожидается, что стадия ремиссии, измеряемая по баллу 0 BVAS/WG, будет иметь место по меньшей мере у 80% пациентов, получающих лечение в этом плече исследования, и ожидается, что применение стероидов будет уменьшаться на протяжении хода этого исследования, результаты которого, как ожидается, будут гораздо лучшими, в статистическом смысле, чем контрольные результаты.

Пример 3

Исследование с повторяемым лечением эффективности ритуксимаба у пациентов с гранулематозом Вегенера

Это исследование оценивает превосходство эффективности и безопасности повторяемого лечения ритуксимабом (MAbTHERA®)/RITUXAN®) в сравнении с плацебо у взрослых индивидуумов с гранулематозом Вегенера. Исследование I исследует острое заболевание, либо первое проявление, либо рецидив ($BVAS \geq 10$; $n=16$); исследование II исследует персистирующее заболевание ($BVAS \geq 4$; $n=16$). Пациенты получают ритуксимаб (1 г i.v.) в виде трех первоначальных доз в 1, 8 и 15 день для исследований I и II. Сопутствующая терапия в исследовании I включает в себя 1 мг/кг/день перорально вводимого преднизона, постепенно уменьшающегося в дозе в соответствии со схемой в Примере 1, и циклофосфамид (в соответствии со стандартным лечением). Пациенты исследования II получают ритуксимаб и 1 мг/кг/день перорально вводимого преднизона, постепенно уменьшающегося в соответствии со схемой в Примере 1. Все индивидуумы получают второй курс инфузии ритуксимаба/плацебо 1000 мг i.v., отделенный 14 днями, в течение 24 и 26 недель соответственно без стероидов или циклофосфамида, независимо от того, проявляли ли эти пациенты симптомы или находились в стадии полной ремиссии. Курсы лечения ритуксимабом должны быть разделены минимальным интервалом 16 недель.

Экспериментальные схемы сравнивают с плацебо ритуксимаба + те же самые постепенно уменьшающиеся дозы перорального преднизона и циклофосфамида (исследование I) или постепенно уменьшающиеся дозы перорального преднизона (исследование II).

Изменения иммуносупрессивных лекарственных средств во время этих исследований не допускаются, пока они не вынуждаются токсичностью, и требование использования другого постепенно уменьшающегося лекарственного средства, чем пероральный преднизон, должно быть обсуждено заранее с использованием Medical Monitor. Персонал исследования обучают правильному введению ритуксимаба. Индивидуумы могут быть госпитализированы для наблюдения, в частности, для их первой инфузии, по усмотрению исследователя. Ритуксимаб должен вводиться под внимательным руководством, и должно быть немедленно доступным полное оборудование для приведения в сознание.

Пациентов наблюдают каждый месяц в течение 12 месяцев на активность заболевания, применение дополнительных иммуносупрессоров, внезапные обострения заболевания, применимость преднизона и события безопасности на протяжении 52 недель этого исследования. Первичная конечная точка эффективности этого испытания находится в течение 52 недель, и критерии

эффективности оцениваются единственным Наблюдающим Экспертом, который не участвует в лечении пациента или в других процедурах исследования. Пациентов оценивают в отношении их балльных оценок BVAS/WG и успешного снижения преднизона. По окончании 52 недель индивидуумы, которые получали плацебо ритуксимаба или ритуксимаб, но демонстрируют балл 0 BVAS/WG и успешное постепенное уменьшение дозы преднизона в течение 6 месяцев, будут завершать участие в исследовании. Индивидуумы, которые получали ритуксимаб, но не продемонстрировали такого балла через 52 недели, наблюдались в течение 6 месяцев после последнего курса ритуксимаба или до тех пор, пока балл BVAS/WG не станет равным 0, в зависимости от того, что имеет место ранее. Участки должны быть проинформированы о том, должен ли индивидуум продолжать участвовать в наблюдении, но не о том, получал ли он плацебо или ритуксимаб. Наблюдение безопасности требуется до 12 месяцев после последней дозы ритуксимаба или балла 0 BVAS/WG, в зависимости от того, что имеет место позднее.

Эти схемы на основе ритуксимаба бросают вызов существующему стандарту лечения, и ожидается, что они продемонстрируют улучшенную общую клиническую пользу, причем первичной целью является определение доли пациентов, достигающих первичной конечной точки балла 0 BVAS/WG и успешное постепенное уменьшение дозы преднизона.

Предсказывается и ожидается, что введение ритуксимаба или гуманизированного 2H7 индивидууму в протоколах Исследований I и II, описанных выше, будет индуцировать ремиссию (получение балльных оценок 0 BVAS/WG) по меньшей мере у 80% зачисленных пациентов с гранулематозом Вегенера и позволит уменьшить дозы стероида в сравнении с контрольным плечом исследования. Ожидается, что BVAS/WG уменьшится с балла при вступлении в исследование до приблизительно 0,2-0,4 в течение 14 недель. Ожидается, что С-реактивный белок (мг/л) уменьшится от уровня при вступлении до диапазона приблизительно 3-11 в течение 14 недель. Ожидается, что применение стероида как для исследования I, так и для исследования II уменьшится с величины, имеющейся при вступлении, до статистически значимой более низкой величины в течение 14 недель. Ожидается, что рецидив имеет место у менее пяти пациентов, в среднем после 27 недель. Ожидается, что эти результаты будут значительно лучшими, чем результаты контрольных плечей для Исследований I и II.

Ожидается также, что приблизительно в течение 48-54 недель другая доза 2 г ритуксимаба, вводимая только один раз или распределенная на приблизительно 14-16 дней в количествах по 1 г, может быть эффективной для лечения гранулематоза Вегенера в течение всего второго года (давая балльную оценку 0 BVAS/WG по меньшей мере у 80% зачисленных в исследование пациентов), со стероидами и/или другими иммуносупрессивными агентами или без стероидов и/или других иммуносупрессивных агентов, с явным улучшением в сравнении с контрольными пациентами, получающими плацебо ритуксимаба, а не ритуксимаб. Таким образом, ритуксимаб (или гуманизированный 2H7) мог бы вводиться сначала в пределах приблизительно 2-недельного периода времени с последующим другим лечением в течение приблизительно 4-8 месяцев, с последующим другим лечением в течение приблизительно одного года после первоначального лечения (измеренным от времени любой из предоставленных доз), с последующим лечением в течение приблизительно двух лет от первоначального лечения, с ожидаемым успехом, в дозе приблизительно один грамм × 2-4 введения доз для каждого лечения, вводимых

вместе, приблизительно один раз в неделю, в течение приблизительно каждой другой недели на протяжении двух-четырех недель. Ожидается, что протокол с повторяемыми лечениями будет успешно используемым в течение нескольких лет с малыми побочными эффектами или без побочных эффектов.

Пример 4

Второе исследование с повторяемым лечением эффективности ритуксимаба у пациентов с гранулематозом Вегенера

Данное исследование является таким же, какое описано в Примере 3, за исключением того, что первоначальная доза ритуксимаба или плацебо ритуксимаба предоставляется в виде 1000 мг i.v. × 2 (в день 0, со второй инфузией в день 15±1 день), и последующий курс инфузий ритуксимаба или плацебо вводят при неделях 24 и 26 в виде 2 доз каждые две недели только индивидуумам, находящимся в стадии ремиссии, например индивидуумам, не имеющим увеличения активности заболевания, такой как повышение титров ANCA, стойких повышенных титров ANCA и других симптомов. Все другие критерии были теми же самыми.

Предсказывается и ожидается, что введение ритуксимаба или гуманизированного 2H7 индивидууму в протоколе запланированного второго введения доз будет эффективным в индукции ремиссии (получении балльных оценок 0 BVAS/WG) по меньшей мере у 80% зачисленных пациентов с гранулематозом Вегенера и в создании возможности уменьшения доз стероида в сравнении с контрольным плечом исследования. Ожидается, что BVAS/WG уменьшится с балла, имеющегося при вступлении в исследование, до приблизительно 0,2-0,4 в течение 14 недель.

Ожидается, что С-реактивный белок (мг/л) уменьшится от уровня, имеющегося при вступлении, до диапазона приблизительно 3-11 в течение 14 недель. Ожидается, что средняя доза преднизолона (мг/день) уменьшится с величины при вступлении до статистически значимой более низкой величины в течение 14 недель. Ожидается, что рецидив имеет место у менее пяти пациентов, в среднем после 27 недель. Ожидается, что эти результаты являются значимо лучшими, чем результаты контроля.

Ожидается также, что в течение приблизительно 48-54 недель другая доза 2 г CD20-антитела (например, ритуксимаба или гуманизированного 2H7), вводимая только один раз или распределенная на приблизительно 14-16 дней в количествах по 1 г, может быть эффективной для лечения гранулематоза Вегенера в течение всего второго года (давая балльную оценку 0 BVAS/WG по меньшей мере у 80% зачисленных в исследование пациентов), с постепенным уменьшением доз преднизона или i.v. метилпреднизолона и/или других иммуносупрессивных агентов или без них. Таким образом, CD20-антитело могло бы вводиться сначала в пределах приблизительно 2-недельного периода времени с последующим другим лечением в течение приблизительно 4-8 месяцев, с последующим другим лечением в течение приблизительно одного года от первоначального лечения (измеренным от времени любой из предоставленных доз), с последующим лечением в течение приблизительно двух лет от первоначального лечения, с ожидаемым успехом, в дозе приблизительно один грамм × 2-4 введения доз для каждого лечения, вводимых вместе, приблизительно один раз в неделю или приблизительно каждую другую неделю на протяжении двух-четырех недель. Ожидается, что результаты этого лечения будут гораздо лучшими, чем результаты контроля с плацебо. Ожидается, что этот протокол с повторяемыми лечениями будет успешно используемым в течение нескольких лет с малыми вредными побочными эффектами или без побочных эффектов.

Пример 5

Третье исследование с повторяемым лечением эффективности ритуксимаба у пациентов с гранулематозом Вегенера

Ожидается, что результаты Примера 4 будут успешными, если пациентов первоначально лечили ритуксимабом и затем повторно лечили ритуксимабом спустя один год после первого лечения, с использованием того же самого введения доз и другого протокола Примера 4, за исключением того, что ритуксимаб предоставляется при интервалах в 1 год, а не шестимесячных интервалах.

