



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2006146927/14, 02.06.2005

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
02.06.2005

(30) Конвенционный приоритет:
04.06.2004 US 60/577,235
11.10.2004 US 60/617,997

(43) Дата публикации заявки: 10.08.2008

(45) Опубликовано: 20.08.2010 Бюл. № 23

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: WO/2001041813, 14.06.2001. RU 2232773 C2,
20.07.2004. SU 1697817 A1, 15.12.1991. WEIDE
R. et al. Successful long-term treatment of systemic
lupus erythematosus with rituximab maintenance
therapy. Lupus. 2003; 12(10): 779-82, реферат,
он-лайн [Найдено в Интернет
на www.pubmed.com 10.12.2008], PMID:
14596428 [PubMed - indexed for MEDLINE].
LEANDRO M. (см. прод.)

(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную
фазу: 09.01.2007

(86) Заявка РСТ:
US 2005/019550 (02.06.2005)

(87) Публикация РСТ:
WO 2005/120437 (22.12.2005)

Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры", пат.пов. Е.Е.Назиной, рег.№ 517

(72) Автор(ы):

БРУНЕТТА Пол Дж. (US)

(73) Патентообладатель(и):

ДЖЕНЕНТЕК, ИНК. (US)

(54) СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ ВОЛЧАНКИ

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к медицине, а
именно, к иммунологии и может быть
использована при лечении волчаночного
нефрита (ВН). Способ по изобретению включает
первое введение CD20-антитела субъекту в
количестве от 0,5 до 4 граммов, затем второе
введение антитела через 16-54 недели в

количестве от 0,5 до 4 граммов. При этом
каждое введение антитела производят субъекту в
виде разовой дозы или в виде двух или трех
отдельных доз антитела. Группа изобретений
также включает применение CD20-антитела для
производства лекарственного средства для
лечения ВН и изделие производства, содержащее
контейнер с CD20-антителом и листовку-

вкладыш с инструкциями по лечению волчаночного нефрита. Использование изобретений позволяет снизить интенсивность

проявления симптомов ВН за счет подавления активности В-клеток под действием CD20-антитела. 3 н. и 17 з.п. ф-лы, 2 табл., 6 ил.

(56) (продолжение):

et al. An open study of B lymphocyte depletion in systemic lupus erythematosus. Arthritis and rheumatism. 2002, vol.46, №10, p.2673-2677.

RU 2 3 9 6 9 8 0 C 2

RU 2 3 9 6 9 8 0 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: **2006146927/14, 02.06.2005**(24) Effective date for property rights:
02.06.2005(30) Priority:
04.06.2004 US 60/577,235
11.10.2004 US 60/617,997(43) Application published: **10.08.2008**(45) Date of publication: **20.08.2010 Bull. 23**(85) Commencement of national phase: **09.01.2007**(86) PCT application:
US 2005/019550 (02.06.2005)(87) PCT publication:
WO 2005/120437 (22.12.2005)Mail address:
129090, Moskva, ul. B.Spasskaja, 25, str.3, OOO
"Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery",
pat.pov. E.E.Nazinoj, reg.№ 517(72) Inventor(s):
BRUNETTA Pol Dzh. (US)(73) Proprietor(s):
DZhENENTEK, INK. (US)**(54) METHOD OF TREATING LUPOUS**(57) Abstract:
FIELD: medicine.

SUBSTANCE: group of inventions refers to medicine, namely to immunology and can be used in treating lupous nephritis (LN). A method according to the invention involves the first introduction of CD20-antibody to an individual in amount 0.5 to 4 g, then the second introduction of antibody 16-54 weeks later in amount 0.5 to 4 g. Thus every time antibody is introduced to an individual in the form of a single dose or in the form of two or three separate doses of

antibody. Besides the group of inventions includes application of CD20-antibody for preparing a drug for LN treatment and a product containing a CD20-antibody container and a leaflet with lupous nephritis treatment instructions.

EFFECT: use of the inventions allows lowering intensity of manifested symptoms of LN due to suppression of B-cell activity ensured by the effect of CD20-antibody.

20 cl, 2 tbl, 6 dwg, 3 ex

Текст описания приведен в факсимильном виде.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к способам лечения волчанки у субъекта с использованием специальных схем приема лекарственных средств и протоколов, и набора с инструкциями для данного применения.

Предшествующий уровень техники

Волчанка

Аутоиммунные заболевания, такие как системная красная волчанка (SLE), тяжелая миастения (MG) и идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура (ITP), среди прочих, остаются клинически важными заболеваниями человека. Как предполагает название, аутоиммунные заболевания причиняют ущерб своим разрушающим действием через собственную иммунную систему организма. Хотя механизмы патологии различаются между индивидуальными типами аутоиммунных заболеваний, один общий механизм вовлечен в связывание определенных антител (указанных в данном описании как аутореактивные антитела, или аутоантитела), присутствующих в сыворотке пациентов с аутоиммунными или клеточными антигенами.

Волчанка является аутоиммунным заболеванием, вовлекающим антитела, которые поражают соединительную ткань. По оценкам, заболевание поражает примерно 1 миллион американцев, в первую очередь женщин в возрасте между 20 и 40 годами. Основной формой волчанки является системная волчанка (системная красная волчанка; SLE). SLE ассоциируется с продукцией антииммунных

антител, циркулирующих иммунных комплексов и активацией системы
комплемента. SLE имеет частоту распространения примерно 1 на 700
5 женщин в возрасте между 20 и 60 годами. SLE может поражать любую
органную систему и может вызывать тяжелое поражение тканей.
Многочисленные аутоантитела различной специфичности представлены
10 в SLE. SLE-пациенты часто продуцируют аутоантитела, имеющие
анти-ДНК, анти-Ro и антитромбоцитарную специфичность, и это
способствует стимуляции клинических особенностей болезни, таких
15 как гломерулонефрит, артрит, серозит, полная сердечная блокада у
новорожденных и гематологические аномалии. Эти аутоантитела
также, возможно, связаны с расстройствами центральной нервной
системы. Arbuckle et al. описывают выработку аутоантител до
20 клинического начала SLE (Arbuckle et al., *N. Engl. J. Med.*
349(16): 1526-1533 (2003)).

Нелеченая волчанка может быть летальной по мере того, как
30 она прогрессирует от поражения кожи и суставов до внутренних
органов, включая легкие, сердце и почки (с почечной болезнью,
являющейся первичным проявлением). Волчанка главным образом
35 проявляется как серии внезапных обострений болезни с
прерывистыми периодами небольшой манифестации или отсутствия
40 болезни.

Поражение почек, измеряемое как уровень протеинурии в моче,
является одной из наиболее острых областей поражения,
45 ассоциированного с патогенностью SLE, и объясняет по меньшей
мере 50% смертность и распространенность болезни.

Присутствие антител, иммунореактивных в отношении
50 двунитевой нативной ДНК, применяют в качестве диагностического

маркера SLE.

В настоящее время отсутствуют действительно излечивающие
5 курсы лечения пациентов, у которых была диагностирована SLE. С
практической точки зрения врачи обычно применяют ряд сильных
иммуносупрессивных лекарственных средств, таких как
10 кортикостероиды в высокой дозе, например, преднизон или
азатиоприн, или циклофосфамид, которые назначают в периоды
внезапного обострения болезни, но могут также назначать
15 постоянно тем, кто испытывает частые внезапные обострения
болезни. Даже при эффективном лечении, которое ослабляет
симптомы и увеличивает продолжительность жизни, многие из этих
20 лекарств имеют потенциально неблагоприятные побочные эффекты у
больных. Кроме того, эти иммуносупрессивные лекарственные
25 средства препятствуют способности субъекта продуцировать все
антитела, кроме аутореактивных антител против ДНК.
30 Иммуносупрессанты также ослабляют защитные силы организма против
других потенциальных патогенов, тем самым делая пациента крайне
чувствительным к инфекции и другим потенциально летальным
35 болезням, таким как рак. В некоторых случаях побочные эффекты
распространенных лекарственных способов воздействия,
40 сочетающиеся с длительной манифестацией болезни на низком
уровне, могут вызвать тяжелое ухудшение и преждевременную
смерть. Последние терапевтические схемы включают циклофосфамид,
45 метотрексат, противомаларийные средства, гормональное лечение
(например, DHEA) и противогормональную терапию (например, анти-
50 пролактиновый агент бромкриптин).

Также описаны способы лечения SLE, включающие антитела.

Способ по Diamond et al. (Патент США № 4690905) состоит в
получении моноклональных антител против анти-ДНК-антител
5 (моноклональные антитела упоминаются в данном описании как анти-
идиотипические антитела) и затем применения этих анти-
идиотипических антител для удаления патогенных анти-ДНК-антител
10 из организма пациента. Однако удаление больших количеств крови
для лечения может быть опасным осложняющим процессом. Патент США
15 № 6726909 раскрывает лечение SLE, где композиция антитела,
вводимая пациенту, включает в себя очищенные анти-ДНК-анти-
идиотипические антитела, и введение требует инъекции или другого
20 эквивалентного способа введения.

Внутривенные вливания иммунного глобулина (IVIG) в высокой
25 дозе также используют для лечения определенных аутоиммунных
заболеваний. Вплоть до настоящего времени лечение SLE с помощью
IVIG давало смешанные результаты, включая как разрешение
30 волчаночного нефрита (Akashi et al., *J. Rheumatology* 17:375-379
(1990)), так и - в нескольких примерах - обострение протеинурии
и поражение почек (Jordan et al., *Clin. Immunol. Immunopathol.*
35 53:S164-169 (1989)).

CD20-антитела и лечение с их помощью

40 Лимфоциты являются одним из многих типов лейкоцитов,
продуцируемых в костном мозге в процессе гемопоэза. Существуют
две основные популяции лимфоцитов: В-лимфоциты (В-клетки) и Т-
45 лимфоциты (Т-клетки). Лимфоцитами, представляющими особый
интерес в данном описании, являются В-клетки.

50 В-клетки созревают в костном мозге и покидают костный мозг,
экспрессируя антиген-связывающее антитело на своей поверхности.

Когда наивные В-клетки впервые сталкиваются с антигеном, в отношении которого их мембраносвязывающее антитело является специфичным, клетки начинают быстро делиться, и их потомство дифференцируется в В-клетки памяти и эффекторные клетки, названные «плазматическими клетками». В-клетки памяти имеют более продолжительное время жизни и продолжают экспрессировать мембраносвязанное антитело с такой же специфичностью, что и исходная клетка. Плазматические клетки не продуцируют мембраносвязанное антитело, но вместо этого продуцируют антитело в форме, которая может быть секретирована. Секретированные антитела являются основными эффекторными молекулами гуморального иммунитета.

CD20-антиген (также называемый ограничивающим дифференцировку В-лимфоцитов антигеном человека, Вр35) является гидрофобным трансмембранным белком с молекулярной массой приблизительно 35 кД, 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)). Антиген также экспрессируется на более чем 90% В-клеточных неходжкинских лимфомах (NHL) (Anderson et al., *Blood* 63(6):1424-1433 (1984)), но не обнаружен 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 ранний этап(ы) активационных процессов стимуляции клеточного цикла и дифференцировки (Tedder et al., см. выше) и, возможно, функции в качестве канала ионов кальция (Tedder et al., *J. Cell. Biochem.* 14D:195 (1990)).

Что касается экспрессии CD20 в В-клеточных лимфомах, этот антиген может служить кандидатом для «нацеливания» на такие лимфомы. По существу, такое нацеливание может быть обобщено следующим образом: антитела, специфичные в отношении поверхностного антигена В-клеток CD20, вводят пациенту; эти анти-CD20-антитела (по-видимому) специфически связываются с CD20-антигеном как нормальных, так и злокачественных В-клеток; антитело, связывающееся с поверхностным антигеном CD20, может привести к разрушению и истощению неопластических В-клеток. Кроме того, химические агенты или радиоактивные метки, имеющие потенциал разрушения опухоли, могут быть конъюгированы с анти-CD20-антителом, так что агент специфически «доставляется» в неопластические В-клетки. Безотносительно к подходу, первичной целью является разрушение опухоли; специфический подход может быть обусловлен конкретным анти-CD20-антителом, которое применяют, и, таким образом, доступные подходы к нацеливанию CD20-антигена могут значительно варьировать.

Антитело ритуксимаб (RITUXAN®) является генноинженерным химерным мышинным/человеческим моноклональным антителом, направленным против CD-антигена. Ритуксимаб представляет собой антитело, названное «C2B8» в Патенте США № 5736137, выданном 7 апреля 1998 г. (Anderson et al.). Ритуксимаб показан для лечения пациентов с рецидивирующей или резистентной низкоккачественной или фолликулярной CD20-положительной В-клеточной неходжкинской лимфомой. In vitro исследования механизма действия демонстрируют, что ритуксимаб связывает комплемент человека и лизирует лимфоидные В-клеточные линии в результате комплемент-

зависимой цитотоксичности (CDC) (Reff et al., *Blood* 83(2):435-445 (1994)). Кроме того, он проявляет значительную активность в анализе антитело-зависимой клеточной цитотоксичности (ADCC). Совсем недавно показано, что ритуксимаб обладает антипролиферативными эффектами в анализе включения меченного по тритию тимидина и в прямой индукции апоптоза, в отличие от других анти-CD19- и анти-CD20-антител (Maloney et al., *Blood* 88(10):637a (1996)). Синергизм между ритуксимабом и химиотерапиями и токсинами также наблюдали экспериментально. В частности, ритуксимаб сенситизирует лекарственно-резистентные клеточные линии В-клеточной лимфомы человека к цитотоксическим эффектам доксорубицина, CDDP, VP-16, дифтерийного токсина и рицина (Demidem et al., *Cancer Chemotherapy & Radiopharmaceuticals* 12(3):177-186 (1997)). In vivo предклинические исследования показывают, что ритуксимаб истощает В-клетки периферической крови, лимфатических узлов и костного мозга яванских макаков, предположительно, через комплемент и клеточно-опосредованные процессы (Reff et al., *Blood* 83(2):435-445 (1994)).

Ритуксимаб был утвержден в Соединенных Штатах в ноябре 1997 для лечения пациентов с рецидивирующей или резистентной низкоккачественной или фолликулярной CD20⁺ В-клеточной NHL в дозе 375 мг/м², по четыре дозы еженедельно. В апреле 2001 г. FDA утвердило дополнительные требования к лечению низкоккачественной NHL: повторное лечение (еженедельно по четыре дозы) и дополнительная схема приема лекарственных средств (еженедельно по восемь доз). Более чем 300000 пациентов

подвергали действию ритуксимаба - либо в виде монотерапии, либо в сочетании с иммуносупрессантом или химиотерапевтическими лекарственными средствами. Пациентов также лечили ритуксимабом в качестве поддерживающей терапии в течение периода вплоть до 2 лет (Hainsworth et al., *J Clin Oncol* 21:1746-51 (2003); Hainsworth et al., *J Clin Oncol* 20:4261-7 (2002)).

Ритуксимаб также был исследован при различных незлокачественных аутоиммунных расстройствах, в которых В-клетки и аутоантитела, по-видимому, играют роль в патофизиологии заболевания. Edwards et al., *Biochem Soc. Trans.* 30:824-828 (2002). Сообщалось, что ритуксимаб потенциально ослабляет признаки и симптомы, например, 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); Emery et al., *Arthritis Rheum.*, 48(9): S439 (2003)), волчанки (Eisenberg, *Arthritis. Res. Ther.* 5/4:157-159 (2003); Leandro et al., *Arthritis Rheum.* 46: 2673-2677 (2002); Gorman et al., *Lupus*, 13: 312-316 (2004)), иммунной тромбоцитопенической пурпуры (D'Arena et al., *Leuk. Lymphoma* 44:561-562 (2003); Stasi et al., *Blood*, 98: 952-957 (2001); Saleh et al., *Semin. Oncol.*, 27 (Suppl. 12):99-103 (2000); Zaia et al., *Haematologica*, 87: 189-195 (2002); Ratanatharathorn et al., *Ann. Int. Med.*, 133: 275-279 (2000)), истинной эритроцитарной аплазии (Auner et al., *Br. J. Haematol.*, 116: 725-728 (2002)); аутоиммунной анемии (Zaja et al., *Haematologica* 87:189-195 (2002) (ошибка, выявленная в *Haematologica* 87:336 (2002)), болезни холодовой агглютинации

(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)),
 синдрома типа В тяжелой инсулиновой резистентности (Coll et al.,
N. Engl. J. Med., 350: 310-311 (2004), смешанной
 криоглобулинемии (DeVita et al., *Arthritis Rheum.* 46: Suppl.
 9:S206/S469 (2002)), тяжелой 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)), рефрактерной обыкновенной
 пузырчатки (Dupuy et al., *Arch. Dermatol.*, 140:91-96 (2004)),
 дерматомиозита (Levine, *Arthritis Rheum.*, 46(Suppl. 9):S1299
 (2002)), синдрома Шегрена (Somer et al., *Arthritis & Rheumatism*,
 49: 394-398 (2003)), активной типа II смешанной криоглобулинемии
 (Zaja et al., *Blood*, 101: 3827-3834 (2003)), обыкновенной
 пузырчатки (Dupay et al., *Arch. Dermatol.*, 140:91-95 (2004)),
 аутоиммунной невропатии (Pestronk et al., *J. Neurol. Neurosurg.*
Psychiatry 74:485-489 (2003)), паранеопластического опсоклонус-
 миоклонус-синдрома (Pranzatelli et al., *Neurology* 60(Suppl. 1)
 P05.128:A395 (2003)) и рецидивирующего-ремиттирующего
 рассеянного склероза (RRMS). Cross et al., (реферат)
 "Preliminary results from a phase II trial of rituximab in MS"
 Восьмая Ежегодная Конференция Американского Комитета по Изучению
 и Лечению Множественного Склероза, 20-21 (2003).