Пример 6

Исследование эффективности ритуксимаба у индивидуумов с генерализованным ANCA-ассоциированным васкулитом

Рандомизированное, многоцентровое, двойное слепое, контролирующее плацебо испытание выполняют на пациентах с генерализованным ANCA-ассоциированным васкулитом с использованием ритуксимаба. Двести пациентов рандомизировали для (1) общепринятого лечения (циклофосфамид и кортикостероиды с последующим азатиоприном) или (2) лечения ритуксимабом (плюс кортикостероиды, вначале) для индукции ремиссии с использованием 1 грамма ритуксимаба в 1 день и снова на 15 день.

Первичным клиническим сравнением является способность ритуксимаба в этой схеме введения доз и кортикостероидов индуцировать ремиссии заболевания, измеряемые по кумулятивной активности заболевания в течение шести месяцев. В соответствии со стандартной продолжительностью лечения ANCA-ассоциированного васкулита пациенты в общепринятом плече терапии будут получать циклофосфамид в течение периода до 6 месяцев с последующим получением азатиоприна, с общей продолжительностью лечения 18 месяцев. Для оценки способности ритуксимаба восстанавливать толерантность В-клеток пациенты в обоих плечах исследования будут наблюдаться в течение в целом 18 месяцев.

Ожидается, что ритуксимаб (или гуманизированный 2H7 вместо ритуксимаба) будет индуцировать стабильные ремиссии у пациентов с ANCA-ассоциированным васкулитом и хорошо установленную толерантность В-клеток в отношении антигенов-мишеней ANCA по меньшей мере у двух третьих этих пациентов.

Ожидается также, что ритуксимаб или другое CD20-антитело будет по меньшей мере таким же эффективным, как и общепринятая схема лечения в отношении индукции и поддержания ремиссии заболевания, предоставляя существенные преимущества в сравнении со стандартной терапией благодаря ее предпочтительному профилю побочных эффектов, например менее токсичному, чем химиотерапевтические вещества и стероиды, и лучшему восстановлению толерантности.

Пример 7

Исследование с повторяемым лечением эффективности ритуксимаба у индивидуумов с тяжелым гранулематозом Вегенера или тяжелой микроскопической полиангиопатией

В список исследования внесены двадцать пациентов с активным гранулематозом Вегенера или тяжелой микроскопической полиангиопатией, положительным ANCA-тестом и балльной оценкой по меньшей мере 3 BVAS/WG, которые не отвечают на циклофосфамид или имеют противопоказания в отношении применения циклофосфамида. См. определение тяжелого гранулематоза Вегенера в Примере 1. Схема индукции ремиссии состоит из перорального преднизона (1 мг/кг/день) и ритуксимаба (1 грамм в день 1 и 1 грамм в день 15). К 4 неделе преднизон

уменьшают до 40 мг/день. Выполняют стандартизованную схему постепенного уменьшения дозы, приводящую к полному прекращению введения преднизона на протяжении следующих 16 недель. Эту схему сравнивают с той же самой схемой, но с плацебо ритуксимаба, а не с ритуксимабом (контрольное исследование). Этот протокол обуславливает повторяемое лечение с той же схемой индукции ремиссии в течение 6 месяцев для всех пациентов, независимо от того, испытывают ли они обострение заболевания после восстановления В-клеток, являются ли они бессимптомными с рецидивом ANCA, или титр ANCA совпадает или следует за восстановлением В-клеток, или находятся в стадии полной ремиссии. Эта схема повторяемого лечения включает в себя 1 г × 2 с двухнедельным интервалом для ритуксимаба и плацебо ритуксимаба. Внезапное клиническое обострение в отсутствие В-клеток считается неудачей лечения. Пациентов оценивали один раз в месяц в течение одного года.

Ожидается, что пациенты в плече лечения будут переносить хорошо инфузии ритуксимаба и что их В-клетки будут быстро истощаться, и все пациенты будут достигать стадии полной ремиссии (BVAS/WG 0) по истечении трех месяцев. Ожидается, что все пациенты в плече лечения завершают постепенное уменьшение доз глюкокортикоида к 6 месяцу лечения. Ожидается, что после 12 месяцев ни один пациент в плече лечения не будет испытывать клинического внезапного обострения и что В-клетки будут возвращаться у большинства, если не у всех, таких пациентов в течение 12 месяцев. Не ожидается, что кроме глюкокортикоидов будут необходимы дополнительные иммуносупрессивные агенты для индукции ремиссии и поддержания стойкой ремиссии (6 месяцев или более) у вылечившихся ритуксимабом пациентов.

Пример 8

Гуманизированные варианты 2H7, применимые здесь

Для целей данного изобретения применимы гуманизированные антитела 2H7, содержащие одну, две, три, четыре, пять или шесть из следующих CDR-последовательностей:

последовательность CDR L1 RASSSVSYXH, где X обозначает M или L (SEQ ID NO:35), например SEQ ID NO:4 (фиг.1A),

последовательность CDR L2 SEQ ID NO:5 (фиг.1A),

последовательность CDR L3 QQWXFNPPT, где X обозначает S или A (SEQ ID NO:36), например SEQ ID NO:6 (фиг.1A),

последовательность CDR H1 SEQ ID NO:10 (фиг.1B),

последовательность CDR H2 AIYPGNGXTSYNQKFKG, где X обозначает D или A (SEQ ID NO:37), например SEQ ID NO:11 (фиг.1B),

последовательность CDR H3 VVYYSSXXYWYFDV, где X в положении 6 обозначает N, A, W или D, а X в положении 7 обозначает S или R (SEQ ID NO:38), например SEQ ID NO:12 (фиг.1B).

Гуманизированные антитела 2H7 включают в себя в данном изобретении антитела с аминокислотными последовательностями тяжелой цепи, содержащими С-концевой лизин, и аминокислотные последовательности тяжелой цепи без С-концевого лизина. Приведенные выше последовательности CDR обычно присутствуют в каркасных последовательностях вариабельной легкой цепи и вариабельной тяжелой цепи человека, например по существу консенсусных FR-остатках человека легкой цепи каппа подгруппы I человека (V_L6I) и по существу консенсусных FR-остатках человека тяжелой цепи подгруппы III (V_HIII) человека. См. также WO 2004/056312 (Lowman et al.).

Вариабельный район тяжелой цепи может быть присоединен к константному району IgG-цепи человека, где этим районом может быть, например, IgG1 или IgG3, в том числе константные районы нативной последовательности или ненативной последовательности.

В предпочтительном варианте осуществления такое антитело содержит последовательность вариабельного домена тяжелой цепи SEQ ID NO:8 (v16, как показано на фиг.1B) и необязательно также содержит последовательность вариабельного домена легкой цепи SEQ ID NO:2 (v16, как показано на фиг.1A), причем это антитело необязательно содержит одну или несколько аминокислотных замен в положениях 56, 100 и/или 100a, например D56A, N100A или N100Y и/или S100aR в вариабельном домене тяжелой цепи и одну или несколько аминокислотных замен в положениях 32 и/или 92, например M32L и/или S92A, в вариабельном домене легкой цепи. Предпочтительно, это антитело является интактным антителом, содержащим аминокислотную последовательность легкой цепи SEQ ID NO:13 или 30 и аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:14, 15, 29, 31, 34 или 39, причем последовательность SEQ ID NO:39 приведена ниже.

Предпочтительным гуманизированным антителом 2H7 является окрелищумаб (Genentech, Inc.).

Описанное здесь антитело может дополнительно содержать по меньшей мере одну дополнительную аминокислотную замену в Fc-районе, которая улучшает активность ADCC, например антитело, в котором эти аминокислотные замены находятся в положениях 298, 333 и 334, предпочтительно S298A, E333A и K334A, с Eu-нумерацией остатков тяжелой цепи. См. также Патент США №6737056, L.Presta.

Любое из этих антител может содержать по меньшей мере одну замену в Fc-районе, которая улучшает FcRn-связывание или полупериод существования в сыворотке, например антитело, содержащее по меньшей мере одну замену в положении 434 тяжелой цепи, такую как N434W. См. также Патент США №6737056, L.Presta.

Любое из этих антител может дополнительно содержать по меньшей мере одну аминокислотную замену в Fc-районе, которая увеличивает активность CDC, например антитело, содержащее замену в положении 326, предпочтительно K326A или K326W. См. также Патент США №6528624, Idusogie et al.

Некоторые предпочтительные варианты гуманизированного 2H7 являются вариантами, содержащими вариабельный домен легкой цепи SEQ ID NO:2 и вариабельный домен тяжелой цепи SEQ ID NO:8, в том числе варианты с заменами или без замен в Fc-районе (если он присутствует) и варианты, содержащие вариабельный домен тяжелой цепи с изменением в SEQ ID NO:8 N100A; или D56A и N100A; или D56A, N100Y и S100aR; и вариабельный домен легкой цепи с изменением в SEQ ID NO:2 M32L; или S92A; или M32L и S92A.

M34 в вариабельном домене тяжелой цепи 2H7.v16 был идентифицирован в качестве потенциального источника стабильности антитела и является другим потенциальным кандидатом для замены.

Суммируя некоторые различные предпочтительные варианты осуществления данного изобретения, авторы отмечают, что вариабельный район вариантов на основе 2H7.v16 содержит аминокислотные последовательности v16, за исключением положений аминокислотных замен, которые указаны в таблице 4 ниже. Если нет других указаний, варианты 2H7 будут иметь ту же самую легкую цепь, что и v16.

Таблица 4

Примеры вариантов гуманизированного антитела 2H7

Версия 2H7	Изменения тяжелой цепи (V _H)	Изменения легкой цепи (V _L)	Изменения Fc
16 в качестве ссылки			
31	-	-	S298A, E333A, K334A
73	N100 A	M32L	
75	N100 A	M32L	S298A, E333A, K334A
96	D56A, N100A	S92A	
114	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A
115	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, E356D, M358L
116	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, K322A, K334A,
138	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, K326A, E333A, K334A
477	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, K326A, E333A, K334A, N434W
375	-	-	K334L
588	-	~	S298A, K326A, E333A, K334A
511	D56A, N100Y, S100aR	M32L, S92A	S298A, K326A, E333A, K334A

Одно предпочтительное гуманизированное антитело 2H7 содержит

последовательность вариабельного домена легкой цепи:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISLQPEDFATYYCQQWSFNPPTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:2);

и последовательность варибельного домена тяжелой цепи:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSYNQKFK
GRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSNSYWFYFDVWGQGTLLTVSS (SEQ ID
NO:8).

Если гуманизированное антитело 2H7.v16 является интактным
антителом, оно может содержать аминокислотную последовательность
легкой цепи:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISLQPEDFATYYCQWQSFNPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN
FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP
VTKSFNRGEC (SEQ ID NO:13);

и аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID
NO:14 или:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSYNQKFK
GRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSNSYWFYFDVWGQGTLLTVSSASTKGPSV
FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL
GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:15).

Другое предпочтительное гуманизированное антитело 2H7
содержит последовательность варибельного домена легкой цепи
2H7.v511:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISLQPEDFATYYCQWAFNPPTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:39)

и последовательность варибельного домена тяжелой цепи
2H7.v511:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGATSYNQKFK
GRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSYRYWFYFDVWGQGTLLTVSS (SEQ ID
NO:40).

Если гуманизированное антитело 2H7.v511 является интактным

антителом, оно может содержать аминокислотную последовательность легкой цепи:

5 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISLQPEDFATYYCQQWAFNPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN
FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP
VTKSFNRGEC (SEQ ID NO:30)

10 и аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID
NO:31 или:

15 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGATSYNQKFK
GRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSYRYWYFDVWGQGTLLTVSSASTKGPSV
FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSL
GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
20 VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
AALPAPIAATISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:41).

25 См. фигуры 7 и 8, которые сопоставляют зрелые легкие и
тяжелые цепи, соответственно, гуманизированного 2H7.v511 с
гуманизированным 2H7.v16 с использованием С-концевой
30 последовательности лизина для тяжелой цепи.

Если гуманизированное антитело 2H7.v31 является интактным
антителом, оно может содержать аминокислотную последовательность
35 легкой цепи:

40 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISLQPEDFATYYCQQWAFNPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN
FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP
VTKSFNRGEC (SEQ ID NO:13)

и аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID
45 NO:15 или:

50

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSYNQKFK
 GRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSNSYWFYFDVWGQGLVTVSSASTKGPSV
 FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL
 GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
 VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
 KALPAPIAATISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
 TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:42) or:
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGATSYNQKFK
 GRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSYRYWFYFDVWGQGLVTVSSASTKGPSV
 FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL
 GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
 VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
 AALPAPIAATISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
 TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:43).

Предпочтительным вариантом здесь является вариант, в котором это антитело
 является гуманизированным 2H7, содержащим последовательности переменного
 домена, показанные в SEQ ID NO:2 и 8 (версия 16). Другим предпочтительным
 вариантом здесь является вариант, в котором это антитело является
 гуманизированным 2H7, содержащим последовательности переменного домена,
 показанные в SEQ ID NO:39 и 40 (версия 511). Кроме того, предпочтительным
 вариантом является вариант, в котором это антитело является гуманизированным
 2H7, содержащим последовательности переменного домена, показанные в SEQ ID
 NO:32 и 33 (см. фигуру 9, версию 114), например вариант, содержащий
 последовательности переменного домена легкой цепи, показанные в SEQ ID NO:32,
 и аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:34. Кроме того,
 предпочтительным вариантом является вариант, в котором это антитело является
 гуманизированным 2H7, содержащим переменный домен тяжелой цепи с
 изменением N100A, или D56A и N100A, или D56A, N100Y и S100aR в SEQ ID NO:8 и
 переменный домен тяжелой цепи с изменением M32L, или S92A, или M32L и S92A
 в SEQ ID NO:2.

Формула изобретения

1. Способ лечения васкулита, обусловленного цитоплазматическими антителами
 против нейтрофилов (ANCA-обусловленного васкулита) у пациента, включающий
 введение пациенту CD20-антитела в дозе 400 мг - 1,3 г с частотой одна-три дозы в
 течение одного месяца, а затем воздействие антитела второй раз, причем на момент
 второго воздействия пациент находится в стадии полной или частичной ремиссии.

2. Способ по п.1, в котором доза составляет 500 мг - 1,2 г.

3. Способ по п.1, в котором доза составляет 750 мг - 1,1 г.

4. Способ по п.1, в котором антитело вводят в двух-трех дозах.

5. Способ по п.1, в котором антитело вводят в трех дозах.

6. Способ по п.1, в котором антитело вводят в течение периода 2-3 недель.

7. Способ по п.6, в котором период равен трем неделям.

8. Способ по п.1, в котором ANCA-обусловленный васкулит является
 гранулематозом Вегнера.

9. Способ по п.1, в котором ANCA-обусловленный васкулит является

микроскопической ангиопатией.

10. Способ по п.1, в котором второе лекарственное средство вводят в эффективном количестве, а первым лекарственным средством является CD20-антитело.

11. Способ по п.10, в котором вторым лекарственным средством является более одного лекарственного средства.

12. Способ по п.10 или 11, в котором вторым лекарственным средством является химиотерапевтическое средство, иммуносупрессивное средство, модифицирующее заболевание противоревматическое средство (DMARD), цитотоксическое средство, антагонист интегрина, нестероидное противовоспалительное лекарственное средство (NSAID), антагонист цитокина, или гормон, или их комбинация.

13. Способ по п.12, в котором вторым лекарственным средством является стероидное средство, или иммуносупрессивное средство, или оба эти средства.

14. Способ по п.13, в котором вторым лекарственным средством является стероидное средство.

15. Способ по п.14, в котором вторым лекарственным средством является кортикостероид.

16. Способ по п.15, в котором стероидным средством является преднизон, преднизолон, метилпреднизолон, гидрокортизон или дексаметазон.

17. Способ по п.14, в котором стероидное средство вводят в более низком количестве, чем то, которое вводят пациенту, не получающему терапию CD20-антителом при лечении стероидными средствами.

18. Способ по п.13, в котором вторым лекарственным средством является иммуносупрессивное средство.

19. Способ по п.18, в котором иммуносупрессивным средством является циклофосфамид, хлорамбуцил, микофенолят-мофетил, лефлуномид, азатиоприн или метотрексат.

20. Способ по п.19, в котором иммуносупрессивным средством является циклофосфамид.

21. Способ по п.13, в котором вторым лекарственным средством является стероидное средство и иммуносупрессивное средство.

22. Способ по п.1, в котором пациент никогда ранее не получал терапии CD20-антителом.

23. Способ по п.1, в котором пациент не имел рецидива васкулита.

24. Способ по п.1, в котором антителом является голое антитело.

25. Способ по п.1, в котором антитело конъюгировано с другой молекулой.

26. Способ по п.25, в котором другой молекулой является цитотоксическое средство.

27. Способ по п.1, в котором антитело вводят внутривенно.

28. Способ по п.1, в котором антитело вводят подкожно.

29. Способ по п.1, в котором индивидууму для лечения ANCA-обусловленного васкулита на проводят терапии другим лекарственным средством кроме CD20-антитела.

30. Способ по п.1, в котором антителом является ритуксимаб.

31. Способ по п.1, в котором антителом является гуманизированное антитело 2H7, содержащее последовательности вариабельного домена, представленные в SEQ ID NO: 2 и 8.

32. Способ по п.1, в котором антителом является гуманизированное антитело

2H7, содержащее последовательности вариабельного домена, представленные SEQ ID NO: 39 и 40.

33. Способ по п.1, в котором антителом является гуманизированное антитело 2H7, содержащее последовательности вариабельного домена, представленные в SEQ ID NO: 32 и 33.

34. Способ по п.1, в котором антителом является гуманизированное антитело 2H7, содержащее вариабельный домен тяжелой цепи с изменением N100A, или D56A, и N100A, или D56A, N100Y и S100aR в последовательности SEQ ID NO: 8 и вариабельный домен легкой цепи с изменением M32L, или S92A, или M32L, и S92A в последовательности SEQ ID NO: 2.

35. Способ по п.1, в котором балльная оценка BVAS/WG у пациента через шесть месяцев после введения антитела составляет 0.

36. Способ по п.1, в котором пациент имеет повышенный уровень антинуклеарных антител (ANA), антител против ревматоидного фактора (RF), креатинина, азота мочевины крови, антиэндотелиальных антител, антинейтрофильных цитоплазматических антител (ANCA) или их комбинации.

37. Изделие, содержащее:

а. контейнер, содержащий CD20-антитело; и

б. листовку-вкладыш с информацией о лечении обусловленного антинейтрофильными цитоплазматическими антителами васкулита (ANCA-ассоциированного васкулита) у пациента, в котором указано, что пациенту следует вводить дозу CD20-антитела в количестве 400 мг - 1,3 г с частотой одна-три дозы в течение одного месяца, а затем воздействовать антителом второй раз, причем на момент второго воздействия пациент находится в стадии полной или частичной ремиссии.

38. Изделие по п.37 дополнительно содержащее контейнер, содержащий второе лекарственное средство, в котором CD20-антитело является первым лекарственным средством, и, кроме того, содержащий листовку-вкладыш с информацией о лечении пациента вторым лекарственным средством.

39. Изделие по п.38, в котором вторым лекарственным средством является химиотерапевтическое средство, иммуносупрессивное средство, цитотоксическое средство, антагонист интегрина, антагонист цитокина или гормон.

40. Изделие по п.38 или 39, в котором вторым лекарственным средством является стероидное средство, или иммуносупрессивное средство, или оба эти средства.

41. Способ лечения обусловленного антинейтрофильными цитоплазматическими антителами васкулита (ANCA-обусловленного васкулита) у индивидуума, включающий введение эффективного количества CD20-антитела индивидууму для начального воздействия антитела, а затем воздействия антитела второй и третий раз, причем воздействие антитела второй раз предусмотрено не ранее чем через 16-54 недели после первого, а воздействие антитела третий раз предусмотрено не ранее чем через 46-60 недель после первого.

42. Способ по п.41, в котором каждое воздействие антитела на организм индивидуума предусмотрено в виде единственной дозы или в виде двух или трех отдельных доз антитела.

43. Способ по п.41 или 42, в котором второе воздействие предусмотрено не ранее чем через 20-30 недель после начального воздействия.