Фаза II исследования (WA16291) была проведена на пациентах
 с ревматоидным артритом (RA), обеспечив данные по последующему

48-недельному врачебному наблюдению за безопасностью и эффективностью ритуксимаба. Emery et al., *Arthritis Rheum.*, 48(9):S439 (2003); Szczepanski et al., *Arthritis Rheum.*, 48(9):S121 (2003). В общей сложности 161 пациента рандомизировали на четыре группы, отличающиеся схемой лечения: метотрексат, отдельно ритуксимаб, ритуксимаб плюс метотрексат и ритуксимаб плюс циклофосфамид (СТХ). Лечебная схема ритуксимаба составляла один грамм, вводимый внутривенно в дни 1 и 15. Инфузии ритуксимаба пациентам с РА хорошо переносились большинством пациентов, с 36% пациентов, испытавшими по меньшей мере один побочный эпизод во время своей первой инфузии (по сравнению с 30% пациентов, получавших плацебо). В целом большинство побочных эпизодов оценивалось по тяжести от слабых до умеренных и было хорошо сбалансировано во всех лечебных группах. В общем во всех четырех группах в течение 48 недель было 19 тяжелых побочных эпизодов, частота которых была несколько выше в группе ритуксимаб/СТХ. Частота инфекций была хорошо сбалансирована во всех группах. Средняя частота тяжелой инфекции в этой популяции пациентов с РА составила 4,66 на 100 пациентов-год, что ниже частоты инфекций, требующих госпитализации пациентов с РА (9,57 на 100 пациентов-год), по данным широкомасштабного эпидемиологического исследования. Doran et al., *Arthritis Rheum.* 46:2287-2293 (2002).

Представленный профиль безопасности ритуксимаба для небольшого числа пациентов с неврологическими нарушениями, включая аутоиммунную невропатию, (Pestronk et al., см. выше), опсоклонус-миоклонус-синдром (Pranzatelli et al., см. выше) и

RRMS (Cross et al., см выше), был сходен с таковым у онкологических больных или больных с RA. В происходящем в настоящее время испытании со спонсированием исследователя (IST) ритуксимаба в комбинации с интерфероном- γ (IFN- γ) или глатирамер-ацетатом на пациентах с RRMS (Cross et al., см. выше) 1 из 10 подвергнутых лечению пациентов был госпитализирован для ночного наблюдения, с умеренной лихорадкой и ознобом, последовавшими за первой инфузией ритуксимаба, тогда как остальные 9 пациентов закончили схему лечения из четырех инфузий без каких-либо отмеченных побочных эпизодов.

Патенты и патентные публикации, относящиеся к CD20-антителам и CD20-связывающим молекулам, включают Патент США № 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, US 2003/0026804 и WO 2000/09160 (Grillo-Lopez, A.); WO 2000/27428 (Grillo-Lopez & White); WO 2000/27433 и US 2004/0213784 (Grillo-Lopez & Leonard); WO 2000/44788 (Braslawsky et al.); WO 2001/10462 (Rastetter, W.); WO 2001/10461 (Rastetter & White); WO 2001/10460 (White и Grillo-Lopez); US 2001/0018041, US 2003/0180292, WO 2001/34194 (Hanna & Hariharan); US 2002/0006404 и WO 2002/04021 (Hanna & Hariharan); US 2002/0012665 и WO 2001/74338 (Hanna, N.); US 2002/0058029 (Hanna, N.); US 2003/0103971 (Hariharan & Hanna); US 2002/0009444 и WO 2001/80884 (Grillo-Lopez, A.); WO 2001/97858 (White, C.); US 2002/0128488 и WO 2002/34790 (Reff, M.); WO 2002/060955 (Braslawsky et al.); WO 2002/096948

(Braslawsky et al.); WO 2002/079255 (Reff & Davies); Патент США № 6171586 и WO 1998/56418 (Lam et al.); WO 1998/58964 (Raju, S.); WO 1999/22764 (Raju, S.); WO 1999/51642 и Патент США № 6194551, 6242195, 6528624 и 6538124 (Idusogie et al.); WO 2000/42072 (Presta, L.); WO 2000/67796 (Curd et al.); WO 2001/03734 (Grillo-Lopez et al.); US 2002/0004587 и WO 2001/77342 (Miller & Presta); US 2002/0197256 (Grewal, I.); US 2003/0157108 (Presta, L.); WO 04/056312 (Lowman et al.); US 2004/0202658 и WO 2004/091657 (Benyunes, K.); WO 2005/000351 (Chan, A.); US 2005/0032130A1 (Beresini et al.); US 2005/0053602A1 (Brunetta, P.); Патент США № 6565827, 6090365, 6287537, 6015542, 5843398 и 5595721, (Kaminski et al.); Патент США № 5500362, 5677180, 5721108, 6120767 и 6652852, (Robinson et al.); Патент США № 6410391 (Raubitschek et al.); Патент США № 6224866 и WO 00/20864 (Barbera-Guillem, E.); WO 2001/13945 (Barbera-Guillem, E.); WO 2000/67795 (Goldenberg); US 2003/0133930 и WO 2000/74718 (Goldenberg & Hansen); US 2003/0219433 и WO 2003/68821 (Hansen et al.); WO 2004/058298 (Goldenberg & Hansen); WO 2000/76542 (Golay et al.); WO 2001/72333 (Wolin & Rosenblatt); Патент США № 6368596 (Ghetie et al.); Патент США № 6306393 и US 2000/0041847 (Goldenberg, D.); US 2003/0026801 (Weiner и Hartman); WO 2002/102312 (Engleman, E.); US 2003/0068664 (Albitar et al.); WO 2003/002607 (Leung, S.); WO 2003/049694, US 2002/0009427 и US 2003/0185796 (Wolin et al.); WO 2003/061694 (Sing & Siegall); US 2003/0219818 (Bohen et al.); US 2003/0219433 & WO 2003/068821 (Hansen et al.); US 2003/0219818 (Bohen et al.); US 2002/0136719 (Shenoy et al.);

WO 2004/032828 (Wahl et al.); и WO 2002/56910 (Hayden-
Ledbetter). См. также Патент США № 5849898 и EP 330191 (Seed et
5 al.); EP 332/865A2 (Meyer и Weiss); Патент США № 4861579 (Meyer
et al.); US 2001/0056066 (Bugelski et al.); WO 1995/03770 (Bhat
et al.); US 2003/0219433 A1 (Hansen et al.); WO 2004/035607
10 (Teeling et al.); US 2004/0093621 (Shitara et al.); WO
2004/103404 (Watkins et al.); WO 2005/000901 (Tedder et al.); US
2005/0025764 (Watkins et al.); WO 2005/016969 и US 2005/0069545
15 A1 (Carr et al.); WO 2005/014618 (Chang et al.); US 2005/0079174
(Barbera-Guillem & Nelson); и US 2005/0106108 (Leung & Hansen).
20 Некоторые из них включают, среди прочего, лечение волчанки.

Публикации, относящиеся к лечению ритуксимабом, включают в
25 себя следующие: 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
30 in the treatment of chronic idiopathic thrombocytopenic purpura
(ITP)", *Blood*, 94: 49 (abstract) (1999); Matthews, R., "Medical
Heretics" *New Scientist* (7 April, 2001); Leandro et al.,
35 "Clinical outcome in 22 patients with rheumatoid arthritis
treated with B lymphocyte depletion" *Ann Rheum Dis*, см. выше;
40 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
45 study of B lymphocyte depletion in systemic lupus
erythematosus", *Arthritis and Rheumatism*, 46: 2673-2677 (2002),
50 где в течение 2-недельного периода каждый пациент получал две
500-мг инфузии ритуксимаба, две 750-мг инфузии циклофосфида и

высокую дозу оральных кортикостероидов, и где двое из
подвергнутых лечению пациентов перенесли рецидив через 7 и 8
5 месяцев, соответственно, и были повторно подвергнуты лечению,
хоть и по другим схемам; "Successful long-term treatment of
systemic lupus erythematosus with rituximab maintenance therapy"
10 Weide et al., *Lupus*, 12: 779-782 (2003), где пациента лечили
ритуксимабом ($375 \text{ мг/м}^2 \times 4$, повторяя через недельные интервалы),
и далее аппликации ритуксимаба проводили каждые 5-6 месяцев, и
15 затем давали поддерживающую терапию ритуксимабом 375 мг/м^2 каждые
три месяца, а второго пациента с резистентной SLE успешно лечили
20 ритуксимабом, с проведением поддерживающей терапии ритуксимабом
каждые три месяца; оба пациента хорошо отвечали на терапию
ритуксимабом; Edwards & Cambridge, "Sustained improvement in
25 rheumatoid arthritis following a protocol designed to deplete B
lymphocytes" *Reumatology* 40:205-211 (2001); Cambridge et al., "B
30 lymphocyte depletion in patients with rheumatoid arthritis:
serial studies of immunological parameters" *Arthritis Rheum.*, 46
(Suppl.9): S1350 (2002); Edwards et al., "B-lymphocyte depletion
35 therapy in rheumatoid arthritis and other autoimmune disorders"
Biochem Soc. Trans., выше; Edwards et al., "Efficacy and safety
40 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
45 et al., "Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in
patients with rheumatoid arthritis" *N. Engl. J. Med.* 350:2572-82
50 (2004); Pavelka et al., *Ann. Rheum. Dis.* 63: (S1):289-90 (2004);
Emery et al., *Arthritis Rheum.*, 50 (S9):S659 (2004); Levine &

Pestronk, "IgM antibody-related polyneuropathies: B-cell depletion chemotherapy using rituximab" *Neurology* 52: 1701-1704 (1999); 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." Представлен на Ежегодной Научной Конференции Американского Колледжа Ревматологии; октябрь 24-29; Новый Орлеан, Луизиана, 2002 г.; Tuscando, J. "Successful treatment of infliximab-refractory rheumatoid arthritis with rituximab." Представлен на Ежегодной Научной Конференции Американского Колледжа Ревматологии; октябрь 24-29; Новый Орлеан, Луизиана, 2002 г.; "Pathogenic roles of B cells in human autoimmunity; insights from the clinic" Martin & Chan, *Immunity* 20:517-527 (2004); Silverman & Weisman, "Rituximab Therapy and Autoimmune Disorders, Prospects for Anti-B Cell Therapy", *Arthritis and Rheumatism*, 48: 1484-1492 (2003); Kazkaz & Isenberg, "Anti B cell therapy (rituximab) in the treatment of autoimmune disease", *Current opinion in pharmacology*, 4: 398-402 (2004); Virgolini & 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 922-4 (2002) *Comment in Ann Rheum Dis*. 61: 863-866 (2002); "Future Strategies in Immunotherapy" Lake & Dionne, в *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery* (2003, John Wiley & Sons, Inc.) Online запись статьи: январь 15, 2003 г. (Chapter 2 "Antibody-Directed Immunotherapy"); Liang & Tedder, *Wiley Encyclopedia of Molecular Medicine*, Секция: CD20 как мишень иммунотерапии, online запись данных статьи: 15 января, 2002, озаглавленной "CD20"; Приложение 4А, озаглавленное "Monoclonal Antibodies to Human Cell Surface Antigens" Stockinger et al., ред: Coligan et al., в *Current Protocols in Immunology* (2003, John Wiley & Sons, Inc) Online запись данных: май 2003; данные печати публикации: февраль 2003; Penichet & Morrison, "CD Antibodies/molecules: Definition; Antibody Engineering" в *Wiley Encyclopedia of Molecular Medicine* Секция: Химерные, гуманизированные и человеческие антитела; online запись 15 января 2002 г.; Specks et al., "Response of Wegener's granulomatosis to anti-CD20 chimeric monoclonal antibody therapy" *Arthritis and Rheumatism*, 44:2836-2840 (2001); реферат online приписывание и приглашение Koehn et al., "Rituximab for Remission Induction in Severe ANCA-Associated Vasculitis: Report of a Prospective Open-Label Pilot Trial in 10 Patients", Американский Колледж Ревматологии, сессия номер: 28-100, название сессии: Васкулит, тип сессии: ACR совмещенная сессия, первая категория: 28 Васкулитов, Сессия 10/18/2004 (<http://www.abstractsonline.com/viewer/SearchResults.asp>);

Eriksson, "Short-term outcome and safety in 5 patients with ANCA-positive vasculitis treated with rituximab", *Kidney and Blood Pressure Research*, 26: 294 (2003); Jayne et al., "B-cell depletion with rituximab for refractory vasculitis" *Kidney and Blood Pressure Research*, 26: 294 (2003); Jayne, объявление 88 (11-й Международный симпозиум по васкулиту и ANCA), 2003, Американское Общество Нефрологии; Stone & Specks, "Rituximab Therapy for the Induction of Remission and Tolerance in ANCA-associated Vasculitis" в Резюме Исследования Клинических Испытаний 2002-2003 Сети Иммунологической Толерантности, <http://www.immunetolerance.org/research/autoimmune/trials/stone.html>. См. также Leonardo 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).

В отношении лечения волчанки анти-CD20-антителами см., например, "B lymphocyte depletion in the treatment of systemic lupus (SLE); Phase I/II trial of rituximab (Rituxan (R)) in SLE" Anolik et al., *Arthritis And Rheumatism*, 46/9; S289-S289 (September 2002); "A phase I trial of rituximab (anti-CD20) for treatment of systemic lupus erythematosus" Albert et al., *Arthritis And Rheumatism*, 48 (12): 3659-3659 (December 2003); "B cell depletion in autoimmune disease" Gorman et al., *Arthritis Research and Therapy*, 5/SUPPL. 4: S17-S21 (2003); "B-cell repopulation occurs mainly from naive B cells in patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus treated with rituximab" Leandro et al., *Arthritis And Rheumatism*, 48(9):

S464-S464 (September 2003); "Rituximab: expanding role in therapy for lymphomas and autoimmune disease" Rastetter et al., *Annual review of medicine* 55, p477-503 (2004); "B-cell biology" Weinstein et al., *Rheumatic Disease Clinics of North America* 30/1 (159-174) (2004); "Treatment of refractory autoimmune diseases with ablative immunotherapy" Cohen & Nagler, *Autoimmunity Reviews*, 3 (2), p21-9 (Feb 2004); "A Phase I trial of B-cell depletion with anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab) in the treatment of systemic lupus erythematosus" Eisenberg et al., *Arthritis Res Ther* 5/3, page: S9-S10 (2003); "Recent Advances in the Pathogenesis of Lupus Nephritis: Autoantibodies and B Cells" Su и Madaio, *Seminars in Nephrology*, 23/6: 564-568 (2003); "Management of refractory systemic rheumatic diseases" Houssiau *Acta Clinica Belgica*, 58/5: 314-317 (2003); "Novel therapies in pediatric rheumatic diseases" Chira & Sandborg *Current Opinion in Pediatrics* 15/6: 579-585 (2003); "B lymphocytes contribute to autoimmune disease pathogenesis: Current trends and clinical implications" Tuscano et al., *Autoimmunity Reviews* 2/2: 101-108 (2003); "The annual European Congress of Rheumatology: Recent advances in the treatment of rheumatic diseases" Hellmich & Gross, *Expert Opinion on Investigational Drug*, 12/10: 1713-1719 (2003); "Antibodies as therapeutic agents: Vive la renaissance!" Stockwin & Holmes, *Expert Opinion on Biological Therapy* 3/7: 1133-1152 (2003); "Successful treatment with anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab) of life-threatening refractory systemic lupus erythematosus with renal and central nervous system involvement"

Saito et al., *Lupus*, 12/10:798-800 (2003); "Rituximab therapy for multisystem autoimmune diseases in pediatric patients"

5 Binstadt et al., *Journal Of Pediatrics*, 143/5: 598-604 (November 2003); "Cytokines in systemic lupus erythematosus" Rahman *Arthritis Res Ther*, 5/4 (160-164) (2003); "Rituximab in lupus"

10 Eisenberg *Arthritis Res Ther*, 5/4 см. выше; "Antibody therapy for rheumatoid arthritis" Taylor *Current Opinion in Pharmacology* 3/3:323-328 (2003); "Molecular differences in anticytokine therapies" Calabrese, *Clinical and Experimental Rheumatology* 21/2: 241-248 (2003); "Lupus pregnancy" Lockshin & Sammaritano, *Autoimmunity*, 36/1: 33-40 (2003); "BAFF: B cell survival factor and emerging therapeutic target for autoimmune disorders" Kalled et al., *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 7/1: 115-123

25 (2003); Upcoming biologic agents for the treatment of rheumatic diseases" Shanahan et al., *Current Opinion In Rheumatology*, 15 (3): 226-236 (May 2003); "B cells as a therapeutic target in autoimmune disease" Goronzy & Weyand *Arthritis Reaserch & Therapy*, 5(3): 131-135 (2003); "Remission of refractory lupus nephritis with a protocol including rituximab" Fra et al., *Lupus*, 12 (10); 783-7 (2003); "B cell depletion therapy in

40 systemic lupus erythematosus" Anolik et al., *Current rheumatology reports*, 5, (5), p350-356 (Oct 2003); "A prospective, open label trial of B-cell depletion with rituximab in refractory systemic lupus erythematosus" Smith & Jayne, *Journal of the American Society of Nephrology*, Том: 14, Номер: Реферативный выпуск, Страница: 380А, Ноябрь 2003, Конференция: Еженедельное Заседание Американского Общества Нефрологии Почки,