44. Способ по п.41, в котором второе воздействие предусмотрено не ранее чем через 46-54 недели после начального воздействия.

45. Способ по п.41, в котором и начальное, и второе воздействие антитела предусмотрено в количестве 0,5-4 г.

46. Способ по п.41, в котором и начальное и второе воздействие антитела предусмотрено в количестве 1,5-3,5 г.

5 47. Способ по п.41, в котором и начальное, и второе воздействие антитела предусмотрено в количестве 1,5-2,5 г.

48. Способ по п.41, в котором третье воздействие антитела предусмотрено в количестве 0,5-4,0 г.

10 49. Способ по п.41 или 48, в котором третье воздействие антитела предусмотрено в количестве 1,5-3,5 г.

50. Способ по п.41 или 48, в котором третье воздействие антитела предусмотрено в количестве 1,5-2,5 г.

15 51. Способ по п.41, в котором третье воздействие предусмотрено не ранее чем через 46-55 недель после начального воздействия.

52. Способ по п.41, в котором дополнительное воздействие антитела предусмотрено не ранее чем по меньшей мере через 70-75 недель после начального воздействия.

20 53. Способ по п.52, в котором дополнительное воздействие антитела предусмотрено не ранее чем по меньшей мере через 74-80 недель после начального воздействия.

54. Способ по п.41, в котором одно или несколько воздействий антитела на организм индивидуума предусмотрено в виде единственной дозы антитела.

25 55. Способ по п.41, в котором каждое воздействие антитела предусмотрено индивидууму в виде единственной дозы антитела.

56. Способ по п.41, в котором одно или несколько воздействий антитела предусмотрено индивидууму в виде отдельных доз антитела.

30 57. Способ по п.41, в котором каждое воздействие антитела предусмотрено в виде отдельных доз антитела.

58. Способ по п.56, в котором отдельные дозы составляют 2-3 дозы.

59. Способ по п.56, в котором отдельные дозы составляют первую и вторую дозы.

35 60. Способ по п.56, в котором отдельные дозы составляют первую, вторую и третью дозы.

61. Способ по п.56, в котором более позднюю дозу вводят в течение 1-20 дней со дня введения предыдущей дозы.

40 62. Способ по п.56, в котором более позднюю дозу вводят в течение 6-16 дней со дня введения предыдущей дозы.

63. Способ по п.56, в котором более позднюю дозу вводят в течение 14-16 дней со дня введения предыдущей дозы.

64. Способ по п.56, в котором отдельные дозы вводят в течение всего периода, составляющего от 1 дня до 4 недель.

45 65. Способ по п.56, в котором отдельные дозы вводят в течение всего периода, составляющего от 1 дня до 25 дней.

50 66. Способ по п.56, в котором отдельные дозы вводят один раз в неделю, а вторую дозу вводят через неделю после первой дозы, и любую дозу потом вводят через неделю после введения предыдущей дозы.

67. Способ по п.56, в котором каждая отдельная доза антитела составляет 0,5-1,5 г.

68. Способ по п.56, в котором каждая отдельная доза антитела составляет 0,75-1,3 г.

69. Способ по п.41, в котором предусмотрено 4-20 воздействий антитела на организм индивидуума.

70. Способ по п.41, в котором второе лекарственное средство вводят в эффективном количестве вместе с воздействием антитела, а CD20-антитело является первым лекарственным средством.

71. Способ по п.70, в котором второе лекарственное средство вводят вместе с начальным воздействием.

72. Способ по п.70 или 71, в котором второе лекарственное средство вводят вместе с начальным и вторым воздействием.

73. Способ по п.70, в котором второе лекарственное средство вводят вместе со всеми воздействиями.

74. Способ по п.70, в котором вторым лекарственным средством является химиотерапевтическое средство, иммуносупрессивное средство, модифицирующее заболевание противоревматическое средство (DMARD), цитотоксическое средство, антагонист интегрина, нестероидное противовоспалительное лекарственное средство (NSAID), антагонист цитокина, или гормон, или их комбинация.

75. Способ по п.70, в котором вторым лекарственным средством является стероидное средство, или иммуносупрессивное средство, или оба эти средства.

76. Способ по п.70, в котором вторым лекарственным средством является стероидное средство.

77. Способ по п.76, в котором стероидным средством является кортикостероид.

78. Способ по п.77, в котором стероидным средством является преднизон, преднизолон, метилпреднизолон, гидрокортизон или дексаметазон.

79. Способ по п.76, в котором стероидное средство вводят в более низком количестве, чем то, которое вводят пациенту, не получающему терапию CD20-антителом при лечении стероидными средствами.

80. Способ по п.70, в котором вторым лекарственным средством является иммуносупрессивное средство.

81. Способ по п.80, в котором иммуносупрессивным средством является циклофосфамид, хлорамбуцил, лефлуномид, микофенолят-мофетил, азатиоприн или метотрексат.

82. Способ по п.81, в котором иммуносупрессивным средством является циклофосфамид.

83. Способ по п.70, в котором второе лекарственное средство содержит стероидное средство и иммуносупрессивное средство.

84. Способ по п.71, в котором второе лекарственное средство не вводят вместе со вторым воздействием или вводят в более низком количестве, чем то, которое вводят вместе с начальным воздействием.

85. Способ по п.41, в котором в качестве начального воздействия вводят 2-3 г CD20-антитела.

86. Способ по п.85, в котором в качестве начального воздействия вводят 1 г CD20-антитела один раз в неделю в течение трех недель.

87. Способ по п.85 или 86, в котором второе воздействие предусмотрено в течение шести месяцев после начального воздействия, а антитело вводят в количестве 2 г.

88. Способ по п.85, в котором второе воздействие предусмотрено в течение шести месяцев после начального воздействия и оно предусматривает введение 1 г антитела с последующим введением через две недели еще 1 г антитела.

89. Способ по п.85, в котором в качестве начального воздействия предусмотрено

введение 1 г CD20-антитела с последующим введением через две недели еще 1 г антитела.

90. Способ по п.89, в котором второе воздействие предусмотрено в течение шести месяцев после начального воздействия и оно предусматривает введение антитела в количестве 2 г.

91. Способ по п.89 или 90, в котором второе воздействие предусмотрено в течение шести месяцев после начального воздействия и оно предполагает введение 1 г антитела с последующим введением через две недели еще 1 г антитела.

92. Способ по п.85, в котором стероидное средство вводят индивидууму перед начальным воздействием или вместе с начальным воздействием.

93. Способ по п.92, в котором стероидное средство не вводят со вторым воздействием или вводят, но в более низком количестве, чем то, которое используют вместе с начальным воздействием.

94. Способ по п.92, в котором стероидное средство не вводят вместе с третьим или более поздними воздействиями.

95. Способ по п.41, в котором индивидуум никогда ранее не получал терапию CD20-антителом.

96. Способ по п.41, в котором индивидуум находится в стадии ремиссии после начального или более позднего воздействия антитела.

97. Способ по п.41, в котором индивидуум находится в стадии ремиссии в то время, когда предусмотрено второе воздействие антитела.

98. Способ по п.97, в котором индивидуум находится в стадии ремиссии в то время, когда предусмотрены все воздействия антитела.

99. Способ по п.41, в котором для начального и второго воздействия антитела предусмотрено одно и то же CD20-антитело.

100. Способ по п.41, в котором для всех воздействий антитела предусмотрено одно и то же CD20-антитело.

101. Способ по п.41, в котором антитело является голым антителом.

102. Способ по п.41, в котором антитело конъюгировано с другой молекулой.

103. Способ по п.102, в котором другой молекулой является цитотоксическое средство.

104. Способ по п.41, в котором антитело вводят внутривенно.

105. Способ по п.104, в котором антитело вводят внутривенно в каждом случае воздействия антитела.

106. Способ по п.41, в котором антитело вводят подкожно.

107. Способ по п.106, в котором антитело вводят подкожно в каждом случае воздействия антитела.

108. Способ по п.41, в котором для лечения ANCA-обусловленного васкулита у индивидуума не вводят никакого другого лекарственного средства, кроме CD20-антитела.

109. Способ по п.41, в котором ANCA-обусловленный васкулит является гранулематозом Вегнера.

110. Способ по п.41, в котором ANCA-обусловленный васкулит является микроскопической ангиопатией.

111. Способ по п.41, в котором антителом является ритуксимаб.

112. Способ по п.41, в котором антителом является гуманизированное антитело 2H7, содержащее последовательности переменных доменов SEQ ID NO: 2 и 8.

113. Способ по п.41, в котором этим антителом является гуманизированное

антитело 2H7, содержащее последовательности вариабельных доменов SEQ ID NO: 39 и 40.

114. Способ по п.41 в котором антителом является гуманизированное антитело 2H7, содержащее последовательности вариабельных доменов SEQ ID NO: 32 и 33.

115. Способ по п.41, в котором антителом является гуманизированное антитело 2H7, содержащее вариабельный домен тяжелой цепи с изменением N100A, или D56A, и N100 A, или D56A, N100Y и S100aR в последовательности SEQ ID NO: 8, и вариабельный домен легкой цепи с изменением M32L, или S92A, или M32L, и S92A в последовательности SEQ ID NO: 2.

116. Способ по п.41, в котором бальная оценка BVAS/WG пациента через шесть месяцев после введения этого антитела составляет 0.

117. Способ по п.41, в котором пациент имеет повышенный уровень антинуклеарных антител (ANA), антител против ревматоидного фактора (RF), креатинина, азота мочевины крови, антиэндотелиальных антител, антинейтрофильных цитоплазматических антител (ANCA) или их комбинаций.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> GENENTECH, INC. , BRUNETTA, PAUL G.