Сан Диего, Калифорния, США, Ноябрь 12-17 2003; "An open study of B cell depletion in patients with proliferative lupus nephritis: Preliminary results" Boletis et al., *Journal of the American Society of Nephrology*, Том: 14, Номер: Реферативный выпуск, Страница: 379A (Ноябрь 2003); "The role of plasmapheresis in the treatment of severe central nervous system neuropsychiatric systemic lupus erythematosus" Neuwelt *Therapeutic apheresis and dialysis-official peer-reviewed journal of the International Society for Apheresis, the Japanese Society for Apheresis, the Japanese Society for Dialysis Therapy* 7 (2): 173-82 (April 2003); "Rituximab therapy and autoimmune disorders: prospects for anti-B cell therapy" Silverman & Weisman, *Arthritis and rheumatism*, 48 (6): 1484-92 (June 2003); "Treatment of refractory autoimmune diseases with ablative immunotherapy using monoclonal antibodies and/or high dose chemotherapy with hematopoietic stem cell support" Cohen et al., *Current Pharmaceutical Design* 9 (3): 279-88 (2003); "The relationship of FcγRIIIa genotype to degree of B cell depletion by rituximab in the treatment of systemic lupus erythematosus" Anolik et al., *Arthritis and rheumatism*, 48 (2): 455-459 (Feb 2003); Oelke *IDrugs* 5/1 30-31 (2002); "New therapies in systemic lupus erythematosus" Solsky & Wallace *Bailliere's Best Practice and Research in Clinical Rheumatology* 16/2: 293-312 (2002); Dumont *Current Opinion in Investigational Drugs*, 3/5: 725-734 (May 1, 2002); Workshop report on some new ideas about the treatment of systemic lupus erythematosus" Linnik et al., *Lupus* 11/12: 793-796 (2002); "Treatment of refractory autoimmune diseases with

lymphoablation and hematopoietic stem cell support" Cohen & Nagler *Israel Medical Association Journal* 4/11 SUPPL.: 865-867 (Nov 1, 2002); "Biological treatments for systemic lupus erythematosus" Isenberg & Leckie *Scandinavian Journal of Rheumatology*, 31/4: 187-191 (2002); "Novel therapeutic agents for systemic lupus erythematosus" Gescuk & Davis Jr *Current Opinion in Rheumatology*, 14/5 (515-521) (2002); "Management of lupus erythematosus: Recent insights" Wallace *Current Opinion in Rheumatology*, 14/3 (212-219) (2002); "B-lymphocyte depletion therapy in rheumatoid arthritis and other autoimmune disorders" Edwards et al., *Biochemical Society Transactions* 30/4: 824-828 (August 2002); "Effective B cell depletion with rituximab in the treatment of autoimmune diseases" Kneitz et al., *Immunobiology*, 206, (5), p519-27 (Dec 2002); "Anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab) for life-threatening autoimmune haemolytic anaemia in a patient with systemic lupus erythematosus" Perotta et al., *British Journal Of Haematology*, 116 (2): 465-7 (Feb 2002); "Monoclonal antibody therapy" Park & Smolen *Advances in Protein Chemistry*, 56: 369-421 (2001); "B lymphocyte depletion as a novel treatment for systemic lupus erythematosus (SLE): Phase I/II trial of rituximab (Rituxan (R)) in SLE" Anolik et al., *Arthritis And Rheumatism*, 44 (9); S387-S387 (September 2001); "Exacerbation of lupus while receiving rituximab for chronic refractory thrombocytopenia" Mehta et al., *Blood*, 98/11 Part 2:61b-62b (November 16 2001); Perotta et al., *Blood* 94:646, abstract 2869 (1999); "Hypocomplementemic urticarial vasculitis with angioedema, a rare presentation of systemic lupus

erythematosus: rapid response to rituximab" Saigal et al.,
Journal of the American Academy of Dermatology 49, (5 Suppl),
pS283-5 (Nov 2003); "Anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab,
RTX) therapy in hemodialysis (HD) patient (Pt) with severe
systemic lupus erythematosus (SLE)" Valentine et al., *Journal of*
American Society of Nephrology, Том: 13, Номер: Выпуск программа
и рефераты, страница: 683A, Сентябрь 2002, "Anti-CD20 monoclonal
antibody (rituximab) for refractory autoimmune thrombocytopenia
in a girl with systemic lupus erythematosus" ten Cate et al.,
Rheumatology, 43 (2): 244 (Feb 2004); "Successful long-term
treatment of systemic lupus erythematosus with rituximab
maintenance therapy" Weide et al., *Lupus*, 12 (10): 779-782
(2003); "Cytokine-receptor pairing: Accelerating discovery of
cytokine function" Foster et al., *Nature Reviews Drug Discovery*
3/2: 160-170 (2004); "Rituximab: expanding role in therapy for
lymphomas and autoimmune diseases" Rastetter et al., *Annual*
review of medicine 55: 477-503 (2004); "B cell therapy for
rheumatoid arthritis: The rituximab (anti-CD20) experience" Shaw
et al., *Annals of the Rheumatic Diseases*, 62/SUPPL. 2, pp. 55-59
(2003); "Severe hypercoagulable state and concomitant life
threatening bleeding successfully treated with rituximab" Ahn et
al., *Blood*, 102/11: 108b (November 16 2003); и "Graft-versus-
Kaposi's Sarcoma effect and reversal of Lupus Anticoagulant
Syndrome and Thalassemia Intermedia after non-myeloablative
allogeneic stem cell transplant" Patel et al., *Blood*, 98/11 Part
2: 370b (November 16 2001). См. также "Remission of
Proliferative Lupus Nephritis Following B Cell Depletion Therapy

is Preceded by Down-Regulation of the T Cell Costimulatory Molecule CD40 Ligand" Sfrikakis et al., *Arthrit. Rheumat.*, 52 (2): 501-513 (2005) и "B Cell Deletion in SLE", представленную D. Isenberg на 6-й Европейской Конференции по волчанке 4 марта 2005, включая слайд 38 по повторному лечению семи пациентов.

Субъекты, пораженные волчанкой, такой как SLE, которые проявляют клинические признаки волчаночного нефрита, и субъекты с волчаночным нефритом нуждаются в эффективном по стоимости и безопасности лечении, которое будет уменьшать интенсивность повреждения тканей, которое в конечном счете ведет к почечной недостаточности и требует хронического гемодиализа и/или почечной трансплантации, вызванной их состоянием.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение включает в себя, по меньшей мере частично, выбор дозы CD20-антитела, которая обеспечит безопасную и активную схему лечения субъектов с волчанкой, такой как SLE или волчаночный нефрит. Итак, изобретение заявлено следующим образом. В первом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения волчанки у субъекта, включающему в себя введение эффективного количества CD20-антитела субъекту для обеспечения начального антитела (около 0,5-4 граммов), затем второго введения антитела (около 0,5-4 граммов), причем второе введение производят не ранее чем примерно через 16-54 недели после начального введения, и каждое введение антитела обеспечивают субъекту в виде разовой дозы или в виде двух или трех отдельных доз антитела.

В одном варианте осуществления этого первого аспекта второе

лекарственное средство вводят с начальной экспозицией и/или с последующими экспозициями, где CD20-антитело является первым лекарственным средством. В предпочтительном варианте осуществления вторым лекарственным средством является химиотерапевтический агент, иммуносупрессивный агент, противомаларийное лекарственное средство, цитотоксический агент, антагонист интегрина, антагонист цитокина или гормон. В более предпочтительном варианте осуществления вторым лекарственным средством является иммуносупрессивный агент, противомаларийный агент или химиотерапевтический агент. В другом предпочтительном варианте осуществления иммуносупрессивный агент, противомаларийный агент или химиотерапевтический агент вводят с начальной экспозицией. В других вариантах их вводят со второй экспозицией и/или с последующими экспозициями и/или с начальной экспозицией, и предпочтительно со всеми экспозициями. В еще более предпочтительном варианте осуществления вводят кортикостероид, гидроксихлороквин, хлороквин, квинакрин, метотрексат, циклофосфамид, азатиоприн, микофенолат мофетил или 6-меркаптопурин. В другом аспекте иммуносупрессивный агент, противомаларийный агент или химиотерапевтический агент не вводят со второй экспозицией или вводят в более низком количестве, чем те, которые применяли с начальной экспозицией. В этом способе предпочтительно субъект не был предварительно подвергнут лечению CD20-антителом.

В другом варианте осуществления никакой другое лекарственное средство, кроме CD20-антитела, не вводят субъекту для лечения волчанки.

В другом предпочтительном варианте осуществления субъект имеет повышенный уровень инфильтрирующих CD20 клеток, анти-
5 нуклеарных антител (ANA), анти-двунитевых ДНК (днДНК) антител, анти-Sm-антител, анти-нуклеарных рибонуклеопротеиновых антител, анти-фосфолипидных антител, анти-рибосомных Р-антител, анти-
10 Ro/SS-A-антител, анти-Ro-антител или анти-La-антител, или комбинацию двух или нескольких таких клеток или антител.

15 Кроме того, изобретение предоставляет собой изделие производства, включающее в себя

а) контейнер, содержащий CD20-антитело; и

20 б) пакет со вложенными инструкциями по лечению волчанки у субъекта, где в инструкциях указывается, что количество антитела, введенного субъекту, которое является эффективным для
25 обеспечения начальной экспозиции антитела около 0,5-4 граммов, за которой следует вторая экспозиция антитела около 0,5-4 граммов, где вторая экспозиция не производится ранее чем
30 примерно через 16-54 недели после начальной экспозиции, и каждая экспозиция антитела обеспечивается субъекту в виде разовой дозы
35 или двух или трех отдельных доз антитела.

Изобретение в данном описании включает дозированное количество и схему лечения, которая снижает или минимизирует
40 необходимость лечения волчанки у субъекта более часто, чем необходимо CD20-антителом. Изобретение в данном описании также предпочтительно снижает, минимизирует или элиминирует
45 необходимость ко-, пре- или пост-введения иммуносупрессивного агента, противомаларийного агента или химиотерапевтического
50 агента, что является обычным стандартным лечением таких

субъектов, во избежание, насколько это возможно, побочных
 эффектов такого стандартного лечения, а также снижения стоимости
 и повышения удобства для больного, такого как временное
 удобство. Однако изобретение также рассматривает применение
 такого сопутствующего лечения.

Краткое описание чертежей

ФИГ. 1А представляет собой последовательность, выровненную
 по сравнению с аминокислотными последовательностями
 переменного домена (V_L) легкой цепи каждой мыши 2H7 (SEQ ID
 NO:1), гуманизированного 2H7.v16 варианта (SEQ ID NO:2) и
 подгруппы I легкой каппа-цепи 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).

ФИГ. 1В представляет собой последовательность, выровненную
 по сравнению с аминокислотными последовательностями
 переменного домена (V_H) тяжелой цепи каждой мыши 2H7 (SEQ ID
 NO:7), гуманизированного 2H7.v16 варианта (SEQ ID NO:8) и
 человеческой консенсусной последовательности подгруппы III
 тяжелой цепи человека (SEQ ID NO:9). CDR V_H 2H7 и hu2H7.v16
 являются следующими: CDR1 (SEQ ID NO:10), CDR2 (SEQ ID NO:11) и
 CDR3 (SEQ ID NO:12).

Как показано на ФИГ. 1А и ФИГ. 1В, CDR1, CDR2 и CDR3 в
 каждой цепи заключены в квадратные скобки, фланкированные
 каркасными областями FR1-FR4. 2H7 относится к мышиному 2H7-
 антителу. Звездочки между двумя рядами последовательностей
 указывают на положения, которые различаются между двумя
 последовательностями. Остатки пронумерованы по Kabat et al.,

Sequences of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991), со вставками, показанными как a, b, c, d и e.

На ФИГ. 2 показана аминокислотная последовательность зрелой L-цепи 2H7.v16 (SEQ ID NO:13).

На ФИГ. 3 показана аминокислотная последовательность зрелой H-цепи 2H7.v16 (SEQ ID NO:14).

На ФИГ. 4 показана аминокислотная последовательность зрелой H-цепи 2H7.v31 (SEQ ID NO:15). L-цепь 2H7.v31 является такой же, как 2H7.v16.

На ФИГ. 5 показано выравнивание зрелых легких цепей 2H7.v16 и 2H7.v511 (SEQ ID NO:13 и 16, соответственно) с пронумерованными остатками Kabat переменного домена и пронумерованными остатками Eu константного домена.

На ФИГ. 6 показано выравнивание зрелых тяжелых цепей 2H7.v16 и 2H7.v511 (SEQ ID NO:14 и 17, соответственно) с пронумерованными остатками Kabat переменного домена и пронумерованными остатками Eu константного домена.

Подробное описание предпочтительных вариантов осуществления

I. Определения

Под «волчанкой» в данном описании подразумевается аутоиммунное заболевание или расстройство, с вовлечением антител, которые поражают соединительную ткань. Основной формой волчанки является системная волчанка, системная красная волчанка (SLE), включая кожную SLE и подострую кожную SLE, а также другие типы волчанки (включая нефритную, экстраренальную, энцефалитную, педиатрическую, неренальную, дискоидную и алопецию).

«В-клетка» представляет собой лимфоцит, который созревает в костном мозге и включает в себя наивные В-клетки, В-клетки памяти или эффекторные В-клетки (плазматические клетки). В-клетки в данном описании могут быть нормальными или незлокачественными В-клетками.

«Маркер В-клеточной поверхности», или «антиген В-клеточной поверхности» в данном описании представляет собой антиген, экспрессирующийся на поверхности В-клетки, на который может быть нацелен антагонист, который с ним связывается. Примеры маркеров В-клеточной поверхности включают в себя маркеры поверхности 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 (подробнее см. The Leucocyte Antigen Facts Book, 2nd Edition. 1997, ed. Barclay et al. Academic Press, Harcourt Brace & Co., New York). Другие маркеры В-клеточной поверхности включают в себя RP105, FcRH2, В-клеточный CR2, CCR6, P2X5, HLA-DOB, CXCR5, FCER2, BR3, Btig, NAG14, SLGC16270, FcRH1, IRTA2, ATWD578, FcRH3, IRTA1, FcRH6, BCMA и 239287. Особенно интересный маркер В-клеточной поверхности предпочтительно экспрессируется на В-клетках по сравнению с другими не В-клеточными тканями млекопитающего и может быть экспрессирован или на предшественнике В-клеток, или на зрелых В-клетках. Предпочтительными маркерами В-клеточной поверхности в данном описании являются CD20 и CD22.

«CD20»-антиген, или «CD20» представляет собой около 35 кД негликозилированный фосфопротеин, обнаруженный на поверхности более чем 90% В-клеток периферической крови или лимфоидных

органов. CD представлен также на нормальных В-клетках и на злокачественных В-клетках, но не экспрессируется на стволовых клетках. Другие наименования CD20 в литературе включают «антиген, ограничивающий В-лимфоциты», и «Bp35». Например, CD20-антиген описан Clark et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 82:1766 (1985).

«CD22»-антиген, или «CD22», также известный как BL-CAM или Lyb8, представляет собой тип 1 интегрального мембранного гликопротеина с молекулярной массой примерно от 130 (укороченный) до 140 кД (неукороченный). Он экспрессируется и в цитоплазме и В-клеточной мембране В-лимфоцитов. CD22-антиген появляется на ранних этапах дифференцировки В-клеточных лимфоцитов, примерно на тех же стадиях, что и CD19-антиген. В отличие от других В-клеточных маркеров, мембранная экспрессия CD22 ограничена поздними стадиями дифференцировки, включая стадии между зрелыми В-клетками (CD22+) и плазматическими клетками (CD22-). CD22-антиген описан, например, у Wilson et al., *J. Exp. Med.* 173:137 (1991) и Wilson et al., *J. Immunol.* 150:5013 (1993).

«Антительный антагонист» в данном описании представляет собой антитело, которое при связывании с маркером В-клеточной поверхности на В-клетках разрушает или истощает В-клетки млекопитающего и/или препятствует одной или нескольким В-клеточным функциям, например, путем снижения или предотвращения гуморального ответа, обеспечиваемого В-клетками. Антитело-антагонист предпочтительно способно истощать В-клетки (то есть снижать уровни циркуляции В-клеток) у обработанного им

млекопитающего. Такое истощение может быть достигнуто посредством различных механизмов, таких как антитело-зависимая клеточно-опосредованная (ADCC) и/или комплемент-зависимая цитотоксичность (CDC), ингибирование В-клеточной пролиферации и/или индукция гибели В-клеток (например, посредством апоптоза).

Термин «антитело» в данном описании используется в широком смысле и специфически относится к моноклональным антителам, поликлональным антителам, мультиспецифическим антителам (например, биспецифическим антителам), образованным по меньшей мере из двух интактных антител, и антительным фрагментам, поскольку они проявляют желаемую биологическую активность.

«Антительные фрагменты» включают в себя часть интактного антитела, предпочтительно включая его антиген-связывающую область. Примеры антительных фрагментов включают в себя Fab-, Fab'-, F(ab')₂- и Fv-фрагменты; диантитела; линейные антитела; одноцепочечные молекулы антител и мультиспецифические антитела, образованные из антительных фрагментов.

В данном описании «интактное антитело» представляет собой антитело, включающее в себя тяжелый и легкий переменные домены, а также Fc-область.