<120> СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ ВАСКУЛИТА

<130> P2177R1 PCT

<140> PCT/US2005/034647

<141> 2005-09-28

<150> US 60/616,104

<151> 2004-10-05

<160> 43

<210> 1

<211> 107

<212> Белок

<213> Mus musculus

<400> 1

```

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

```

Lys Arg

<210> 2

<211> 107

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность синтезирована

<400> 2

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1          5          10          15
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser
                20          25          30
Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro
                35          40          45
Leu Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg
                50          55          60
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

```

	65		70		75
Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp
				80	Phe
					Ala
					Thr
					Tyr
					85
					Tyr
					Cys
					Gln
					Gln
					Trp
					90
Ser	Phe	Asn	Pro	Pro	Thr
				95	Phe
					Gly
					Gln
					100
					Thr
					Lys
					Val
					Glu
					Ile
					105

Lys Arg

<210> 3
 <211> 108
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 3
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser
 20 25 30
 Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 35 40 45
 Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 80 85 90
 Tyr Asn Ser Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 95 100 105
 Ile Lys Arg

<210> 4
 <211> 26
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Последовательность синтезирована

<400> 4
 Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Ala Pro Ser Asn Leu
 1 5 10 15
 Ala Ser Gln Gln Trp Ser Phe Asn Pro Pro Thr
 20 25

<210> 5
 <211> 26
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Последовательность синтезирована

<400> 5
 Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Ala Pro Ser Asn Leu
 1 5 10 15

Ala Ser Gln Gln Trp Ser Phe Asn Pro Pro Thr
20 25

<210> 6
<211> 27
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательность синтезирована

<400> 6
Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Tyr Leu Ala Ala Ala Ser Ser
1 5 10 15

Leu Glu Ser Gln Gln Tyr Asn Ser Leu Pro Trp Thr
20 25

<210> 7
<211> 122
<212> Белок
<213> Mus musculus

<400> 7
Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly
1 5 10 15
Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30
Ser Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu
35 40 45
Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr
50 55 60
Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser
65 70 75
Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp
80 85 90
Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser
95 100 105
Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val
110 115 120
Ser Ser

<210> 8
<211> 122
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательность синтезирована

<400> 8
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30
Ser Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45

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

<210> 9
<211> 119
<212> Белок
<213> Homo sapiens

<400> 9
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
20 25 30
Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45
Glu Trp Val Ala Val Ile Ser Gly Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr
50 55 60
Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
65 70 75
Lys Asn Thr Leu Thr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Val Gly Tyr Ser Leu
95 100 105
Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
110 115

<210> 10
<211> 40
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательность синтезирована

<400> 10
Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His Ala Ile Tyr Pro Gly
1 5 10 15
Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Val Val Tyr
20 25 30
Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
35 40

<210> 11

<211> 40
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Последовательность синтезирована

<400> 11
 Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His Ala Ile Tyr Pro Gly
 1 5 10 15
 Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Val Val Tyr
 20 25 30
 Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
 35 40

<210> 12
 <211> 37
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Последовательность синтезирована

<400> 12
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Val Ile Ser Gly Asp
 1 5 10 15
 Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Gly Arg Val
 20 25 30
 Gly Tyr Ser Leu Tyr Asp Tyr
 35

<210> 13
 <211> 213
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Последовательность синтезирована

<400> 13
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro
 35 40 45
 Leu Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg
 50 55 60
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75
 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
 80 85 90
 Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 95 100 105
 Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser
 110 115 120

Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu
				125					130					135
Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp
				140					145					150
Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln
				155					160					165
Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu
				170					175					180
Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val
				185					190					195
Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg
				200					205					210

Gly Glu Cys

<210> 14
 <211> 452
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Последовательность синтезирована

<400> 14

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly
1				5					10					15
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr
				20					25					30
Ser	Tyr	Asn	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu
				35					40					45
Glu	Trp	Val	Gly	Ala	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asn	Gly	Asp	Thr	Ser	Tyr
				50					55					60
Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Lys	Ser
				65					70					75
Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp
				80					85					90
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Val	Val	Tyr	Tyr	Ser	Asn	Ser
				95					100					105
Tyr	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val
				110					115					120
Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro
				125					130					135
Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu
				140					145					150
Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser
				155					160					165
Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln
				170					175					180
Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser
				185					190					195

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
200 205 210
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
215 220 225
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
230 235 240
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
245 250 255
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
260 265 270
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
275 280 285
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
290 295 300
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
305 310 315
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
320 325 330
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
335 340 345
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
350 355 360
Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
365 370 375
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
380 385 390
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
395 400 405
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
410 415 420
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
425 430 435
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
440 445 450

Gly Lys

<210> 15
<211> 452
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательность синтезирована

<400> 15
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr

					20						25						30
Ser	Tyr	Asn	Met	His	35	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	40	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	45
Glu	Trp	Val	Gly	Ala	50	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asn	55	Gly	Asp	Thr	Ser	Tyr	60
Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	65	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	70	Ser	Val	Asp	Lys	Ser	75
Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	80	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	85	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	90
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	95	Cys	Ala	Arg	Val	Val	100	Tyr	Tyr	Ser	Asn	Ser	105
Tyr	Trp	Tyr	Phe	Asp	110	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	115	Thr	Leu	Val	Thr	Val	120
Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	125	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	130	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	135
Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	140	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	145	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	150
Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	155	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	160	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	165
Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	170	Gly	Val	His	Thr	Phe	175	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	180
Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	185	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	190	Val	Thr	Val	Pro	Ser	195
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	200	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	205	Asn	Val	Asn	His	Lys	210
Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	215	Val	Asp	Lys	Lys	Val	220	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	225
Asp	Lys	Thr	His	Thr	230	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	235	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	240
Gly	Gly	Pro	Ser	Val	245	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	250	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	255
Leu	Met	Ile	Ser	Arg	260	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	265	Cys	Val	Val	Val	Asp	270
Val	Ser	His	Glu	Asp	275	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	280	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	285
Gly	Val	Glu	Val	His	290	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	295	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	300
Tyr	Asn	Ala	Thr	Tyr	305	Arg	Val	Val	Ser	Val	310	Leu	Thr	Val	Leu	His	315
Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	320	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	325	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	330
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	335	Pro	Ile	Ala	Ala	Thr	340	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	345
Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	350	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	355	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	360

Glu Glu Met Thr Lys 365 Asn Gln Val Ser Leu 370 Thr Cys Leu Val Lys 375
 Gly Phe Tyr Pro Ser 380 Asp Ile Ala Val Glu 385 Trp Glu Ser Asn Gly 390
 Gln Pro Glu Asn Asn 395 Tyr Lys Thr Thr Pro 400 Pro Val Leu Asp Ser 405
 Asp Gly Ser Phe Phe 410 Leu Tyr Ser Lys Leu 415 Thr Val Asp Lys Ser 420
 Arg Trp Gln Gln Gly 425 Asn Val Phe Ser Cys 430 Ser Val Met His Glu 435
 Ala Leu His Asn His 440 Tyr Thr Gln Lys Ser 445 Leu Ser Leu Ser Pro 450
 Gly Lys

<210> 16
 <211> 285
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 16
 Met Asp Asp Ser Thr 5 Glu Arg Glu Gln Ser 10 Arg Leu Thr Ser Cys 15
 1
 Leu Lys Lys Arg Glu 20 Glu Met Lys Leu Lys 25 Glu Cys Val Ser Ile 30
 Leu Pro Arg Lys Glu 35 Ser Pro Ser Val Arg 40 Ser Ser Lys Asp Gly 45
 Lys Leu Leu Ala Ala 50 Thr Leu Leu Leu Ala 55 Leu Leu Ser Cys Cys 60
 Leu Thr Val Val Ser 65 Phe Tyr Gln Val Ala 70 Ala Leu Gln Gly Asp 75
 Leu Ala Ser Leu Arg 80 Ala Glu Leu Gln Gly 85 His His Ala Glu Lys 90
 Leu Pro Ala Gly Ala 95 Gly Ala Pro Lys Ala 100 Gly Leu Glu Glu Ala 105
 Pro Ala Val Thr Ala 110 Gly Leu Lys Ile Phe 115 Glu Pro Pro Ala Pro 120
 Gly Glu Gly Asn Ser 125 Ser Gln Asn Ser Arg 130 Asn Lys Arg Ala Val 135
 Gln Gly Pro Glu Glu 140 Thr Val Thr Gln Asp 145 Cys Leu Gln Leu Ile 150
 Ala Asp Ser Glu Thr 155 Pro Thr Ile Gln Lys 160 Gly Ser Tyr Thr Phe 165
 Val Pro Trp Leu Leu 170 Ser Phe Lys Arg Gly 175 Ser Ala Leu Glu Glu 180
 Lys Glu Asn Lys Ile 185 Leu Val Lys Glu Thr 190 Gly Tyr Phe Phe Ile 195
 Tyr Gly Gln Val Leu 200 Tyr Thr Asp Lys Thr 205 Tyr Ala Met Gly His 210

Leu Ile Gln Arg Lys Lys Val His Val Phe Gly Asp Glu Leu Ser
 215 220 225
 Leu Val Thr Leu Phe Arg Cys Ile Gln Asn Met Pro Glu Thr Leu
 230 235 240
 Pro Asn Asn Ser Cys Tyr Ser Ala Gly Ile Ala Lys Leu Glu Glu
 245 250 255
 Gly Asp Glu Leu Gln Leu Ala Ile Pro Arg Glu Asn Ala Gln Ile
 260 265 270
 Ser Leu Asp Gly Asp Val Thr Phe Phe Gly Ala Leu Lys Leu Leu
 275 280 285

<210> 17
 <211> 309
 <212> Белок
 <213> Mus musculus

<400> 17
 Met Asp Glu Ser Ala Lys Thr Leu Pro Pro Pro Cys Leu Cys Phe
 1 5 10 15
 Cys Ser Glu Lys Gly Glu Asp Met Lys Val Gly Tyr Asp Pro Ile
 20 25 30
 Thr Pro Gln Lys Glu Glu Gly Ala Trp Phe Gly Ile Cys Arg Asp
 35 40 45
 Gly Arg Leu Leu Ala Ala Thr Leu Leu Leu Ala Leu Leu Ser Ser
 50 55 60
 Ser Phe Thr Ala Met Ser Leu Tyr Gln Leu Ala Ala Leu Gln Ala
 65 70 75
 Asp Leu Met Asn Leu Arg Met Glu Leu Gln Ser Tyr Arg Gly Ser
 80 85 90
 Ala Thr Pro Ala Ala Ala Gly Ala Pro Glu Leu Thr Ala Gly Val
 95 100 105
 Lys Leu Leu Thr Pro Ala Ala Pro Arg Pro His Asn Ser Ser Arg
 110 115 120
 Gly His Arg Asn Arg Arg Ala Phe Gln Gly Pro Glu Glu Thr Glu
 125 130 135
 Gln Asp Val Asp Leu Ser Ala Pro Pro Ala Pro Cys Leu Pro Gly
 140 145 150
 Cys Arg His Ser Gln His Asp Asp Asn Gly Met Asn Leu Arg Asn
 155 160 165
 Ile Ile Gln Asp Cys Leu Gln Leu Ile Ala Asp Ser Asp Thr Pro
 170 175 180
 Thr Ile Arg Lys Gly Thr Tyr Thr Phe Val Pro Trp Leu Leu Ser
 185 190 195
 Phe Lys Arg Gly Asn Ala Leu Glu Glu Lys Glu Asn Lys Ile Val
 200 205 210
 Val Arg Gln Thr Gly Tyr Phe Phe Ile Tyr Ser Gln Val Leu Tyr
 215 220 225
 Thr Asp Pro Ile Phe Ala Met Gly His Val Ile Gln Arg Lys Lys

				230						235				240
Val	His	Val	Phe	Gly	Asp	Glu	Leu	Ser	Leu	Val	Thr	Leu	Phe	Arg
				245					250					255
Cys	Ile	Gln	Asn	Met	Pro	Lys	Thr	Leu	Pro	Asn	Asn	Ser	Cys	Tyr
				260					265					270
Ser	Ala	Gly	Ile	Ala	Arg	Leu	Glu	Glu	Gly	Asp	Glu	Ile	Gln	Leu
				275					280					285
Ala	Ile	Pro	Arg	Glu	Asn	Ala	Gln	Ile	Ser	Arg	Asn	Gly	Asp	Asp
				290					295					300
Thr	Phe	Phe	Gly	Ala	Leu	Lys	Leu	Leu						
				305										

<210> 18
 <211> 17
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Последовательность синтезирована

<220>
 <221> Xaa
 <222> 1
 <223> X = любая аминокислота, за исключением цистеина

<220>
 <221> xaa
 <222> 3
 <223> X = любая аминокислота, за исключением цистеина

<220>
 <221> Xaa
 <222> 5
 <223> X = любая аминокислота, за исключением цистеина

<220>
 <221> xaa
 <222> 7-10
 <223> X = любая аминокислота, за исключением цистеина

<220>
 <221> xaa
 <222> 11, 12, 14, 15, 17
 <223> X = любая аминокислота, за исключением цистеина

<220>
 <221> xaa
 <222> 16
 <223> X = L, F, I или V

<400> 18
 Xaa Cys Xaa Asp Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa
 1 5 10 15
 Xaa Xaa

<210> 19
 <211> 17
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>

<223> Последовательность синтезирована

<400> 19

Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg Ala Trp Val Pro Cys Ser Val
1 5 10 15

Leu Lys

<210> 20

<211> 17

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность синтезирована

<400> 20

Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg His Trp Val Pro Cys Gly Leu
1 5 10 15

Leu Arg

<210> 21

<211> 17

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность синтезирована

<400> 21

Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg Arg Trp Val Pro Cys Glu Met
1 5 10 15

Leu Gly

<210> 22

<211> 17

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность синтезирована

<400> 22

Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg Ser Trp Val Pro Cys His Met
1 5 10 15

Leu Arg

<210> 23

<211> 17

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность синтезирована

<400> 23

Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg His Trp Val Ala Cys Gly Leu
1 5 10 15

Leu Arg

<210> 24
 <211> 16
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Последовательность синтезирована

 <400> 24
 Gln Cys Phe Asp Arg Leu Asn Ala Trp Val Pro Cys Ser Val Leu
 1 5 10 15

 Lys

 <210> 25
 <211> 17
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Последовательность синтезирована

 <220>
 <221> Xaa
 <222> 1, 3, 5, 8, 9, 14, 15, 17
 <223> Xaa = любая аминокислота, за исключением цистеина

 <400> 25
 Xaa Cys Xaa Asp Xaa Leu Val Xaa Xaa Trp Val Pro Cys Xaa Xaa
 1 5 10 15

 Leu Xaa

 <210> 26
 <211> 184
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

 <400> 26
 Met Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala
 1 5 10 15

 Pro Thr Pro Cys Val Pro Ala Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg
 20 25 30

 His Cys Val Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro
 35 40 45

 Ala Gly Ala Ser Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln
 50 55 60

 Glu Ser Val Gly Ala Gly Ala Gly Glu Ala Ala Leu Pro Leu Pro
 65 70 75

 Gly Leu Leu Phe Gly Ala Pro Ala Leu Leu Gly Leu Ala Leu Val
 80 85 90

 Leu Ala Leu Val Leu Val Gly Leu Val Ser Trp Arg Arg Arg Gln
 95 100 105

 Arg Arg Leu Arg Gly Ala Ser Ser Ala Glu Ala Pro Asp Gly Asp
 110 115 120

 Lys Asp Ala Pro Glu Pro Leu Asp Lys Val Ile Ile Leu Ser Pro
 125 130 135

Gly Ile Ser Asp Ala Thr Ala Pro Ala Trp Pro Pro Pro Gly Glu
140 145 150
Asp Pro Gly Thr Thr Pro Pro Gly His Ser Val Pro Val Pro Ala
155 160 165
Thr Glu Leu Gly Ser Thr Glu Leu Val Thr Thr Lys Thr Ala Gly
170 175 180
Pro Glu Gln Gln

<210> 27
<211> 26
<212> Белок
<213> Homo sapiens

<400> 27
Thr Pro Cys Val Pro Ala Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg His
1 5 10 15
Cys Val Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg
20 25

<210> 28
<211> 213
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательность синтезирована

<400> 28
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser
20 25 30
Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro
35 40 45
Leu Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg
50 55 60
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
80 85 90
Ala Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
95 100 105
Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser
110 115 120
Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
125 130 135
Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
140 145 150
Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
155 160 165
Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu

	170		175		180
Ser Lys Ala Asp	Tyr 185	Glu Lys His Lys	Val 190	Tyr Ala Cys Glu	Val 195
Thr His Gln Gly	Leu 200	Ser Ser Pro Val	Thr 205	Lys Ser Phe Asn	Arg 210
Gly Glu Cys					

<210> 29
 <211> 452
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Последовательность синтезирована

<400> 29
 Glu Val Gln Leu Val 5 Glu Ser Gly Gly Gly 10 Leu Val Gln Pro Gly 15
 Gly Ser Leu Arg Leu 20 Ser Cys Ala Ala Ser 25 Gly Tyr Thr Phe Thr 30
 Ser Tyr Asn Met His 35 Trp Val Arg Gln Ala 40 Pro Gly Lys Gly Leu 45
 Glu Trp Val Gly Ala 50 Ile Tyr Pro Gly Asn 55 Gly Ala Thr Ser Tyr 60
 Asn Gln Lys Phe Lys 65 Gly Arg Phe Thr Ile 70 Ser Val Asp Lys Ser 75
 Lys Asn Thr Leu Tyr 80 Leu Gln Met Asn Ser 85 Leu Arg Ala Glu Asp 90
 Thr Ala Val Tyr Tyr 95 Cys Ala Arg Val Val 100 Tyr Tyr Ser Ala Ser 105
 Tyr Trp Tyr Phe Asp 110 Val Trp Gly Gln Gly 115 Thr Leu Val Thr Val 120
 Ser Ser Ala Ser Thr 125 Lys Gly Pro Ser Val 130 Phe Pro Leu Ala Pro 135
 Ser Ser Lys Ser Thr 140 Ser Gly Gly Thr Ala 145 Ala Leu Gly Cys Leu 150
 Val Lys Asp Tyr Phe 155 Pro Glu Pro Val Thr 160 Val Ser Trp Asn Ser 165
 Gly Ala Leu Thr Ser 170 Gly Val His Thr Phe 175 Pro Ala Val Leu Gln 180
 Ser Ser Gly Leu Tyr 185 Ser Leu Ser Ser Val 190 Val Thr Val Pro Ser 195
 Ser Ser Leu Gly Thr 200 Gln Thr Tyr Ile Cys 205 Asn Val Asn His Lys 210
 Pro Ser Asn Thr Lys 215 Val Asp Lys Lys Val 220 Glu Pro Lys Ser Cys 225
 Asp Lys Thr His Thr 230 Cys Pro Pro Cys Pro 235 Ala Pro Glu Leu Leu 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 260 265 270
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 275 280 285
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 290 295 300
 Tyr Asn Ala Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 305 310 315
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 320 325 330
 Ala Ala Leu Pro Ala Pro Ile Ala Ala Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 335 340 345
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 350 355 360
 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 365 370 375
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 380 385 390
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 395 400 405
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 410 415 420
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 425 430 435
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 440 445 450
 Gly Lys

<210> 30
 <211> 213
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Последовательность синтезирована

<400> 30
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser
 20 25 30
 Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro
 35 40 45
 Leu Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg
 50 55 60
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
80 85 90
Ala Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
95 100 105
Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser
110 115 120
Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
125 130 135
Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
140 145 150
Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
155 160 165
Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu
170 175 180
Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val
185 190 195
Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
200 205 210
Gly Glu Cys

<210> 31
<211> 451
<212> Бeлoк
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательность синтезирована

<400> 31
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30
Ser Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45
Glu Trp Val Gly Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Ala Thr Ser Tyr Asn
50 55 60
Gln Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Lys
65 70 75
Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
80 85 90
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Tyr Arg Tyr
95 100 105
Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
110 115 120
Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
125 130 135
Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val

	140		145		150
Lys Asp Tyr Phe	Pro 155	Glu Pro Val Thr	Val 160	Ser Trp Asn Ser	Gly 165
Ala Leu Thr Ser	Gly 170	Val His Thr Phe	Pro 175	Ala Val Leu Gln	Ser 180
Ser Gly Leu Tyr	Ser 185	Leu Ser Ser Val	Val 190	Thr Val Pro Ser	Ser 195
Ser Leu Gly Thr	Gln 200	Thr Tyr Ile Cys	Asn 205	Val Asn His Lys	Pro 210
Ser Asn Thr Lys	Val 215	Asp Lys Lys Val	Glu 220	Pro Lys Ser Cys	Asp 225
Lys Thr His Thr	Cys 230	Pro Pro Cys Pro	Ala 235	Pro Glu Leu Leu	Gly 240
Gly Pro Ser Val	Phe 245	Leu Phe Pro Pro	Lys 250	Pro Lys Asp Thr	Leu 255
Met Ile Ser Arg	Thr 260	Pro Glu Val Thr	Cys 265	Val Val Val Asp	Val 270
Ser His Glu Asp	Pro 275	Glu Val Lys Phe	Asn 280	Trp Tyr Val Asp	Gly 285
Val Glu Val His	Asn 290	Ala Lys Thr Lys	Pro 295	Arg Glu Glu Gln	Tyr 300
Asn Ala Thr Tyr	Arg 305	Val Val Ser Val	Leu 310	Thr Val Leu His	Gln 315
Asp Trp Leu Asn	Gly 320	Lys Glu Tyr Lys	Cys 325	Lys Val Ser Asn	Ala 330
Ala Leu Pro Ala	Pro 335	Ile Ala Ala Thr	Ile 340	Ser Lys Ala Lys	Gly 345
Gln Pro Arg Glu	Pro 350	Gln Val Tyr Thr	Leu 355	Pro Pro Ser Arg	Glu 360
Glu Met Thr Lys	Asn 365	Gln Val Ser Leu	Thr 370	Cys Leu Val Lys	Gly 375
Phe Tyr Pro Ser	Asp 380	Ile Ala Val Glu	Trp 385	Glu Ser Asn Gly	Gln 390
Pro Glu Asn Asn	Tyr 395	Lys Thr Thr Pro	Pro 400	Val Leu Asp Ser	Asp 405
Gly Ser Phe Phe	Leu 410	Tyr Ser Lys Leu	Thr 415	Val Asp Lys Ser	Arg 420
Trp Gln Gln Gly	Asn 425	Val Phe Ser Cys	Ser 430	Val Met His Glu	Ala 435
Leu His Asn His	Tyr 440	Thr Gln Lys Ser	Leu 445	Ser Leu Ser Pro	Gly 450

Lys

<210> 32
 <211> 107
 <212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность синтезирована

<400> 32