«Антитело, которое связывается с маркером В-клеточной поверхности», представляет собой молекулу, которая при связывании с маркером В-клеточной поверхности разрушает или истощает В-клетки млекопитающего и/или препятствует одной или нескольким В-клеточным функциям, например, путем снижения или предотвращения гуморального ответа, обеспечиваемого В-клетками. Антитело предпочтительно способно истощать В-клетки (то есть

снижать уровни циркуляции В-клеток) у обработанного им
млекопитающего. Такое истощение может быть достигнуто
5 посредством различных механизмов, таких как ADCC и/или CDC,
ингибированием В-клеточной пролиферации и/или индукцией гибели
В-клеток (например, посредством апоптоза). Предпочтительно
10 маркером В-клеточной поверхности является CD20, так что
антитело, которое связывается с маркером В-клеточной
поверхности, является антителом, которое связывается с CD20 или
15 «CD20-антителом».

Примеры CD20-антител включают в себя «C2B8», который в
20 настоящее время называется «ритуксимабом» («RITUXAN®») (Патент
США № 5736137); меченное иттрием-[90] мышинное антитело 2B8,
обозначаемое «Y2B8» или «Ибритумомаб Туксетан» (ZEVALIN®),
25 коммерчески доступное от IDEC Pharmaceuticals, Inc. (Патент США
№ 5736137; 2B8, депонированный в ATCC под инвентарным № HB11388
30 22 июня 1993 г.); мышинный IgG2a «B1», также называемый
«Тоситумомаб», необязательно меченный ¹³¹I для генерации «¹³¹I-
B1» или «иод I131 тоситумомаб» антитело (BEXXAR™), коммерчески
35 доступное от Corixa (см. также Патент США № 5595721); мышинное
моноклональное антитело «1F5» (Press et al., Blood 69(2):584-591
40 (1987) и варианты его, включающие «каркасно-пéтчевые» или
гуманизированные 1F5 (WO 2003/002607, Leung, S.; ATCC
депонирование HB-96450); мышинное 2H7 и химерное 2H7-антитело
45 (Патент США № 5677180); гуманизированное антитело 2H7; HUMAX-
CD20™ антитела (Genmab, Дания); человеческие моноклональные
антитела, разработанные в WO 2004/035607 (Teeling et al.); AME-
50 133™ антитела (Прикладная Молекулярная Эволюция); A20-антитело

или его варианты, такие как химерное или гуманизированное A20-
антитело (сA20, hA20, соответственно) (US 2003/0219433,
5 Immunomedics); и моноклональные антитела L27, G28-2, 93-1B3, B-
C1 или NU-2B, доступные от Международной Рабочей Группы по
Типированию Лейкоцитов (Valentine et al., В: *Leukocyte Typing*
10 III (McMichael, Ed., p. 440, Oxford University Press (1987))).

Термин «ритуксимаб» или «RITUXAN®» в данном описании
15 относится к генноинженерному химерному мышиному/человеческому
моноклональному антителу, направленному против CD20-антигена и
обозначенному «CD28» в Патенте США № 5736137, включая фрагменты
20 этого антитела, которые сохраняют способность связывать CD20.

Только для целей данного описания и если не указано иное,
25 «гуманизированное антитело 2H7» упоминается как гуманизированное
CD20-антитело или его антиген-связывающий фрагмент, где антитело
эффективно истощает В-клетки примата *in vivo*, антитело
30 включается в переменную область (V_H) Н-цепи по меньшей мере CDR
H3 последовательности SEQ ID NO:12 (Фиг.1B) из анти-
человеческого CD20-антитела и, в основном, человеческих
35 консенсусных каркасных (FR) остатков подгруппы III тяжелой цепи
человека (V_{HIII}). В предпочтительном варианте осуществления это
40 антитело дополнительно включает в себя Н-цепь CDR H1
последовательности SEQ ID NO:10 и CDR H2 последовательности SEQ
ID NO:11, и, более предпочтительно, дополнительно включает в
45 себя L-цепь CDR L1 последовательности SEQ ID NO:4, CDR L2
последовательности SEQ ID NO:5, CDR L3 последовательности SEQ ID
50 NO:6 и, в основном, человеческие консенсусные каркасные (FR)
остатки подгруппы I (VI) легкой цепи человека, где V_H -область

может быть соединена с человеческой константной областью цепи IgG, где область может быть, например, IgG1 или IgG3. В предпочтительном варианте осуществления такое антитело включает в себя V_H-последовательность SEQ ID NO:8 (v16, как показано на Фиг. 1B), необязательно также включая V_L-последовательность SEQ ID NO:2 (V16, как показано на Фиг. 1A), которая может иметь аминокислотные замены D56A и N100A в H-цепи и S92A в L-цепи (v96). Предпочтительно антитело представляет собой интактное антитело, содержащее аминокислотные последовательности легкой и тяжелой цепи SEQ ID NO:13 и 14, соответственно, как показано на Фиг. 2 и 3. Другим предпочтительным вариантом осуществления является вариант, где антитело представляет собой 2H7.v31, включающее в себя аминокислотные последовательности легкой и тяжелой цепи SEQ ID NO:13 и 15, соответственно, как показано на Фиг. 2 и 4. Антитело в данном описании может дополнительно включать в себя по меньшей мере одну аминокислотную замену в Fc-области, что улучшает активность ADCC и/или CDC, как, например, антитело, где аминокислотными заменами являются S298A/E333A/K334A, более предпочтительно, 2H7.v31, имеющее аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:15 (как показано на Фиг. 4). Любое из этих антител может дополнительно включать в себя по меньшей мере одну аминокислотную замену в Fc-области, которая снижает CDC активность, например, включая по меньшей мере замену K322A. См. Патент США № 6528624B1 (Idusogie et al.).

Предпочтительным гуманизированным 2H7 является интактное антитело или антительный фрагмент, включающий переменную

последовательность легкой цепи:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTTCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFSGSGSGTDF
TLTISSLQPEDFATYYCQQWSFNPTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:2);

и последовательность вариабельной тяжелой цепи:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSYNQKFKGR
FTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYNSYWFVDVWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO:8).

Где гуманизированное антитело 2H7 является интактным антителом, предпочтительно оно включает в себя аминокислотную последовательность легкой цепи:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTTCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFSGSGSGTDF
TLTISSLQPEDFATYYCQQWSFNPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR
EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN
RGEC (SEQ ID NO:13);

и аминокислотную последовательность тяжелой цепи:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSYNQKFKGR
FTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYNSYWFVDVWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAP
SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYIC
NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:14)

или аминокислотную последовательность тяжелой цепи:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSYNQKFKGR
FTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYNSYWFVDVWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAP
SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYIC
NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIAATI
SKAKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:15).

В предпочтительном варианте осуществления согласно изобретению V область вариантов, основанная на версии 16 2H7, будет иметь аминокислотные последовательности v16, за исключением положений аминокислотных замен, которые указаны в

таблице ниже. Если не указано иное, варианты 2H7 будут иметь такую же L-цепь как и v16.

2H7 версия	Изменения тяжелой цепи (V _H)	Изменения легкой цепи (V _L)	Изменения Fc
31	-	-	S298A, E333A, K334A
96	D56A, N100A	S92A	
114	D56A, N10	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A
115	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, E356D, M358L

«Антитело-зависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность» и «ADCC» относятся к клеточно-опосредованной реакции, в которой неспецифические цитотоксические клетки, которые экспрессируют Fc-рецепторы (FcR) (например, Естественные Киллерные (NK) клетки, нейтрофилы и макрофаги), опознают связанное антитело на клетке-мишени и впоследствии вызывают лизис клетки-мишени. Первичные клетки, опосредующие ADCC, NK клетки экспрессируют только FcγRIII, тогда как моноциты экспрессируют FcγRI, FcγRII и FcγRIII. Экспрессия FcR на гемопоэтических клетках суммирована в таблице 3 на стр. 464 Ravetch & Kinet *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991). Для оценки ADCC активности желаемой молекулы может быть проведен in vitro ADCC анализ, такой как анализ, описанный в Патенте США № 5500362 или 5821337. Приемлемые эффекторные клетки для такого анализа включают в себя мононуклеарные клетки периферической крови (PMBC) и Естественные Киллерные (NK) клетки. В качестве альтернативы или дополнительно активность ADCC в желаемой молекуле может быть оценена in vivo, например, на животной модели, так, как раскрыто у Clynes *et al.*, *PNAS (USA)* 95:652-656 (1998).

«Человеческие эффекторные клетки» представляют собой

лейкоциты, которые экспрессируют один или несколько FcR и выполняют эффекторные функции. Предпочтительно клетки экспрессируют по меньшей мере FcγRIII и выполняют эффекторную функцию ADCC. Примеры человеческих лейкоцитов, которые опосредуют ADCC, включают в себя мононуклеарные клетки периферической крови (PMBC), естественные киллерные (NK) клетки, моноциты, цитотоксические Т-клетки и нейтрофилы, предпочтительно PMBC и NK клетки.

Термины «Fc-рецептор» и «FcR» применяют для описания рецептора, который связывается с Fc-областью антитела. Предпочтительным FcR является FcR с нативной последовательностью человека. Кроме того, предпочтительным FcR является тот, который связывает IgG-антитело (гамма-рецептор) и включает в себя рецепторы подклассов FcγRI, FcγRII и FcγRIII, включая аллельные варианты и формы альтернативного сплайсинга этих рецепторов. Рецепторы FcγRII включают FcγRIIA («активирующий рецептор») и FcγRIIB («ингибирующий рецептор»), которые имеют подобные аминокислотные последовательности, которые различаются главным образом по своим цитоплазматическим доменам. Активирующий рецептор FcγRIIA в своем цитоплазматическом домене содержит активирующий мотив (ITAM) на основе иммунорецептора тирозина. Ингибирующий рецептор FcγRIIB содержит в своем цитоплазматическом домене ингибирующий мотив (ITIM) на основе иммунорецептора тирозина (см. Daeron *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). FcR рассмотрены у Ravetch & Kinet *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991); Capel et al., *Immunomethods* 4:25-34 (1994); и de Haas et

al., *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995). Другие FcR, включая те, которые должны быть идентифицированы в будущем, охвачены в данном описании термином «FcR». Этот термин также включает в себя неонатальный рецептор FcRn, который отвечает за перенос материнского IgG в плод (Guyer et al., *J. Immunol.* 117:587 (1976) и Kim et al., *J. Immunol.* 24:249 (1994).

«Комплемент-зависимая цитотоксичность», или CDC относится к способности молекулы лизировать мишень в присутствии комплемента. Путь активации комплемента инициируется путем связывания первого компонента системы комплемента (C1q) с молекулой (например, антителом), связанной с родственным антигеном. Для оценки активации комплемента может быть выполнен способ CDC, например, как описано у Gazanno-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996).

«Рост-ингибирующие» антитела представляют собой антитела, которые предотвращают или снижают пролиферацию клетки, экспрессирующей антиген, с которым антитело связывается. Например, антитело может предотвращать или снижать пролиферацию В-клеток *in vitro* и/или *in vivo*.

Антитела, которые «индуцируют апоптоз», представляют собой антитела, которые индуцируют запрограммированную гибель клеток, например, В-клеток, что определяется стандартным анализом апоптоза, как, например, связывание аннексина V, фрагментация ДНК, сморщивание клеток, расширение эндоплазматического ретикулума, фрагментация клеток и/или образование мембранных везикул (названных апоптотическими тельцами).

«Нативные антитела» представляют собой обычно

гетеротетрамерные гликопротеины примерно в 150000 дальтон, состоящие из двух идентичных легких (L) цепей и двух идентичных тяжелых (H) цепей. Каждая легкая цепь связана с тяжелой цепью одной ковалентной дисульфидной связью, тогда как число дисульфидных связей варьирует среди тяжелых цепей различных иммуноглобулиновых изотипов. Каждая тяжелая и легкая цепь также имеет регулярно пространственно расположенные внутрицепочечные дисульфидные мостики. Каждая тяжелая цепь имеет один конец переменного домена (V_H), за которым следует ряд константных доменов. Каждая легкая цепь имеет переменный домен на одном конце (V_L) и константный домен на своем другом конце; константный домен легкой цепи выровнен с первым константным доменом тяжелой цепи, и переменный домен легкой цепи выровнен с переменным доменом тяжелой цепи. Полагают, что отдельные аминокислотные остатки образуют поверхность раздела между переменными доменами легкой цепи и тяжелой цепи.

Термин «переменный» относится к тому факту, что определенные части переменных доменов различаются экстенсивно по последовательности среди антител и применяются для определения связывания и специфичности каждого конкретного антитела со своим конкретным антигеном. Однако переменность распределяется по всем переменным доменам антител не равномерно. Она концентрируется в трех сегментах, называемых гиперпеременными областями, в переменных доменах легкой цепи и тяжелой цепи. Более высококонсервативные части переменных доменов называются каркасными областями (FR). Каждый из переменных доменов нативных тяжелой и легкой цепей включает в

себя четыре FR, в значительной степени принимающих конфигурацию β -листка, связанную с тремя гипервариабельными областями, которые образуют петлевые соединения, и в некоторых случаях формируют часть β -листковой структуры. Гипервариабельные области в каждой цепи удерживаются вместе в тесной близости с FR и с гипервариабельными областями из других цепей, способствуя образованию антиген-связывающего 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 вовлекаются непосредственно в связывание антитела с антигеном, но проявляют различные эффекторные функции, такие как участие антитела в ADCC.

Папаиновое переваривание антител продуцирует два идентичных антиген-связывающих фрагмента, названных «Fab»-фрагментами, каждый с отдельным антиген-связывающим сайтом, и остаточный «Fc»-фрагмент, название которого отражает его способность легко кристаллизоваться. Обработка пепсином приводит к получению $F(ab')_2$ -фрагмента, который имеет два антиген-связывающих сайта и сохраняет способность перекрестно-связывать антиген.

«Fv» представляет собой минимальный антительный фрагмент, который содержит полный антиген-распознающий и антиген-связывающий сайт. Эта область состоит из димера переменного домена одной тяжелой цепи и одной легкой цепи в прочной нековалентной ассоциации. Он существует в такой конфигурации, в которой три гипервариабельных области каждого переменного домена взаимодействуют, определяя антиген-связывающий сайт на поверхности димера V_H-V_L . В совокупности шесть гипервариабельных

областей определяют антиген-связывающую специфичность антитела. Однако даже отдельный вариабельный домен (или половина Fv, включающая в себя только три гипервариабельных области, специфичных в отношении антигена) обладают способностью распознавать и связывать антиген, хотя и с более низкой аффинностью, чем целый связывающий сайт.

Fab-фрагмент также содержит константный домен легкой цепи и первый константный домен (CH1) тяжелой цепи. Fab'-фрагменты отличаются от Fab-фрагментов добавлением нескольких остатков на карбоксильном конце домена CH1 тяжелой цепи, включая один или несколько цистеинов из области антительного шарнира. Fab'-SH является обозначением в данном описании для Fab', в котором цистеиновый остаток(и) константных доменов несет по меньшей мере одну свободную тиоловую группу. F(ab')₂-антительные фрагменты сначала были продуцированы как пары Fab'-фрагментов, которые имеют между собой шарнирные цистеины. Также известны другие химические взаимодействия антительных фрагментов.

«Легкие цепи» антител (иммуноглобулины) любых видов позвоночных могут быть приписаны к одному из двух четко различающихся типов, названных каппа (κ) и лямбда (λ), на основе аминокислотных последовательностей своих константных доменов.

В зависимости от аминокислотной последовательности константного домена своих тяжелых цепей, антитела могут быть приписаны к различным классам. Существует пять основных классов интактных антител: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них могут быть далее разделены на подклассы (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA и IgA2. Константные домены тяжелой

цепи, которые соответствуют различным классам антител, называются α , δ , ϵ , γ и μ , соответственно. Хорошо известны субъединичные структуры и трехмерные конфигурации различных классов иммуноглобулинов.

«Одноцепочечные Fv» или «scFv»-антительные фрагменты включают V_H - и V_L -домены антитела, где эти домены представлены в отдельной полипептидной цепи. Предпочтительно Fv-полипептид далее включает в себя полипептидный линкер между V_H - и V_L -доменами, который дает возможность scFv формировать желаемую структуру антигенного связывания. Для рассмотрения scFv см. Pluckthun в *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg & Moore eds., Springer-Verlag, New-York, pp. 269-315 (1994).

Термин «диантитела» относится к маленьким антительным фрагментам с двумя антиген-связывающими сайтами, в которых фрагменты включают в себя переменный домен (V_H) тяжелой цепи, соединенный с переменным доменом (V_L) легкой цепи в одной и той же полипептидной цепи (V_H - V_L). С помощью линкера, который является слишком коротким, чтобы допустить спаривание между двумя доменами на одной и той же цепи, домены вынуждены спариваться с комплементарными доменами другой цепи и создавать два антиген-связывающих сайта. Диантитела описаны более полно, например, в EP 404097; WO 1993/11161; и у Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993).

Термин «моноклональное антитело» в данном описании относится к антителу, полученному из популяции по существу гомогенных антител, то есть индивидуальные антитела, образующие

эту популяцию, являются идентичными и/или связывают одинаковый
эпитоп, за исключением возможных вариантов, которые могут
5 возникнуть в процессе продуцирования моноклонального антитела,
такие варианты обычно представлены в незначительном количестве.
По сравнению с препаратами поликлональных антител, которые
10 обычно включают в себя различные антитела, направленные против
различных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело
15 направлено против отдельной детерминанты на антигене. Кроме
того, по своей специфичности моноклональные антитела имеют
преимущество в том, что они не загрязнены другими
20 иммуноглобулинами. Модификатор «моноклональности» служит
признаком антитела, полученного из существенно гомогенной
популяции антител, и не подразумевает необходимости
25 продуцирования антитела любым практическим способом. Например,
моноклональные антитела для применения в соответствии с
30 настоящим изобретением могут быть получены с помощью
гибридомного способа, впервые описанного Kohler et al., *Nature*,
256:495 (1975), или могут быть получены с помощью способов на
35 основе рекомбинантной ДНК (см., например, Патент США № 4816567).
«Моноклональные антитела» могут быть также выделены из библиотек
40 фаговых антител с использованием методики, описанной, например,
Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991) и Marks et al., *J.*
Mol. Biol., 222:581-597 (1991).

45 Моноклональные антитела в данном описании специфически
включают в себя «химерные» антитела (иммуноглобулины), у которых
50 часть тяжелой и/или легкой цепи идентична или гомологична
соответствующим последовательностям в антителах, полученных из

отдельных видов, или относится к отдельному классу или подклассу антител, тогда как остальная цепь (и) является идентичной или гомологичной соответствующим последовательностям антител, полученных из других видов или относящихся к другому классу или подклассу антител, а также фрагментов таких антител, поскольку они проявляют желаемую биологическую активность (Патент США № 4816567; Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)). Химерные антитела, представляющие интерес в данном описании, включают в себя «приматизированные» антитела, включающие в себя антиген-связывающие последовательности переменного домена, полученные из примата-не-человека (например, низших узконосых обезьян, таких как павиан, макак-резус или яванский макак), и человеческие последовательности константных областей (Патент США № 5693780).

«Гуманизированные» формы нечеловеческих (например, мышинных) антител являются химерными антителами, которые содержат минимальную последовательность, полученную из нечеловеческого иммуноглобулина. большей частью гуманизированные антитела являются иммуноглобулинами человека (реципиентные антитела), в которых остатки из гипервариабельной области реципиента замещены остатками из гипервариабельной области видов, отличных от человека (донорное антитело), таких как мышь, крыса, кролик или примат-не-человек, имеющими желаемую специфичность, аффинность и способность. В некоторых случаях остатки каркасной области (FR) человеческого иммуноглобулина замещаются соответствующими нечеловеческими остатками. Кроме того, гуманизированные антитела могут включать в себя остатки, которые не обнаружены в

реципиентном антителе или в донорном антителе. Эти модификации проводят для дальнейшего усовершенствования характеристики антител. Обычно гуманизированное антитело предпочтительно включает в себя в основном все, по меньшей мере одно и, типично, два переменных домена, в которых все или в основном все гиперпеременные петли соответствуют таковым нечеловеческого иммуноглобулина, и все или в основном все FR являются таковыми человеческой иммуноглобулиновой последовательности, за исключением FR замен как указано выше. Гуманизированное антитело необязательно также может включать в себя по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина, обычно ту, что и у иммуноглобулина человека. Для дальнейшей детализации 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 «гиперпеременная область» в данном описании относится к аминокислотным остаткам антитела, которые ответственны за антигенное связывание. Гиперпеременная область включает в себя аминокислотные остатки из «области, определяющей комплементарность», или «CDR» (например, остатки 24-34 (L1), 50-56 (L2) и 89-97 (L3) в переменном домене легкой цепи и 31-35 (H1), 50-65 (H2) и 95-102 (H3) в переменном 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 эти остатки из «гиперпеременной петли» (например, остатки 26-32 (L1), 50-52 (L2) и 91-96 (L3) в переменном домене легкой цепи и 26-32

(H1), 53-55 (H2) и 96-101 (H3) в переменном домене тяжелой цепи; Chothia & Lesk J. *Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)).

5 «Каркасные» или «FR» остатки являются остатками переменного домена, отличающимися от остатков гиперпеременной области, как определено в данном описании.

10 «Голое антитело» представляет собой антитело (как определено в данном описании), которое не конъюгирует с
15 гетерологичной молекулой, такой как цитотоксическая часть или радиоактивная метка.

«Изолированное» антитело представляет собой антитело,
20 которое было идентифицировано и выделено и/или восстановлено из компонента его природной окружающей среды. Загрязняющие
25 компоненты его природной окружающей среды являются материалами, которые будут препятствовать диагностическому и терапевтическому применению антитела и могут включать в себя ферменты, гормоны и
30 другие белковые и небелковые растворенные вещества. В предпочтительных вариантах осуществления антитело должно быть очищено (1) более чем на 95% по массе антитела, как определено
35 по способу Лоури, и наиболее предпочтительно, более чем на 99% по массе, (2) до степени, достаточной для получения по меньшей мере 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной
40 последовательности путем применения секвенатора с герметичным центрифугированием или (3) до гомогенности с помощью
45 электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE) в восстанавливающих или невосстанавливающих условиях с использованием кумасси голубого, или предпочтительно
50 серебристого красителя. Изолированное антитело включает в себя

антитело *in situ* в рекомбинантных клетках, так как по меньшей мере один компонент антительного природного окружения не будет представлен. Обычно, однако, изолированное антитело должно быть
5 получено с помощью по меньшей мере одной стадии очистки.

«Субъект» в данном описании является субъектом человеческой
10 природы. Обычно такой субъект подходит для лечения волчанки. Для целей данного описания таким подходящим субъектом является субъект, который испытывает или испытывал один или несколько
15 признаков, симптомов или других признаков волчанки, или у него была диагностирована волчанка, или, например, вновь
20 диагностирована, предварительно диагностирована с новым внезапным обострением болезни, или при хронической стероидной зависимости с новым внезапным обострением болезни, или с риском
25 развития волчанки. Субъект, подходящий для лечения волчанки, может необязательно быть идентифицирован как субъект, который был подвергнут скринингу на предмет обнаружения повышенных
30 уровней инфильтрирующих CD20-клеток или скринингу с использованием способа детекции аутоантител, таких как антитела, указанные ниже, где аутоантительная продукция оценивается
35 качественно и, предпочтительно, количественно. Образцами таких аутоантител, ассоциированных с SLE, являются анти-нуклеарные антитела (ANA), антитела против двунитевой ДНК (днДНК), анти-Sm-антитела Ab, антитела против нуклеарных рибонуклеопротеинов,
40 анти-фосфолипидные антитела, антитела против рибосомных Р, анти-Ro/SS-A-антитела, анти-Ro-антитела или анти-La-антитела.

Внезапное обострение нефритной волчанки определяют как 1)
50 увеличение >30% Scr в 1-месячный период, или 2) рецидив или

проявление нефротического синдрома, или 3) 3-кратное увеличение в мочевом белке базовой линии протеинурии >1 г/24 ч или как
5 указано в Примере 1. Для волчаночного нефрита приемлемость лечения может быть доказана наличием нефротического обострения болезни, что определено с помощью почечного критерия, как
10 указано ниже в Примере 1.

Диагностирование SLE может быть в соответствии с
15 существующими критериями (ACR) Американского Колледжа Ревматологии. Активная болезнь может быть определена с помощью British Isles Lupus Activity Group's (BILAG) «А»-критериев или
20 двух BILAG «В»-критериев, как указано в примере 2. Некоторыми признаками, симптомами или другими показателями, использованными для диагностики SLE, адаптированными по Tan et al., "The Revised
25 Criteria for the Classification of SLE", *Arth Rheum* 25 (1982), могут быть щечная сыпь, такая как сыпь над щеками, дискоидная сыпь или красные выпуклые пятчи, светочувствительность, как,
30 например, реакция на солнечный свет, приводящая к развитию или увеличению кожной сыпи, оральные язвы, такие как язвы в носу или
35 в полости рта, обычно безболезненные, артрит, такой как неэрозивный артрит, включающий два или несколько периферических суставов (артрит, при котором кости, окружающие суставы, не
40 разрушаются), серозит, плеврит или перикардит, почечное расстройство, такое как избыточный белок в моче (более чем 0,5 г/день или 3+ в тесте на клейкость) и/или клеточные цилиндры (аномальные элементы, полученные из мочи и/или лейкоцитов и/или
45 почечных тубулярных клеток), неврологические признаки, симптомы
50 или другие показатели, припадки (судороги) и/или психоз при

отсутствии лекарственных или метаболических расстройств, которые, как известно, вызывают такие эффекты, и гематологические признаки, симптомы или другие показатели, такие как гемолитическая анемия или лейкопения (число лейкоцитов ниже 4000 клеток на кубический миллиметр) или лимфопения (менее чем 1500 лимфоцитов на кубический миллиметр), или тромбоцитопения (менее чем 100000 тромбоцитов на кубический миллиметр). Лейкопения и лимфопения должны быть детектированы в двух или большем числе повторов. Тромбоцитопения должна быть детектирована в отсутствие лекарств, которые известны как ее индукторы. Изобретение не ограничено этими признаками, симптомами или другими показателями волчанки.

«Лечение» субъекта в данном описании относится и к терапевтическому лечению, и к профилактическим или превентивным мерам. Те, кто нуждается в лечении, включают тех, кто уже болеет волчанкой, а также тех, у кого волчанка предотвращена. Следовательно, субъект может быть диагностирован как имеющий волчанку или как имеющий предрасположенность или чувствительность к волчанке.

«Симптом» волчанки представляет собой любой болезненный феномен или отклонение от нормы в структуре, функции или ощущении, испытанных субъектом и указывающих на болезнь.

Экспрессия «эффективного количества» относится к количеству антитела, которое является эффективным для предотвращения, уменьшения интенсивности симптомов или лечения волчанки.

«Антительная экспозиция» в данном описании относится к контакту с [антителом] или к экспозиции антитела в виде одной

или нескольких доз, вводимых в период примерно от 1 дня примерно до 5 недель. Дозы могут быть даны один раз или в фиксированные или в нерегулярные интервалы времени в течение этого периода экспозиции, как, например, одна доза еженедельно в течение четырех недель или две дозы отдельно в интервале около 13-17 дней. Начальную и последнюю антительную экспозиции отделяют друг от друга во времени [введения антитела], как описано в деталях в данном описании.

Термин «иммуносупрессивный агент», используемый в данном описании в отношении агентов для дополнительной терапии, относится к веществам, которые действуют, вызывая супрессию или маскировку иммунной системы млекопитающего, подвергнутого лечению. Они включают в себя вещества, которые вызывают супрессию выработки цитокинов, вызывают отрицательную регуляцию, или подавление, экспрессии аутоантигена или маскируют МНС-антигены. 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 лейкотриена; пуриновые антагонисты, такие как азатиоприн или микофенолат мофетил (MMF); алкилирующие агенты, такие как циклофосфамид; бромкриптин; даназол; дапсон; глутаральдегид (который маскирует МНС-антигены, как описано в Патенте США № 4120649); антиидиотипические антитела для МНС-антигенов и МНС-фрагментов; циклоспорин А; стероиды, такие как

кортикостероиды или глюкокортикостероиды, или глюкокортикоидные
 аналоги, например, преднизон, метилпреднизолон и дексаметазон;
 5 дигидрофолатредуктазные ингибиторы, такие как метотрексат
 (перорально или подкожно); гидроксихлорохин; сульфасалазин;
 лефлуномид; цитокиновые или цитокинрецепторные антитела, включая
 10 антитела против интерферона альфа, бета или гамма, антитела
 против фактора некроза опухолей-альфа (инфликсимаб или
 адалимумаб), анти-TNF-альфа-иммуноагезин (этанерцепт), антитела
 15 против фактора некроза опухолей-бета, антитела против
 интерлейкина-2 и антитела против IL-2-рецептора, анти-LFA-1-
 антитела, включая анти-CD11a- и анти-CD18-антитела; анти-L3T4-
 антитела; гетерологичный анти-лимфоцитарный глобулин; пан-T-
 антитела, предпочтительно, анти-CD3- или анти-CD4/CD4a-антитела;
 20 растворимый пептид, содержащий LFA-3-связывающий домен (WO
 1990/08187, опубликованный 7/26/90); стрептокиназу; TGF-бета;
 25 стрептодорназу; РНК или ДНК хозяина; FK506; RS-61443;
 дезоксиспергуалин; рапамицин; Т-клеточной рецептор (Cohen et
 al., Патент США № 5114721); фрагменты Т-клеточного рецептора
 35 (Offner et al., *Science*, 251: 430-432 (1991); WO 1990/11294;
 Ianeway, *Nature*, 341:482 (1989); и WO 1991/01133); и Т-
 40 клеточнорецепторные антитела (EP 340109), такие как T10B9.

Термин «цитотоксический агент» в данном описании относится
 к веществу, которое ингибирует или предотвращает функцию клеток
 45 и/или вызывает деструкцию клеток. Термин предназначен для
 включения радиоактивных изотопов (например, At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} ,
 50 Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} и радиоактивных изотопов Lu),
 химиотерапевтических агентов и токсинов, таких как

низкомолекулярные токсины или ферментативно активные токсины
бактериального, грибкового, растительного или животного
5 происхождения, или их фрагментов.

«Химиотерапевтический агент» представляет собой химическое
соединение, применяемое для лечения рака. Примеры
10 химиотерапевтических агентов включают в себя алкилирующие
агенты, такие как тиотера и CYTOXAN® циклофосфамид;
алкилсульфонаты, такие как бисульфан, импросульфан и
15 пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбохион,
метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, включая
альтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамида,
20 триэтилентиофосфорамида и триметилоломеламин; ацетогенины
(особенно, буллатацин и буллатацинон); камптотецин (включая
25 синтетический аналог топотекан); бриостатин; каллистатин; CC-
1065 (включая его синтетические аналоги адозелесин, карзелесин и
бизелесин); криптофицины (особенно криптофицин 1 и криптофицин
30 8); доластатин; диокармицин (включая синтетические аналоги KW-
2189 и CB1-TM1); элеутеробин; панкреатистатин; саркодиктин;
35 спонгистатин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил,
хлорнафазин, холофосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлоретамин,
40 гидрохлорид мехлоретаминоксида, мелфалан, новембицин,
фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урациловый иприт;
нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин,
45 ломустин, нимустин и ранимнастин; антибиотики, такие как
енедииновые антибиотики (например, калихеамицин, особенно
калихеамицин гамма I1 и калихеамицин омега I1 (см. *Angew. Chem.*
50 *Intl. Ed. Engl.*, 33: 183-186 (1994)); динемидин, включая

динемицин А; бисфосфонаты, такие как клодронат; эсперамицин; а также неокарциностатиновый хромофор и родственные хромопротеиновые хромоформы енединовых антибиотиков, аклациномизины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицин, кактиномицин, карабицин, карминомицин, карзинофиллин, хромомицинус, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, ADRIAMYCIN® доксорубицин (включая морфолино-доксорубицин, цианоморфолино-доксорубицин, 2-пирролино-доксорубицин и дезоксидоксорубицин), эпирубицин, эсорубицин, идарубицин, марцелломицин, митомицины, такие как митомицин С, микофеноловая кислота, ногаломицин, оливомицин, пепломицин, потфиروмицин, пиромицин, квеламицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, юбенимекс, зиностатин, зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметрексат; пуриновые аналоги, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; пиримидиновые аналоги, такие как анцитабин, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин; андрогены, такие как калустерон, дромостанолон пропионат, эпителиостанол, мепитиостан, тестолактон; потивонадпочечниковые средства, такие как аминоклутетимид, митотан, трилостан; наполнители фолиевой кислоты, такие как фролиновая кислота; ацеглатон; альдофосфамида гликозид; аминоклевулиновая кислота; энилурацил; амсакрин; бестрабуцил; бисантрен; эдатраксат; дефофамин; демеколцин; диазихион; элфорнитин; эллиптиния ацетат; эпотилон; этоглюцид; галлия

нитрат; гидроксимочевина; лентинан; лонидаинин; мейтансиноиды, такие как мейтансин и ансамитоцины; митогуазон; митоксантрон; 5 мопиданмол; нитраерин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; лозоксантрон; подофиллиновая кислота; 2-этилгидразид; прокарбазин; PSK® полисахаридный комплекс (JHS Natural Products, Eugene, OR); разоксан; ризоксин; сизофиран, спирогерманиум; 10 тенуазоновая кислота; триазиквон; 2,2',2''-трихлортриэтиламин; трихотецены (особенно Т-2 токсин, верракурин А, роридин А и ангуидин); уретан; виндесин; дакарбазин; манномустин; 15 митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид (Ara-C); циклофосфамид; тиотера; таксоиды, например, TAXOL® паклитаксел (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), 25 ABRAXANE™, не содержащий Кремоформа, сконструированный на основе альбумина наночастичный состав паклитаксела (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois) и TAXOTERE® доксетаксел (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France); 30 хлоранбуцил; GEMZAR® гемцитабин; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платины, такие как цисплатин и карбоплатин; винбластин; 35 платина; этопозид (VP-16); ифосфамид; митоксантрон; винкристин; NAVELBINE® винорелбин; новантрон; тенипозид; эдатрексат; 40 дауномицин; аминоптерин; кселода; ибандронат; СРТ-11; топоизомеразный ингибитор RFS 2000; дифторметилорнитин (DMFO); ретиноиды, такие как ретиноевая кислота; капецитабин и их любые 45 фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные.