```

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

Lys Arg

```

<210> 33

<211> 123

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность синтезирована

<400> 33

```

Phe Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
 1          5          10
Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
          20          25          30
Thr Ser Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
          35          40          45
Leu Glu Trp Val Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Ala Thr Ser
          50          55          60
Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys
          65          70          75
Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu
          80          85          90
Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Ala
          95          100          105
Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
          110          115          120

Val Ser Ser

```

<210> 34

<211> 451

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность синтезирована

<400> 34

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	1	5	10	15
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	20	25	30	
Ser	Tyr	Asn	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	35	40	45	
Glu	Trp	Val	Gly	Ala	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asn	Gly	Ala	Thr	Ser	Tyr	50	55	60	
Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Lys	Ser	65	70	75	
Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	80	85	90	
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Val	Val	Tyr	Tyr	Ser	Ala	Ser	95	100	105	
Tyr	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	110	115	120	
Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	125	130	135	
Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	140	145	150	
Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	155	160	165	
Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	170	175	180	
Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	185	190	195	
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	200	205	210	
Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	215	220	225	
Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	230	235	240	
Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	245	250	255	
Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	260	265	270	
Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	275	280	285	
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	290	295	300	
Tyr	Asn	Ala	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His				

	305		310		315
Gln Asp Trp Leu	Asn Gly Lys Glu Tyr	Lys Cys Lys Val Ser	Asn		
	320	325	330		
Lys Ala Leu Pro	Ala Pro Ile Ala Ala	Thr Ile Ser Lys Ala	Lys		
	335	340	345		
Gly Gln Pro Arg	Glu Pro Gln Val Tyr	Thr Leu Pro Pro Ser	Arg		
	350	355	360		
Glu Glu Met Thr	Lys Asn Gln Val Ser	Leu Thr Cys Leu Val	Lys		
	365	370	375		
Gly Phe Tyr Pro	Ser Asp Ile Ala Val	Glu Trp Glu Ser Asn	Gly		
	380	385	390		
Gln Pro Glu Asn	Asn Tyr Lys Thr Thr	Pro Pro Val Leu Asp	Ser		
	395	400	405		
Asp Gly Ser Phe	Phe Leu Tyr Ser Lys	Leu Thr Val Asp Lys	Ser		
	410	415	420		
Arg Trp Gln Gln	Gly Asn Val Phe Ser	Cys Ser Val Met His	Glu		
	425	430	435		
Ala Leu His Asn	His Tyr Thr Gln Lys	Ser Leu Ser Leu Ser	Pro		
	440	445	450		

Gly

<210> 35
 <211> 10
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Последовательность синтезирована

<220>
 <221> хаа
 <222> 9
 <223> X обозначает M или L

<400> 35
 Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr хаа His
 5 10

<210> 36
 <211> 9
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Последовательность синтезирована

<220>
 <221> хаа
 <222> 4
 <223> X обозначает S или A

<400> 36
 Gln Gln Trp хаа Phe Asn Pro Pro Thr
 5

<210> 37
 <211> 17

<212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Последовательность синтезирована
 <220>
 <221> хаа
 <222> 8
 <223> X обозначает D или A
 <400> 37
 Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Xaa Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 1 5 10 15
 Lys Gly
 <210> 38
 <211> 13
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Последовательность синтезирована
 <220>
 <221> хаа
 <222> 6
 <223> X обозначает N, A, Y, W или D
 <220>
 <221> хаа
 <222> 7
 <223> X обозначает S или R
 <400> 38
 Val Val Tyr Tyr Ser Xaa Xaa Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
 5 10
 <210> 39
 <211> 107
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Последовательность синтезирована
 <400> 39
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser
 20 25 30
 Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro
 35 40 45
 Leu Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg
 50 55 60
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75
 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
 80 85 90
 Ala Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile

95

100

105

Lys Arg

<210> 40
 <211> 122
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Последовательность синтезирована

<400> 40
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 20 25 30
 Ser Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 Glu Trp Val Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Ala Thr Ser Tyr
 50 55 60
 Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser
 65 70 75
 Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Tyr Arg
 95 100 105
 Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 110 115 120

Ser Ser

<210> 41
 <211> 451
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Последовательность синтезирована

<400> 41
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 20 25 30
 Ser Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 Glu Trp Val Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Ala Thr Ser Tyr
 50 55 60
 Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser
 65 70 75
 Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90

Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr ₉₅	Cys	Ala	Arg	Val	Val ₁₀₀	Tyr	Tyr	Ser	Tyr	Arg ₁₀₅
Tyr	Trp	Tyr	Phe	Asp ₁₁₀	Val	Trp	Gly	Gln	Gly ₁₁₅	Thr	Leu	Val	Thr	Val ₁₂₀
Ser	Ser	Ala	Ser	Thr ₁₂₅	Lys	Gly	Pro	Ser	Val ₁₃₀	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro ₁₃₅
Ser	Ser	Lys	Ser	Thr ₁₄₀	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala ₁₄₅	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu ₁₅₀
Val	Lys	Asp	Tyr	Phe ₁₅₅	Pro	Glu	Pro	Val	Thr ₁₆₀	Val	Ser	Trp	Asn	Ser ₁₆₅
Gly	Ala	Leu	Thr	Ser ₁₇₀	Gly	Val	His	Thr	Phe ₁₇₅	Pro	Ala	Val	Leu	Gln ₁₈₀
Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr ₁₈₅	Ser	Leu	Ser	Ser	Val ₁₉₀	Val	Thr	Val	Pro	Ser ₁₉₅
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr ₂₀₀	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys ₂₀₅	Asn	Val	Asn	His	Lys ₂₁₀
Pro	Ser	Asn	Thr	Lys ₂₁₅	Val	Asp	Lys	Lys	Val ₂₂₀	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys ₂₂₅
Asp	Lys	Thr	His	Thr ₂₃₀	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro ₂₃₅	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu ₂₄₀
Gly	Gly	Pro	Ser	Val ₂₄₅	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro ₂₅₀	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr ₂₅₅
Leu	Met	Ile	Ser	Arg ₂₆₀	Thr	Pro	Glu	Val	Thr ₂₆₅	Cys	Val	Val	Val	Asp ₂₇₀
Val	Ser	His	Glu	Asp ₂₇₅	Pro	Glu	Val	Lys	Phe ₂₈₀	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp ₂₈₅
Gly	Val	Glu	Val	His ₂₉₀	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys ₂₉₅	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln ₃₀₀
Tyr	Asn	Ala	Thr	Tyr ₃₀₅	Arg	Val	Val	Ser	Val ₃₁₀	Leu	Thr	Val	Leu	His ₃₁₅
Gln	Asp	Trp	Leu	Asn ₃₂₀	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys ₃₂₅	Cys	Lys	Val	Ser	Asn ₃₃₀
Ala	Ala	Leu	Pro	Ala ₃₃₅	Pro	Ile	Ala	Ala	Thr ₃₄₀	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys ₃₄₅
Gly	Gln	Pro	Arg	Glu ₃₅₀	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr ₃₅₅	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg ₃₆₀
Glu	Glu	Met	Thr	Lys ₃₆₅	Asn	Gln	Val	Ser	Leu ₃₇₀	Thr	Cys	Leu	Val	Lys ₃₇₅
Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser ₃₈₀	Asp	Ile	Ala	Val	Glu ₃₈₅	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly ₃₉₀
Gln	Pro	Glu	Asn	Asn ₃₉₅	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro ₄₀₀	Pro	Val	Leu	Asp	Ser ₄₀₅
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe ₄₁₀	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu ₄₁₅	Thr	Val	Asp	Lys	Ser ₄₂₀
Arg	Trp	Gln	Gln	Gly ₄₂₅	Asn	Val	Phe	Ser	Cys ₄₃₀	Ser	Val	Met	His	Glu ₄₃₅

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
440 445 450

Gly

<210> 42
<211> 451
<212> Блок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательность синтезирована

<400> 42
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30
Ser Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45
Glu Trp Val Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr
50 55 60
Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser
65 70 75
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser
95 100 105
Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
110 115 120
Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
125 130 135
Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
140 145 150
Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
155 160 165
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
170 175 180
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
185 190 195
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
200 205 210
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
215 220 225
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
230 235 240
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
245 250 255
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp

	260		265		270
Val Ser His Glu	Asp 275	Pro Glu Val Lys	Phe 280	Asn Trp Tyr Val	Asp 285
Gly Val Glu Val	His 290	Asn Ala Lys Thr	Lys 295	Pro Arg Glu Glu	Gln 300
Tyr Asn Ala Thr	Tyr 305	Arg Val Val Ser	Val 310	Leu Thr Val Leu	His 315
Gln Asp Trp Leu	Asn 320	Gly Lys Glu Tyr	Lys 325	Cys Lys Val Ser	Asn 330
Lys Ala Leu Pro	Ala 335	Pro Ile Ala Ala	Thr 340	Ile Ser Lys Ala	Lys 345
Gly Gln Pro Arg	Glu 350	Pro Gln Val Tyr	Thr 355	Leu Pro Pro Ser	Arg 360
Glu Glu Met Thr	Lys 365	Asn Gln Val Ser	Leu 370	Thr Cys Leu Val	Lys 375
Gly Phe Tyr Pro	Ser 380	Asp Ile Ala Val	Glu 385	Trp Glu Ser Asn	Gly 390
Gln Pro Glu Asn	Asn 395	Tyr Lys Thr Thr	Pro 400	Pro Val Leu Asp	Ser 405
Asp Gly Ser Phe	Phe 410	Leu Tyr Ser Lys	Leu 415	Thr Val Asp Lys	Ser 420
Arg Trp Gln Gln	Gly 425	Asn Val Phe Ser	Cys 430	Ser Val Met His	Glu 435
Ala Leu His Asn	His 440	Tyr Thr Gln Lys	Ser 445	Leu Ser Leu Ser	Pro 450

Gly

<210> 43
 <211> 451
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Последовательность синтезирована

<400> 43	