В это определение также включены противогормональные 50 агенты, которые действуют, регулируя или ингибируя гормональное действие на опухоли, такие как антиэстрогены и селективные

модуляторы эстрогеновых рецепторов (SERM), включая, например, тамоксифен (включая NOLVADEX® тамоксифен), ралоксифен, 5 дролоксифен, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон и FARESTON® торемифен; ароматазные ингибиторы, которые ингибируют фермент ароматазу, который 10 регулирует продукцию эстрогенов в надпочечниках, таких как, например, 4(5)-имидазолы, аминоклутетимид, MEGASE® мегестрола ацетат, AROMASIN® экземестан, форместан, фадрозол, RIVISOR® 15 ворозол, FEMARA® летрозол и ARIMIDEX® анастрозол; и анти-андрогены, такие как флутамид, нилутамид, бикалутамид, лейпролид и гoserелин; а также троксаситабин (1,3-диоксолановый аналог 20 цитозинового нуклеозида); антисмысловые олигонуклеотиды, особенно те, которые ингибируют экспрессию генов сигнальных 25 путей, вовлеченных в аномальную клеточную пролиферацию, такие как, например, PKC-альфа, Raf и H-Ras; вакцины, такие как генотерапевтические вакцины, например, ALLOVECTIN® вакцина, 30 LEUVECTIN® вакцина и VAXID® вакцина; PROLEUKIN® rIL-2; LURTOTECAN® ингибитор топоизомеразы 1; ABARELIX® rmRH и их любые 35 фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные.

Термин «цитокин» представляет собой генетический термин для 40 белков, высвобождаемых одной клеточной популяцией, которые действуют на другие клетки как межклеточные медиаторы. Примерами таких цитокинов являются лимфокины, монокины; интерлейкины (IL), 45 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; фактор некроза опухолей, такой как 50 TNF- α или TNF- β ; и другие полипептидные факторы, включая LIF и набор лиганда (KL). В данном описании термин «цитокин» включает

в себя белки из природных источников или из рекомбинантной
клеточной культуры и биологически активные эквиваленты нативных
последовательностей цитокинов, включая синтетически полученные
части маленьких молекул и их фармацевтически приемлемые
производные и соли.

Термин «гормон» относится к полипептидным гормонам, которые
обычно секретируются glandularными органами через протоки. В
гормоны включены, например, гормон роста, такой как гормон роста
человека, N-метионилловый гормон роста человека и гормон роста
крупного рогатого скота; паратиреоидный гормон; тироксин;
инсулин; проинсулин; релаксин; прорелаксин; гликопротеиновые
гормоны, такие как фолликулостимулирующий гормон (FSH),
тиреотропный гормон (TSH) и лютеинизирующий гормон (LH);
пролактин, плацентарный лактоген, гонадотропин-ассоциированный
пептид мыши, ингибин; активин; мюллеровское ингибирующее
вещество и тромбopoэтин. Как использовано в данном описании,
термин гормон включает белки из естественных источников или из
рекомбинантной клеточной культуры и биологически активные
эквиваленты нативной последовательности гормона, включая
синтетически полученные части маленьких молекул и их
фармацевтически приемлемые производные и соли.

Термин «фактор роста» относится к белкам, которые
стимулируют рост и включает, например, фактор роста печени;
фактор роста фибробластов; фактор роста сосудистого эндотелия;
фактора роста нервов, такой как NGF- β ; полученный из тромбоцитов
фактор роста; трансформирующие факторы роста (TGF), такие как
TGF- α и TGF- β ; инсулиноподобный фактор роста-I и II;

эритропоэтин (EPO); остеоиндуктивные факторы; интерфероны, такие как интерферон- α , - β и - γ ; и колониестимулирующие факторы (CSF),
5 такие как колониестимулирующий (CSF) фактор макрофагов (M-CSF); колониестимулирующий фактор (CSF) гранулоцитов-макрофагов (GM-CSF) и колониестимулирующий фактор (CSF) гранулоцитов (G-CSF).
10 Как использовано в данном описании, термин «фактор роста» включает белки из природных источников или из рекомбинантной клеточной культуры и биологически активные эквиваленты нативной
15 последовательности фактора роста, включая синтетически полученные части маленьких молекул и их фармацевтически приемлемые производные и соли.

Термин «интегрин» относится к рецепторному белку, который
25 позволяет клеткам и связываться с внеклеточным матриксом, и реагировать на него; он вовлечен в ряд клеточных функций, таких как заживление ран, клеточная дифференцировка, хоминг опухолевых
30 клеток и апоптоз. Интегрины являются частью большого семейства рецепторов клеточной адгезии, которые вовлечены во взаимодействие клеток с внеклеточным матриксом и в межклеточное
35 взаимодействие. Функциональные интегрины состоят из двух трансмембранных гликопротеиновых субъединиц, названных альфа и бета, которые являются нековалентно связанными. Все альфа-
40 субъединицы имеют некоторую гомологию друг с другом, как и бета-субъединицы. 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.п. В данном описании термин
50 интегрин включает в себя белки из природных источников или из рекомбинантной клеточной культуры и биологически активные

эквиваленты нативной последовательности интегрина, включая синтетически полученные части маленьких молекул и их фармацевтически приемлемые производные и соли.

В данном описании «фактор некроза опухолей-альфа (TNF-альфа) относится к молекуле TNF-альфа человека, включающей в себя аминокислотную последовательность, описанную Pennica et al., *Nature*, 312:721 (1984) или Aggarwal et al., *JBC*, 260:2345 (1985).

«Ингибитором TNF-альфа» в данном описании является агент, который до некоторой степени ингибирует биологическую функцию TNF-альфа, обычно через связывание с TNF-альфа и нейтрализацию его активности. Примерами ингибиторов TNF-альфа, специфически рассматриваемых в данном описании, являются этанерцепт (ENBREL®), инфликсимаб (REMICADE®) и адалимумаб (HUMIRA™).

Примеры «модифицирующих болезнь противоревматических лекарственных средств», или «DMARD» включают в себя гидроксихлороквин, сульфасалазин, метотрексат, лефлуномид, этанерцепт, инфликсимаб (плюс перорально и подкожно метотрексат), азатиоприн, D-пеницилламин, соли золота (перорально), соли золота (внутримышечно), миноциклин, циклоспорин, стафилококковый белок А иммуноадсорбции, включая их соли и производные, и т.п.

Примерами «нестероидных противовоспалительных лекарственных средств», или «NSAID» являются ацетилсалициловая кислота, ибупрофен, напроксен, индометацин, сулиндак, толметин, включая их соли и производные, и т.п.

Примеры «интегриновых антагонистов или антител» в данном

описании включают в себя LFA-1-антитело, такое как эфализумаб (RAPTIVA®) коммерчески доступный от Genentech, или альфа-4-интегриновое антитело, такое как натализумаб (ANTEGREN®), доступное от Biogen, или диазациклические фенилаланиновые производные (WO 2003/89410), фенилаланиновые производные (WO 2003/70709, WO 2002/28830, WO 2002/16329 и WO 2003/53926), производные фенилпропионовой кислоты (WO 2003/10135), энаминовые производные (WO 2001/79173), производные пропановой кислоты (WO 2000/37444), производные алкановой кислоты (WO 2000/32575), замещенные фенильные производные (Патент США № 6677339 и 6348463), производные ароматических аминов (Патент США № 6369229), ADAM полипептиды с доменом дизинтегрин (США 2002/0042368), антитела к альфа-бета-3 интегрина (ЕР 633945), производные бициклических аминокислот с аза-мостиком (WO 2002/02556), и т.п.

«Кортикостероид» относится к любому из нескольких синтетических или природно встречающихся веществ с общей химической структурой стероидов, которые имитируют или увеличивают эффекты природных кортикостероидов. Примеры синтетических кортикостероидов включают преднизон, преднизолон (включая метилпреднизолон), дексаметазона триамцинолон и бетаметазон.

«Листовка-вкладыш» применяется как относящаяся к инструкциям, обычно включающимся в коммерческие упаковки терапевтических продуктов, которая содержит информацию о показаниях, применении, дозировке, введении, противопоказаниях, других терапевтических продуктах для комбинирования с продуктом

упаковки и/или предупреждений относительно применения таких терапевтических продуктов, и т.п.

5 То, что экспозиция (или введение) не должна обеспечиваться раньше определенного времени, прошедшего «после начальной экспозиции» или после любой предшествующей экспозиции, означает,
10 что время для второй или последующей экспозиции измеряется от времени введения любой из доз предыдущей экспозиции, если более чем одна доза была введена в этой экспозиции. Например, когда
15 две дозы вводят в начальной экспозиции, вторую экспозицию не проводят ранее чем по меньшей мере примерно через 16-54 недели, отсчитанные от времени первой или второй дозы, введенной до этой
20 экспозиции. Аналогично, когда вводят три дозы, вторая экспозиция может быть измерена от времени введения первой, второй или
25 третьей дозы в предыдущей экспозиции. Предпочтительно «после начальной экспозиции» означает время, прошедшее после применения первой дозы.
30

«Лекарственное средство» представляет собой активное лекарственное средство для лечения волчанки или ее симптомов или
35 побочных эффектов.

II. Лечение

40 В настоящем изобретении предложен способ лечения волчанки у субъекта, подходящего для лечения, включающий в себя введение эффективного количества антитела, которое связывается с маркером
45 В-клеточной поверхности (предпочтительно CD20-антителом) у субъекта, обеспечивая начальную антительную экспозицию около 0,5-4 граммов (предпочтительно, около 1,5-3,5 граммов, более
50 предпочтительно, около 1,5-2,5 граммов), за которой следует

вторая антительная экспозиция около 0,5-4 граммов
(предпочтительно, около 1,5-3,5 граммов, более предпочтительно,
около 1,5-2,5 граммов), где вторая экспозиция обеспечивается не
ранее чем примерно через 16-54 недели (предпочтительно, примерно
от 20 до 30 недель, более предпочтительно, примерно от 46 до 54
недель) после начальной экспозиции, и каждая антительная
экспозиция обеспечивает субъекта либо разовой дозой, либо двумя
или тремя отдельными дозами. Для целей этого изобретения вторая
антительная экспозиция является следующим периодом лечения
субъекта CD20-антителом после начальной экспозиции, при этом
между начальной и второй экспозициями не должно проводиться
лечение или экспозиция CD20-антителом.

Способ предпочтительно включает в себя введение субъекту
эффективного количества CD20-антитела для обеспечения третьей
антительной экспозиции около 0,5-4 граммов (предпочтительно
около 1,5-3,5 граммов, более предпочтительно, около 1,5-2,5
граммов), при этом третья экспозиция не должна обеспечиваться не
ранее чем примерно через 46-60 недель (предпочтительно, примерно
46-55, более предпочтительно, примерно 46-52 недели) после
начальной экспозиции. Предпочтительно, далее, антительная
экспозиция не обеспечивается ранее чем примерно через 70-75
недель после начальной экспозиции, и еще более предпочтительно,
далее, антительная экспозиция не обеспечивается ранее чем по
меньшей мере примерно через 74-80 недель после начальной
экспозиции.

Любая одна или несколько антительных экспозиций в данном
описании могут обеспечить субъекта как разовой дозой антитела

или двумя или тремя отдельными дозами антитела (то есть, представляя первую и вторую дозу или первую, вторую и третью дозу). Специфическое число доз (одна, две или три), применяемое для каждой антительной экспозиции, зависит, например, от типа лечения волчанки, типа применяемого антитела, типа второго применяемого лекарственного средства, как указано ниже, и способа и частоты введения. Когда вводят отдельные дозы, вторую дозу и третью дозу предпочтительно вводят примерно через 1-20 дней, более предпочтительно, примерно через 6-16 дней, и наиболее предпочтительно, примерно через 14-16 дней после введения предыдущей дозы. Отдельные дозы предпочтительно вводят в общий период примерно между 1 днем и 4 неделями, более предпочтительно, примерно между 1 и 20 днями (например, в период 6-18 дней). В одном таком аспекте отдельные дозы вводят примерно еженедельно, и вторая доза должна вводиться примерно через одну неделю после первой дозы, и любая третья доза должна вводиться через одну неделю после второй дозы. Каждая такая отдельная доза антитела составляет предпочтительно около 0,5-1,5 граммов, более предпочтительно, около 0,75-1,3 граммов.

В одном варианте осуществления субъекта обеспечивают по меньшей мере примерно тремя экспозициями антитела, например, примерно от 3 до 60 экспозиций, и более предпочтительно, примерно 3-40 экспозиций, наиболее предпочтительно, примерно 3-20 экспозиций. Предпочтительно такие экспозиции вводят с интервалами, каждый из которых составляет примерно 24 недели. В одном варианте осуществления каждая антительная экспозиция обеспечивается как разовая доза антитела. В альтернативном

варианте осуществления каждая антителенная экспозиция обеспечивается в виде отдельных доз антитела. Однако не каждая антителенная экспозиция требует разовой дозы или отдельных доз.

Антитело может быть голым антителом или может быть конъюгировано с другой молекулой, такой как цитотоксический агент, такой как радиоактивное соединение. Предпочтительным антителом в данном описании является ритуксимаб, гуманизированное антитело 2H7 (например, включающее в себя последовательности SEQ ID NO:2 и 8 переменного домена) или HUMAX-CD20TM-антитело (Genmab), более предпочтительно, ритуксимаб или гуманизированное антитело 2H7.

В одном варианте осуществления субъект никогда не был ранее подвергнут лечению лекарственным средством(ами), таким как иммуносупрессивный агент(ы) для лечения волчанки и/или никогда не был ранее подвергнут лечению антителом против маркера В-клеточной поверхности (например, никогда не был ранее подвергнут лечению CD20-антителом). В другом варианте осуществления субъект был ранее подвергнут лечению лекарственным средством(ами) для лечения волчанки и/или был ранее подвергнут лечению таким антителом. В другом варианте осуществления CD20-антитело является только лекарственным средством, вводимым субъекту для лечения волчанки. В другом варианте осуществления CD20-антитело является одним из лекарственных средств, применяемых для лечения волчанки. В другом варианте осуществления субъект не имеет ревматоидного артрита. Еще в другом варианте осуществления субъект не имеет множественного склероза. Еще в другом варианте осуществления субъект не имеет аутоиммунного заболевания,

отличающегося от волчанки. Для целей самого последнего
высказывания «аутоиммунное заболевание» в данном описании
5 представляет собой заболевание или расстройство, возникающее из
и направленное против своих собственных тканей или органов, или
косегрегирует или манифестирует вследствие этого, или приводит к
10 состоянию посредством этого. В одном варианте осуществления оно
относится к состоянию, которое происходит в результате или
ухудшается посредством продуцирования В-клетками антител,
15 которые являются реактивными в отношении нормальных тканей
организма и антигенов. В других вариантах осуществления
20 аутоиммунное заболевание представляет собой заболевание, которое
включает в себя секрецию аутоантитела, которое является
специфичным для эпитопа аутоантигена (например, нуклеарного
25 антигена).

Антитело вводят любыми приемлемыми способами, включая
30 введение парентеральное, топическое, подкожное, внутривещное,
внутрилегочное, внутриносое и/или внутрь повреждения.
Парентеральные инфузии включают в себя внутримышечное,
35 внутривенное, внутриартериальное, внутривещное или подкожное
введение. Внутривещное введение также предполагается (см.,
40 например, US 2002/0009444, Grillo-Lopez, A concerning
intrathecal delivery of a CD20 antibody). Кроме того, антитело
может быть, соответственно, введено путем импульсной инфузии,
45 например, с понижающимися дозами антитела. Предпочтительно,
дозирование дается внутривенно или подкожно и более
предпочтительно, путем внутривенной инфузии (й). Каждая
50 экспозиция может быть обеспечена применением одинаковых или

различных способов введения. В одном варианте осуществления каждая экспозиция дается путем внутривенного введения. В другом варианте осуществления каждая экспозиция дается путем подкожного введения. Еще в другом варианте осуществления экспозиции даются путем и внутривенного, и подкожного введения.

В одном варианте осуществления CD20-антитело вводят как медленную внутривенную инфузию, а не внутривенно толчком или болюсом. Например, метилпреднизолон (например, около 80-120 мг в/в, более предпочтительно, около 100 мг в/в) вводят примерно в течение 30 минут перед любой инфузией CD20-антитела. Путь введения CD20-антитела определяется специалистом.

Для начальной дозы мультидозовой экспозиции CD20-антитела или для разовой дозы, если экспозиция включает только одну дозу, такую инфузию предпочтительно начинают со скоростью около 50 мг/час. Она может быть увеличена, например, от скорости около 50 мг/час примерно каждые 30 минут до максимального значения около 400 мг/час. Однако если субъект испытывает связанную с инфузией реакцию, скорость инфузии предпочтительно снижают, например, до половины текущей скорости, например, от 100 мг/час до 50 мг/час. Предпочтительно инфузию такой дозы CD20-антитела (например, около 1000 мг суммарной дозы) вводят примерно в течение 255 минут (4 часа 15 мин.). Предпочтительно субъекты получают профилактическое лечение ацетаминофеном/парацетамолом (например, около 1 г) и дифенгидраминам HCl (например, около 50 мг или эквивалентную дозу подобного агента) перорально примерно за 30-60 минут до начала инфузии.

Если более чем одну инфузию (дозу) CD20-антитела дают для

достижения суммарной экспозиции, вторую или последующие инфузии CD20-антитела в этом варианте осуществления инфузии предпочтительно начинают с более высокой скорости, чем начальная инфузия, например, около 100 мг/час. Эта скорость может быть увеличена, например, от скорости около 100 мг/час, возрастая примерно каждые 30 минут до максимального значения около 400 мг/час. Субъектам, которые испытывают связанную с инфузией реакцию, предпочтительно скорость инфузии снижают до половины этой скорости, например, от 100 мг/час до 50 мг/час. Предпочтительно инфузию такой второй или последующей дозы CD20-антитела (например, около 1000 мг суммарной дозы) полностью вводят примерно за 195 минут (3 часа 15 минут).