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly	1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr	20 25 30
Ser Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu	35 40 45
Glu Trp Val Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Ala Thr Ser Tyr	50 55 60
Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser	65 70 75
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp	80 85 90

Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Val	Val	Tyr	Tyr	Ser	Tyr	Arg	95	100	105
Tyr	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	110	115	120
Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	125	130	135
Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	140	145	150
Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	155	160	165
Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	170	175	180
Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	185	190	195
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	200	205	210
Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	215	220	225
Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	230	235	240
Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	245	250	255
Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	260	265	270
Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	275	280	285
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	290	295	300
Tyr	Asn	Ala	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	305	310	315
Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	320	325	330
Ala	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Ala	Ala	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	335	340	345
Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	350	355	360
Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	365	370	375
Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	380	385	390
Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	395	400	405
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	410	415	420
Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	425	430	435

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 440 445 450

Gly

Сопоставление последовательностей варибельного домена легкой цепи

		FR1		CDR1	
		10	20	30	40
2H7		QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTC	[RASSSVS-YMH]	WYQQKP	
		* * * *	* * *	*	
hu2H7.v16		DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC	[RASSSVS-YMH]	WYQQKP	
			* * * *		
hum KI		DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC	[RASQISNYLA]	WYQQKP	
		FR2	CDR2	FR3	
		50	60	70	80
2H7		GSSPKPWIY	[APSNLAS]	GVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEA	
		** *	*	***	****
hu2H7.v16		GKAPKPLIY	[APSNLAS]	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP	
		*	* * *		
hum KI		GKAPKLLIY	[AASSLES]	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP	
			CDR3	FR4	
		90	100		
2H7		EDAATYYC	[QQWSFNPPT]	FGAGTKLELKR	
		*		* * *	
hu2H7.v16		EDFATYYC	[QQWSFNPPT]	FGQGTKVEIKR	

hum KI		EDFATYYC	[QQYNSLPWT]	FGQGTKVEIKR	

Фиг. 1А

Сопоставление последовательностей переменного домена тяжелой цепи

2H7	QAYLQQSGAELVRPGASVKMSCKAS [GYTFTSYNMH] WVKQT	*** ** * * * * *
hu2H7.v16	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS [GYTFTSYNMH] WVRQA	* * * *
hum III	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS [GFTFSSYAMS] WVRQA	
2H7	PRQGLEWIG [AIYPGNGDTSYNQKFKG] KATLTVDKSSSTAYM	** * ** * *
hu2H7.v16	PGKGLEWVG [AIYPGNGDTSYNQKFKG] RFTISVDKSKNTLYL	* * * * *
hum III	PGKGLEWVA [VISGDGGSTYYADSVKG] RFTISRDNKNTLT	
2H7	QLSSLTSEDSAVYFCAR [VVYYSNSYWYFDV] WGTGTLTVTVSS	** * *
hu2H7.v16	QMNSLRAEDTAVYYCAR [VVYYSNSYWYFDV] WGQGTLLTVTVSS	***** * *
hum III	QMNSLRAEDTAVYYCAR [GRVGYSLY---DY] WGQGTLLTVTVSS	

Фиг. 1В

Легкая цепь гуманизированного 2H7.v16

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFSG
SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSFNPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS
GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYEKHK
VYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:13)

Фиг. 2

Тяжелая цепь гуманизированного 2H7.v16

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSYNQK
FKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSNSYWFYFDVWGQGTLLTVTVSSASTK
GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSFSVMHEALHNHY
TQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:14)

Фиг. 3

Тяжелая цепь гуманизированного 2H7.v31

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSYNQK
FKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSNSYWFYFDVWGQGTLLTVTVSSASTK
GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNATYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIAATISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSFSVMHEALHNHY
TQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:15)

Фиг. 4

Сопоставление легких цепей v16 и v138 (последовательная нумерация)

	10	20	30	40	50
hu2H7.v16. легкая	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAP *****				
hu2H7.v138. легкая	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYAP *****				
	10	20	30	40	50
	60	70	80	90	100
hu2H7.v16. легкая	SNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSFNPPTFGQG *****				
hu2H7.v138. легкая	SNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWAFNPPTFGQG *****				
	60	70	80	90	100
	110	120	130	140	150
hu2H7.v16. легкая	TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD *****				
hu2H7.v138. легкая	TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD *****				
	110	120	130	140	150
	160	170	180	190	200
hu2H7.v16. легкая	NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL *****				
hu2H7.v138. легкая	NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL *****				
	160	170	180	190	200
	210				
hu2H7.v16. легкая	SSPVTKSFNRGEC *****				
hu2H7.v138. легкая	SSPVTKSFNRGEC *****				
	210				

Фиг. 5

Сопоставление тяжелых цепей v16 и v138 (последовательная нумерация)

	10	20	30	40	50
hu2H7.v16.тяжелая	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGA *****				
hu2H7.v138.тяжелая	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGA 10 20 30 40 50				
	60	70	80	90	100
hu2H7.v16.тяжелая	IYPGNGDTSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVV *****				
hu2H7.v138.тяжелая	IYPGNGDTSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVV 60 70 80 90 100				
	110	120	130	140	150
hu2H7.v16.тяжелая	YYSNSYWFYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL *** *****				
hu2H7.v138.тяжелая	YYSASYWFYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL 110 120 130 140 150				
	160	170	180	190	200
hu2H7.v16.тяжелая	VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGT *****				
hu2H7.v138.тяжелая	VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGT 160 170 180 190 200				
	210	220	230	240	250
hu2H7.v16.тяжелая	QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP *****				
hu2H7.v138.тяжелая	QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP 210 220 230 240 250				
	260	270	280	290	300
hu2H7.v16.тяжелая	KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ *****				
hu2H7.v138.тяжелая	KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ 260 270 280 290 300				
	310	320	330	340	350
hu2H7.v16.тяжелая	YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE ** *****				
hu2H7.v138.тяжелая	YNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNAAALPAPIAATISKAKGQPRE 310 320 330 340 350				
	360	370	380	390	400
hu2H7.v16.тяжелая	PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP *****				
hu2H7.v138.тяжелая	PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP 360 370 380 390 400				
	410	420	430	440	450
hu2H7.v16.тяжелая	PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVHEALHNHYTQKSLSLSPGK *****				
hu2H7.v138.тяжелая	PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVHEALHNHYTQKSLSLSPGK 410 420 430 440 450				

Фиг. 6

Сопоставление легких цепей

	1	32
hu2H7.v16	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAP	

hu2H7.v511	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYAP	
	52	
hu2H7.v16	SNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSFNPPTFGQG	

hu2H7.v511	SNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWAFNPPTFGQG	
	102	
hu2H7.v16	TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD	

hu2H7.v511	TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD	
	152	
hu2H7.v16	NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL	

hu2H7.v511	NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL	
	202	214
hu2H7.v16	SSPVTKSFNRGEC	

hu2H7.v511	SSPVTKSFNRGEC	

Фиг. 7

Сопоставление тяжелых цепей

	1	
hu2H7.v16	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHW	

hu2H7.v511	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHW	
	37	52a
hu2H7.v16	VRQAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSL	82abc

hu2H7.v511	VRQAPGKGLEWVGAIYPGNGATSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSL	
	83	100abcde
hu2H7.v16	RAEDTAVYYCARVVYYSNSYWFYFDVWGQGTLVTVSS	113

hu2H7.v511	RAEDTAVYYCARVVYYSRYWFYFDVWGQGTLVTVSS	
	118	
hu2H7.v16	ASTKGPSVFPLAPS	

hu2H7.v511	ASTKGPSVFPLAPS	
	132	
hu2H7.v16	SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS	

hu2H7.v511	SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS	
	182	
hu2H7.v16	LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA	

hu2H7.v511	LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA	
	232	
hu2H7.v16	PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG	

hu2H7.v511	PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG	
	282	
hu2H7.v16	VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP	

hu2H7.v511	VEVHNAKTKPREEQYNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNALPAP	
	332	
hu2H7.v16	IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW	
	* *****	
hu2H7.v511	IAATISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW	
	382	
hu2H7.v16	ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHEA	

hu2H7.v511	ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHEA	
	432	447
hu2H7.v16	LHNHYTQKSLSLSPGK	

hu2H7.v511	LHNHYTQKSLSLSPGK	

Фиг. 8

Вариабельный домен легкой цепи гуманизированного 2H7.v114

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFSGSGSG
TDFTLTISSSLQPEDFATYYCQQWAFNPPTFGQGTKVEIKR

Фиг. 9А

Вариабельный домен тяжелой цепи гуманизированного 2H7.v114

FEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGATSYNQK
FKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYASASYWYFDVWGQGLTVTVSS

Фиг. 9В

Полноразмерная тяжелая цепь гуманизированного 2H7.v114

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNG
ATSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYASASYWYFDVWGQG
TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP
APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIAATISKAKGQPREPQVYTL
PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

Фиг. 9С