Может быть введено второе лекарственное средство с антителом, которое связывает маркер В-клеточной поверхности (например, с CD20-антителом), такой как цитотоксический агент, химиотерапевтический агент, противомаларийный агент, иммуносупрессивный агент, цитокин, антагонист цитокина или антитело, фактор роста, гормон, интегрин, антагонист интегрина или антитело.

Например, антитело может быть скомбинировано с химиотерапевтическим агентом, лекарственным средством интерферонового класса, таким как IFN-бета-1a (REBIF® и AVONEX®) или IFN-бета-1b (BETASERON®), олигопептидом, таким как глатирамерацетат (COPAXONE®), цитотоксическим агентом (таким как митоксантрон (NOVANTRONE®), метотрексат, циклофосфамид, хлорамбуцил и азатиоприн), внутривенным иммуноглобулином (гамма-глобулин), лимфоцит-истощающей терапией (например, митоксантрон,

циклофосфамид, CAMPATHTM антитела, анти-CD4-кладрибин, полное облучение тела, трансплантация костного мозга), кортикостероидом (например, метилпреднизолон, преднизон, такой как низкодозовый преднизон, дексаметазон или глюкокортикоид, например, посредством внутрисуставной инъекции, включая системную кортикостероидную терапию), не-лимфоцит-истощающей иммуносупрессивной терапией (например, MMF или циклоспорин), холестерин-понижающим лекарственным средством «статинового» класса (которое включает серивастатин (BAYCOLTM), флувастатин (LESCOLTM), аторвастатин (LIPITORTM), ловастатин (MEVACORTM), правастатин (PRAVACHOLTM) и симвастатин (ZOCORTM)), эстрадиолом, тестостероном (необязательно в повышенных дозах; Stuve et al., *Neurology* 8:290-301 (2002)), гормон-заместительной терапией, противомаларийным лекарственным средством, таким как, например, гидроксихлороквин, хлороквин или квинакрин, лечением симптомов, вторичных или связанных с волчанкой (например, спастичность, недержание, боль, утомление), ингибитором TNF, DMARD, NSAID, анти-интегриновым антителом или антагонистом, плазмаферезом, левотироксином, циклоспорином А, соматостатиновым аналогом, цитокином, анти-цитокиновым антагонистом или антителом, антиметаболитом, иммуносупрессивным агентом, реабилитационной хирургией, радиоактивным иодом, тиреоидэктомией, другим антагонистом/антителом В-клеточной поверхности и т.п.

Более специфические примеры таких вторых лекарственных средств, если CD20-антитело называется первым лекарственным средством, включают в себя химиотерапевтический агент, цитотоксический агент, антиинтегрин, противомаларийное

лекарственное средство, такое как, например, гидроксихлороквин, хлороквин или квинакрин, гамма-глобулин, анти-CD4, кладрибин, кортикостероид, ММГ, циклоспорин, холестерин-понижающее лекарственное средство статинового класса, эстрадиол, тестостерон, гормон-замещающее лекарственное средство, ингибитор TNF, DMARD, NSAID, левотироксин, циклоспорин А, соматостатиновый аналог, антагонист цитокина или антагонист рецептора цитокина, антиметаболит, иммуносупрессивный агент и/или другое маркерное антитело В-клеточной поверхности, такое как комбинация ритуксимаба и гуманизированного антитела 2H7. Еще более предпочтительным является химиотерапевтический агент, иммуносупрессивный агент, цитотоксический агент, антагонист интегрина, противомаларийное лекарственное средство, антагонист цитокина или гормон, или же комбинация одного или нескольких этих лекарственных средств.

Эти вторые лекарственные средства обычно применяют в тех же дозах и курсах введения, какие были использованы в данном описании выше, или примерно от 1 до 99% предшествующих примененных доз. Если такие вторые лекарственные средства применяют полностью, предпочтительно они применяются в более низком количестве, чем если бы CD20-антитело не было представлено, особенно при последующих дозировках выше начальной дозы антитела, так, чтобы элиминировать или снизить побочные эффекты, вызванные терапией.

Когда второе лекарственное средство вводят в эффективном количестве с антительной экспозицией, он может быть введен с любой экспозицией, например, только с одной экспозицией или

более чем с одной экспозицией. В одном варианте осуществления второе лекарственное средство вводят вместе с начальным введением (экспозицией). В другом варианте осуществления второе лекарственное средство вводят с начальной и второй экспозицией. Еще в другом варианте осуществления второе лекарственное средство вводят со всеми экспозициями.

Комбинированное введение включает в себя совместное введение с применением отдельных составов или единственного фармацевтического состава и последующее введение в любом порядке, где предпочтительно существует период времени, когда оба (или все) активные агенты одновременно проявляют свои биологические активности. В предпочтительном варианте осуществления после начальной экспозиции количество такого агента снижают или элиминируют, так, чтобы снизить экспозицию субъекта агентами с побочными эффектами, такими как преднизон и циклофосфамид, особенно когда агентом является кортикостероид. В другом варианте осуществления количество второго лекарственного средства не снижают и не элиминируют.

В предпочтительном варианте осуществления иммуносупрессивный агент, противомаларийный агент или химиотерапевтический агент вводят с начальной экспозицией, более предпочтительно, кортикостероид, метотрексат, циклофосфамид, гидроксихлороквин, хлороквин, квинакрин, азатиоприн, микофенолат мофетил или 6-меркаптопурин. В другом аспекте иммуносупрессивный агент, противомаларийный агент или химиотерапевтический агент не вводят с последующей экспозицией или вводят в более низком количестве, чем с начальной экспозицией. Однако такой агент

необязательно вводят с более чем одной экспозицией, включая все экспозиции, в таком же или сходном количестве как с начальной экспозицией.

Если волчанка является волчаночным нефритом, предпочтительно около 2-3 граммов CD20-антитела вводят в виде начальной экспозиции, более предпочтительно, около 2 граммов. В другом предпочтительном варианте осуществления, если вводят 3 грамма, около 1 грамма CD20-антитела вводят еженедельно около трех недель как начальную экспозицию. В другом предпочтительном варианте осуществления, если вводят 2 грамма, около 1 грамма CD20-антитела вводят примерно в течение двух недель вслед за другим примерно 1 граммом антитела, как в начальной экспозиции. В другом аспекте вторую экспозицию проводят примерно через шесть месяцев после начальной экспозиции и вводят в количестве около 2 граммов. Еще в другом варианте осуществления вторую экспозицию проводят примерно через шесть месяцев после начальной экспозиции и вводят около 1 грамма антитела примерно через две недели после другого примерно 1 грамма антитела.

Предпочтительно для волчаночного нефрита кортикостероид, такой как метилпреднизолон и/или преднизон, вводят субъекту до и/или вместе с CD20-антителом. Предпочтительно субъект в/в получает метилпреднизолон около 1000 мг ежедневно в течение двух дней на первую антителную экспозицию. Для первой антителной экспозиции это лечение является предпочтительным, за которым следует перорально преднизон в начальной дозе около 0,75 мг/кг/день в течение около 4 недель и снижающийся примерно до 10-15 мг/день к примерно к 16 неделе. Предпочтительно около 100

мг метилпреднизолона в/в вводят примерно в течение 30-60 минут до инфузий последующих доз CD20-антитела после начальной дозы.

Также предпочтительно со второй экспозицией вводят преднизон в более низком количестве, чем применяют с начальной экспозицией или когда преднизон не вводят со второй экспозицией, или когда преднизон вводят в более низком количестве со второй экспозицией, чем применяют в начальной экспозиции, но не вводят в третьей и последующих экспозициях. Дополнительно или альтернативно MMF предпочтительно вводят с начальной антительной экспозицией с сопутствующим введением MMF и кортикостероида, являющимися особенно предпочтительными. Предпочтительно MMF дают сначала с CD20-антителом около 1500 мг/день в разделенных дозах (3х/день) и субъекта титруют вплоть до мишенной дозы около 3 г/день в разделенных дозах (3х/день) к примерно 4 неделе как толерантного. Если уменьшение дозы необходимо, допускается снижение дозы примерно на 250-500 мг. В другом аспекте циклофосфамид может быть введен субъекту с или без кортикостероида в начальной антительной экспозиции. Если вводят циклофосфамид, его предпочтительно не вводят со второй экспозицией или вводят со второй экспозицией, но в более низком количестве, чем в начальной экспозиции. Также предпочтительно, если циклофосфамид не вводят с третьей и последующими экспозициями.

Если волчанка является системной красной волчанкой, предпочтительно около 2 граммов CD20-антитела вводят в начальной экспозиции. Также предпочтительно, если около 1 грамма CD20-антитела вводят примерно в течение двух недель после другого

примерно 1 грамма антитела, как в начальной экспозиции.

Предпочтительно вторую экспозицию проводят примерно через шесть
5 месяцев после начальной экспозиции и вводят в количестве около 2
граммов. В другом предпочтительном варианте осуществления вторую
экспозицию проводят примерно через шесть месяцев после начальной
10 экспозиции и вводят около 1 грамма антитела примерно через две
недели после другого примерно 1 грамма антитела.

15 Для SLE предпочтительно преднизон вводят до и/или вместе
начальной экспозицией, как, например, за неделю до начальной
экспозиции, в количестве около 0,4-1 мг/кг/день. Более
20 предпочтительно, субъекты получают начальную схему перорально
преднизона 0,5 мг/кг/день, 0,75 мг/кг/день или 1,0 мг/кг/день,
основанную на их BILAG индексе и предварительном исследовании
25 дозы преднизона в течение 7-дневного периода. Примерно на 16
день после начального введения CD20-антитела субъектам
30 предпочтительно снижают дозу преднизона примерно в течение 10
недель для достижения дозы преднизона менее чем около 10
мг/день. Субъектам будут продолжать снижать их дозы
35 кортикостероида как толерантные к мишенной дозе, меньшей или
равной около 5 мг/день. Еще более предпочтительным является
40 введение со второй экспозицией чем используется с начальной
экспозицией преднизона в более низком количестве, или когда
преднизон не вводят со второй экспозицией, или когда преднизон
45 вводят в более низком количестве со второй экспозицией, чем
применяют с начальной экспозицией, но не вводят в третьей и
50 последующих экспозициях. В другом предпочтительном аспекте в
дополнение к преднизону вводят противомаларийное лекарственное

средство, такое, например, как гидроксихлороквин, хлороквин или
квинакрин, или метотрексат, микофенолат мофетил, азатиоприн или
5 6-меркаптопурин. Оно может быть введено в течение одной или
нескольких экспозиций, как, например, начальной или второй
экспозиции, или последующей экспозиции или в течение всех
10 экспозиций. В таком варианте осуществления противомаларийное
лекарственное средство метотрексат, микофенолат мофетил,
15 азатиоприн или 6-меркаптопурин необязательно вводят только в
течение начальной экспозиции или необязательно также вводят со
второй экспозицией, но в более низком количестве, чем применяли
20 с начальной экспозицией.

Обсуждение способов получения, модификации и технология
приготовления таких антител следует ниже.

III. Получение антител

Способы и изделия производства согласно изобретению могут
30 использоваться или включают антитело, которое связывается с
маркером В-клеточной поверхности, особенно то, которое
связывается с CD20. Соответственно в данном описании будут
35 описаны способы получения таких антител.

CD20-антиген, применяемый для получения или скрининга
40 антитела(ел), может быть, например, растворимой формой CD20 или
его частью, содержащей желаемый эпитоп. В качестве альтернативы
или дополнительно клетки, экспрессирующие CD20 на своей
45 клеточной поверхности, могут быть использованы для получения или
скрининга антитела(ел). Другие формы CD20, применяемые для
получения антител, должны быть очевидны для специалистов в
50 данной области.

Далее следует описание иллюстративных методик получения антител, применяемых в соответствии с настоящим изобретением.

5 (i) *Поликлональные антитела*

Поликлональные антитела предпочтительно возрастают у животных посредством множественных подкожных (sc) внутрибрюшинных
10 (ip) инъекций релевантного антигена и адъюванта. Это может быть использовано для конъюгации релевантного антигена с белком, который является иммуногенным для видов, которые предполагается
15 иммунизировать, например, гемоцианином блюдечка, сывороточным альбумином, тиреоглобулином крупного рогатого скота или соевым ингибитором трипсина с использованием бифункционального или
20 производного агента, например, сложного эфира малеимидобензоилсульфосукцинимиды (конъюгация через цистеиновые
25 остатки), N-гидроксисукцинимиды (через лизиновые остатки), глутаральдегида, янтарного ангидрида, SOCl_2 , или $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, где R и R^1 являются различными алкильными группами.
30

Животных иммунизируют против антигена, иммуногенного конъюгата или производных путем объединения, например, 100 мкг
35 или 5 мкг белка или конъюгата (для кролика или мыши соответственно) с 3 объемами полного адъюванта Фрейнда и инъецируют раствор подкожно во множественные участки. Через один
40 месяц животных повторно иммунизируют 1/5-1/10 первоначального количества пептида или конъюгата в полном адъюванте Фрейнда путем подкожной инъекции во множественные участки. Через 7-14
45 дней у животных берут кровь, и сыворотку анализируют на титр антитела. Животных повторно иммунизируют до плато титра.
50 Предпочтительно животных иммунизируют конъюгатом подобного

антигена, но конъюгированного с другим белком и/или через другой
сшитый реагент. Конъюгаты также могут быть получены в культуре
рекомбинантных клеток как белковые слияния. Также агрегирующие
агенты, такие как квасцы, применяют для усиления иммунного
ответа.

(ii) *Моноклональные антитела*

Моноклональные антитела получают из популяции существенно
гомогенных антител, то есть индивидуальные антитела,
составляющие популяцию, являются идентичными и/или связывают
одинаковые эпитопы, за исключением возможных вариантов, которые
возникают в процессе получения моноклонального антитела, такие
варианты обычно представлены в небольшом количестве. Так
модификатор «моноклональности» служит признаком антитела как не
являющегося смесью дискретных или поликлональных антител.

Например, моноклональные антитела могут быть получены с
использованием гибридного способа, впервые описанного Kohler
et al., *Nature*, 256:495 (1975), или могут быть получены с
помощью способов на основе рекомбинантной ДНК (Патент США №
4816567).

В гибридном способе мышь или другое подходящее животное-
хозяин, такое как хомячок, иммунизируют как описано выше для
извлечения лимфоцитов, которые продуцируют или способны
продуцировать антитела, которые будут специфически связываться с
белком, используемым для иммунизации. В качестве альтернативы
лимфоциты могут быть иммунизированы *in vitro*. Лимфоциты затем
сливают с миеломными клетками с использованием соответствующего
сливающего агента, такого как полиэтиленгликоль, с формированием

гибридомных клеток (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986)).

5 Приготовленные таким образом, гибридомные клетки засевают и
выращивают на приемлемой культуральной среде, которая
предпочтительно содержит один или несколько веществ, которые
10 ингибируют рост и выживаемость неслившихся исходных миеломных
клеток. Например, если в исходных миеломных клетках не хватает
15 фермента гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазы (HGPRT или
HPRT), культуральная среда для гибридом обычно будет включать
гипоксантин, аминоптерин и тимидин (HAT среда), вещества,
20 которые препятствуют росту HGPRT-дефектных клеток.

Предпочтительными миеломными клетками являются те, которые
25 эффективно сливаются, поддерживают стабильный высокий уровень
продуцирования антитела путем селекции антителопродуцирующих
клеток и являются чувствительными к среде, такой как HAT среда.
30 Среди них предпочтительными миеломными клеточными линиями
являются мышинные миеломные линии, такие как линии, полученные из
MOPC-21 и MPC-11 мышинных опухолей, доступные из Salk Institute
35 Cell Distribution Center, San Diego, California USA, и SP-2 или
X63-Ag8-653 клетки, доступные из Американской Коллекции Типовых
40 Культур, Роквилл, Мэриленд, США. Человеческие миеломные и
мышинные-человеческие гетеромиеломные клеточные линии также были
описаны для продуцирования человеческих моноклональных антител
45 (Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brouder et al.,
Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp.
50 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

Культуральную среду, в которой гибридомные клетки

выращивают, анализируют для продуцирования моноклональных антител, направленных против антигена. Предпочтительно специфичность связывания моноклональных антител, продуцируемых гибридомными клетками, определяют путем иммунопреципитации или путем *in vitro* анализа связывания, такого как радиоиммуноанализ (RIA) или иммуноабсорбентный анализ с ферментной меткой (ELISA).

Аффинность связывания моноклонального антитела может быть, например, определена посредством анализа Скэтчарда по Munson *et al.*, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

После идентификации гибридомных клеток, которые продуцируют антитела желаемой специфичности, аффинности и/или активности, клоны могут быть субклонированы путем методик ограниченного разведения и выращены с помощью стандартных способов (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986)). Приемлемая культуральная среда для этих целей включает, например, D-MEM или RPMI-1640 среду. Кроме того, гибридомные клетки могут быть выращены *in vivo* как асцитные опухоли у животных.

Моноклональные антитела, секретируемые субклонами, выделяют из культуральной среды, асцитной жидкости или сыворотки с помощью стандартных методик очистки иммуноглобулина, таких как, например, белок A-SEPHAROSE™, сшитый с агарозой, хроматографии с гидроксиапатитом, гель-электрофореза, диализа или аффинной хроматографии.

ДНК, кодирующую моноклональные антитела, легко выделяют и секвенируют с использованием стандартных методик (например, путем применения олигонуклеотидных зондов, которые способны

специфически связывать гены, кодирующие тяжелую и легкую цепи мышиных антител). Гибридомные клетки служат предпочтительным источником такой ДНК. Однажды выделенная ДНК может быть помещена в экспрессионные векторы, которыми затем трансфицируют клетки-хозяева, такие как клетки *E. coli*, обезьяньи клетки COS, клетки яичника китайского хомячка (CHO) или миеломные клетки, которые иначе не продуцируют иммуноглобулиновый белок, для получения синтеза моноклональных антител в рекомбинантных клетках-хозяевах. Обзорные статьи по рекомбинантной экспрессии в бактерии ДНК, кодирующей антитело, включают Skerra et al., *Curr. Opinion in Immunol.*, 5:256:262 (1993) и Plückerthun, *Immunol. Revs.*, 130:151-188 (1982).

В дальнейшем варианте осуществления антитела или антительные фрагменты могут быть изолированы из фаговых библиотек антител, генерированных с использованием методики, описанной у 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 мышиных и человеческих антител соответственно с использованием фаговых библиотек. Последующие публикации описывают продуцирование высокоаффинных (нМ диапазон) человеческих антител с помощью перестройки цепей (Marks et al., *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992)), а также комбинаторной инфекции и *in vivo* рекомбинации как стратегии конструирования очень больших фаговых библиотек (Waterhouse et al., *Nuc. Acids. Res.*, 21:2265-2266 (1993)). Таким образом, эти методики являются практически осуществимыми альтернативами традиционных гибридомных методик выделения

моноклональных антител.

ДНК также может быть модифицирована, например, путем
5 замещения кодирующей последовательности человеческих константных
доменов тяжелой и легкой цепи вместо гомологичных мышиных
последовательностей (Патент США № 4816567; Morrison *et al.*,
10 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851 (1984)) или путем
ковалентного связывания с иммуноглобулин-кодирующей
15 последовательностью всей или части кодирующей последовательности
не-иммуноглобулинового полипептида.

Обычно такие не-иммуноглобулиновые полипептиды замещают
20 константными доменами антитела или их замещают переменными
доменами одного антиген-комбинированного сайта антитела для
создания химерного бивалентного антитела, включающего один
25 антиген-комбинированный сайт, имеющий специфичность для антигена
и другой антиген-комбинированный сайт, имеющий специфичность для
30 другого антигена.

(iii) Гуманизированные антитела

Способы гуманизации нечеловеческих антител были описаны в
35 данной области. Предпочтительно гуманизированное антитело имеет
один или несколько аминокислотных остатков, введенных в него из
источника, который является нечеловеческим. Эти нечеловеческие
40 аминокислотные остатки часто относятся к «импортируемым»
остаткам, которые обычно взяты из «импортного» переменного
45 домена. Гуманизация может быть, в основном, выполнена по
следующему способу Winter и соавторов (Jones *et al.*, *Nature*,
321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332:323-327
50 (1988); Verhoeven *et al.*, *Science*, 239:1534-1536 (1988)) путем

замещения последовательностей гипервариабельной области на соответствующие последовательности человеческого антитела.

5 Соответственно такие «гуманизированные» антитела являются химерными антителами (Патент США № 4816567), которые значительно менее чем интактный человеческий вариабельный домен были
10 замещены соответствующей последовательностью из нечеловеческих видов. На практике такие гуманизированные антитела являются типично человеческими антителами, в которых некоторые остатки
15 гипервариабельной области и, возможно, некоторые FR остатки являются замещенными остатками из аналогичных участков антител грызунов.
20

Выбор человеческих вариабельных доменов, как легких, так и тяжелых, применяемых для получения гуманизированных антител,
25 является очень важным для снижения антигенности. В соответствии с так называемым «best-fit» способом последовательность вариабельного домена антитела грызуна подвергают скринингу
30 против полной библиотеки известных последовательностей человеческих вариабельных доменов. Человеческая последовательность, которая близка к таковой грызуна, затем
35 принимается как человеческая каркасная область (FR) для гуманизированного антитела (Sims et al., *J. Immunol.*, 151:2296 (1993); Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987)). В другом
40 способе применяют отдельную каркасную область, полученную из консенсусной последовательности всех человеческих антител
45 отдельной подгруппы вариабельных областей легкой и тяжелой цепи. Подобный каркас может быть использован для некоторых различных
50 гуманизированных антител (Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*

USA, 89:4285 (1992); Presta et al., *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)).

5 Далее является важным, что антитела должны гуманизироваться с сохранением высокой аффинности для антигена и другими полезными биологическими свойствами. Для достижения этой задачи в соответствии с предпочтительным способом гуманизированные антитела получают с помощью процесса анализа исходных последовательностей и различных концептуальных гуманизированных продуктов с применением трехмерных моделей исходных и гуманизированных последовательностей. Трехмерные иммуноглобулиновые модели обычно являются приемлемыми и хорошо знакомы специалистам в данной области. Доступны иллюстрирующие компьютерные программы и дисплей вероятных трехмерных конформационных структур селективных кандидатов иммуноглобулиновых последовательностей. Инспектирование этих дисплеев позволяет проводить анализ возможной роли остатков в функционировании кандидатных иммуноглобулиновых последовательностей, то есть анализ остатков, которые влияют на способность кандидатного иммуноглобулина связывать свой антиген. Таким образом, FR остатки могут быть выбраны и объединены от реципиента и импортных последовательностей так, чтобы достигнуть желаемой антительной характеристики, такой как повышенная аффинность к мишенному антигену(ам). В общем, остатки гипервариабельной области непосредственно и наиболее значительно вовлекаются во влияние на антигенное связывание.

50 (iv) Человеческие антитела

В качестве альтернативы гуманизации могут быть генерированы

человеческие антитела. Например, сейчас существует возможность
производства трансгенных животных (например, мыши), которые
5 способны при иммунизации производить полный репертуар
человеческих антител в отсутствие производства эндогенного
иммуноглобулина. Например, было описано, что гомозиготная
10 делеция гена области соединения тяжелой цепи (J_H) антитела в
химерной и зародышевой линии мутантных мышей приводит к полному
ингибированию эндогенного производства антитела. Перенос чипа
15 гена иммуноглобулина зародышевой линии человека в такую
зародышевую линию мутантной мыши будет приводить к
20 производству человеческих антител на антигенную провокационную
пробу. См., например, Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*
USA, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature*, 362:255-258
25 (1993); Bruggermann et al., *Year in Immun.*, 7:33 (1993) и
Патенты США № 5591669, 5589369 и 5545807.

30 В качестве альтернативы методика фагового дисплея
(McCafferty et al., *Nature*, 348:552-553 (1990) может быть
применена для получения человеческих антител и антительных
35 фрагментов in vitro из репертуара гена иммуноглобулинового
вариабельного (V) домена от неиммунизированных доноров. В
40 соответствии с этой методикой гены V-домена антитела клонируют в
рамку гена или основного или минорного белка оболочки нитчатого
бактериофага, такого как M13 или fd, и проявляют как
45 функциональные антительные фрагменты на поверхности фаговой
частицы. Так как нитчатая частица содержит одностороннюю ДНК-копию
50 фагового генома, селекция, основанная на функциональных
свойствах антитела, также приводит к селекции гена, кодирующего

антитело, проявляющее эти свойства. Так фаг имитирует некоторые свойства В-клеток. Фаговый дисплей может быть выполнен в различных форматах; по нему см. обзоры, например, Johnson, Kevin S. & Chiswell David J., *Current Opinion in Strucrural Biology* 3:564-571 (1993). Некоторые источники сегментов V-гена могут быть применены для фагового дисплея. Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991) выделил несходный чип анти-оксазолиновых антител из слаборандомизированной комбинаторной библиотеки V генов, полученных из селезенки иммунизированных мышей. Репертуар V генов из иммунизированных человеческих доноров может быть сконструирован и антитела к несходному чипу антигенов (включая аутоантигены) могут быть изолированы, в основном, следуя методикам, описанным Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991) или Griffith et al., *EMBO J.* 12:725-734 (1993). См. также Патенты США № 5565332 и 5573905.

Человеческие антитела также могут быть генерированы посредством *in vitro*-активированных В-клеток (см. Патенты США № 5567610 и 5229275).

(v) Антительные фрагменты

Были разработаны различные методики продуцирования антительных фрагментов. Традиционно эти фрагменты получают путем протеолитического переваривания 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 сейчас могут быть продуцированы непосредственно с помощью рекомбинантных клеток-хозяев. Например, антительные фрагменты могут быть изолированы

из антительных фаговых библиотек, обсужденных выше. В качестве альтернативы Fab'-SH-фрагменты могут быть непосредственно выделены из *E. coli* и химически связаны с формированием F(ab')₂-фрагментов (Carter et al., *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). В соответствии с другим подходом, F(ab')₂-фрагменты могут быть изолированы непосредственно из культуры рекомбинантных клеток-хозяев. Другие методики получения антительных фрагментов должны быть очевидны специалистам в данной области. В других вариантах осуществления антителом выбора является одноцепочечный Fv-фрагмент (scFv). См. WO 1993/16185 и Патенты США № 5571894 и 5587458. Антительный фрагмент также может быть «линейным антителом», например, как описано в Патенте США № 5641870. Такие линейные антительные фрагменты могут быть моноспецифичными или биспецифичными.

(vi) Биспецифичные антитела

Биспецифичные антитела представляют собой антитела, которые имеют специфичности связывания по меньшей мере для двух различных эпитопов. Примерные биспецифичные антитела могут связываться с двумя различными эпитопами CD20-антигена. Другие такие антитела могут связывать CD20 и далее связывать второй маркер В-клеточной поверхности. В качестве альтернативы анти-CD20-связывающее плечо может быть комбинировано с плечом, которое связывается с триггерной молекулой на лейкоците, такой как молекула Т-клеточного рецептора (например, CD2 или CD3), или Fc рецепторы для IgG (FcγR), такие как FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) и FcγRIII (CD16), с тем, чтобы фокусировать механизмы клеточной защиты в В-клетке. Биспецифичные антитела также могут

быть использованы для локализации цитотоксических агентов в В-клетке. Эти антитела обладают CD20-связывающим плечом и плечом, которое связывает цитотоксический агент (например, сапорин, анти-интерферон- α , алкалоид барвинка, рициновая А-цепь, метотрексат или радиоактивный изотоп гаптена). Биспецифичные антитела могут быть получены как полноразмерные антитела или антительные фрагменты (например, $F(ab')_2$ -биспецифичные антитела).

Способы получения биспецифичных антител известны в данной области. Традиционное продуцирование полноразмерных биспецифичных антител основано на коэкспрессии двух иммуноглобулиновых пар тяжелая цепь-легкая цепь, где две цепи имеют различные специфичности. (Millstein et al., *Nature*, 305:537-539 (1983)). Из-за случайной сортировки тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина эти гибридомы (квадромы) продуцируют потенциальную смесь 10 различных молекул антител, из которых только одна имеет правильную биспецифичную структуру. Очистка правильной молекулы, которую обычно делают с помощью стадий аффинной хроматографии, является слишком обременительной, и выход продукта является низким. Подобные методики описаны в WO 1993/08829 и у Traunecker et al., *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991).

В соответствии с другим подходом переменные домены антитела с желаемыми специфичностями связывания (антитело-антиген комбинирующие сайты) сливают с последовательностями константного домена иммуноглобулина. Предпочтительным является слияние с константным доменом тяжелой цепи иммуноглобулина, включающим наименьшую часть шарнира, CH2- и CH3-области. Предпочтительно иметь первую константную область тяжелой цепи

(CH1) содержащую сайт, необходимый для связывания легкой цепи, представленный, по меньшей мере в одном из слияний. ДНК, кодирующие слияния тяжелой цепи иммуноглобулина, и, по желанию, легкую цепь иммуноглобулина, вставляют в отдельные экспрессирующиеся векторы и котрансфицируют ими соответствующий хозяйский организм. Это обеспечивает большую гибкость в регулировке взаимных пропорций трех полипептидных фрагментов в варианте осуществления, когда неравные отношения трех полипептидных цепей, применяемые в конструкции, обеспечивают оптимальные выходы. Существует, однако, возможность вставки кодирующих последовательностей двух или трех полипептидных цепей в один экспрессионный вектор, когда экспрессия по меньшей мере двух полипептидных цепей в равных отношениях приводит к высоким выходам или когда отношения ограничены незначительно.

В предпочтительном варианте осуществления этого подхода биспецифичные антитела составляют гибридную тяжелую цепь иммуноглобулина с первой специфичностью связывания в одном плече и гибридную иммуноглобулиновую пару тяжелая цепь-легкая цепь (обеспечивающую вторую специфичность связывания) в другом плече. Обнаружено, что эта асимметричная структура облегчает отделение желаемого биспецифичного соединения от нежелательных комбинаций иммуноглобулиновой цепи, хотя присутствие иммуноглобулиновой легкой цепи только в одной половине биспецифичной молекулы обеспечивает легкий путь выделения. Этот подход раскрыт в WO 1994/04690. Для дальнейшей детализации генерации биспецифичных антител см., например, Suresh 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
5 быть сконструирована с максимальным процентным содержанием гетеродимеров, которые выделяют из культуры рекомбинантных клеток. Предпочтительная поверхность раздела включает по меньшей
10 мере часть C_H3-домена антительного константного домена. В этом способе одна или несколько маленьких аминокислотных боковых цепей поверхности раздела первой молекулы антитела замещают
15 большими боковыми цепями (например, тирозин или триптофан). Компенсаторные «полости» идентичного или подобного размера в большой боковой цепи(ях) создают на поверхности раздела второй молекулы антитела путем замещения больших аминокислотных боковых
20 цепей на более маленькие цепи (например, аланин или треонин). Это обеспечивает механизм увеличения выхода гетеродимера по сравнению с другими нежелательными конечными продуктами, такими
25 как гомодимеры.

Биспецифичные антитела включают сшитые или «гетероконъюгированные» антитела. Например, одно из антител в
35 гетероконъюгате может быть связано с авидином, другое с биотином. Такие антитела, например, были предложены для нацеливания на клетки иммунной системы в нежелательных клетках
40 (Патент США № 4676980) и для лечения ВИЧ-инфекции (WO 1991/00360, WO 1992/200373 и EP 03089). Гетероконъюгированные антитела могут быть получены с использованием любых удобных
45 способов сшивания. Приемлемые сшивающие агенты хорошо известны в данной области и раскрыты, например, в Патенте США № 4676980, наряду с рядом методик сшивания.

Методики генерации биспецифичных антител из антительных
фрагментов также были описаны в литературе. Например,
5 биспецифичные антитела могут быть получены с использованием
химической связи. Brennan *et al.*, *Science*, 229:81 (1985)
описывает методику, в которой интактные антитела протеолитически
10 расщепляют для генерации (F(ab')₂-фрагментов. Эти фрагменты
восстанавливают в присутствии дитиол комплексообразующего агента
натрия арсенита для стабилизации вицинал дитиолов и
15 предотвращения межмолекулярного формирования дисульфида.
Генерированные Fab'-фрагменты затем превращают в
20 тионитробензоатные (TNB) производные. Один из Fab'-TNB
производных затем превращают в Fab'-тиол путем восстановления
с меркаптоэтиламином и смешивают с эквимольным количеством
25 другого Fab'-TNB производного с формированием биспецифичного
антитела. Полученные биспецифичные антитела могут быть
30 использованы как агенты селективной иммобилизации ферментов.

Также были описаны различные методики получения и изоляции
биспецифичных антительных фрагментов непосредственно из культуры
35 рекомбинантных клеток. Например, биспецифичные антитела были
получены с использованием лейциновых застежек-молний. Kostelny
40 *et al.*, *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992). Пептиды с
лейциновой застежкой-молнией из Fos и Jun белков связывают с
Fab'-частями двух различных антител путем генного слияния.
45 Антительные гомодимеры восстанавливают в области шарнира с
формированием мономеров и затем реокисляют с формированием
50 антительных гетеродимеров. Этот способ можно также использовать
для получения антительных гомодимеров. Методика «диантител»,

описанная Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993), обеспечивает альтернативный механизм получения биспецифичных антительных фрагментов. Фрагменты включают 5
вариабельный домен (V_H) тяжелой цепи, соединенный с вариабельным доменом (V_L) легкой цепи с помощью линкера, который является 10
слишком коротким, чтобы допустить спаривание между двумя доменами на той же самой цепи. Соответственно V_H - и V_L -домены 15
одного фрагмента вынуждены спариваться с комплементарными V_H - и V_L -доменами другого фрагмента, тем самым формируя два антиген-связывающих сайта. Также была сообщена другая стратегия 20
получения биспецифичных антительных фрагментов путем применения одноцепочечных Fv (sFV) димеров. См. Gruber et al., *J. Immunol.*, 152:5368 (1994).

Рассматриваются антитела с более чем двумя валентностями. Например, могут быть получены триспецифичные антитела. Tutt et 30
al., *J. Immunol.*, 147:60 (1991).

IV. Конъюгаты и другие модификации антитела

Антитело, применяемое в способах или включенное в изделия 35
производства в данном описании, необязательно конъюгирует с цитотоксическим агентом. Например, (CD20) антитело может быть 40
конъюгировано с лекарственным средством, как описано в WO 2004/032828.

Химиотерапевтические агенты, применяемые для генерации 45
таких антитело-цитотоксический агент конъюгатов были описаны выше.

Конъюгаты антитела и одного или нескольких 50
низкомолекулярных токсинов, таких как калихеамицин, мейтансин

(Патент США № 5208020)), трихотен и CC1065, также рассматриваются в данном описании. В одном варианте осуществления согласно изобретению антитело конъюгирует с одной или несколькими молекулами мейтансина (например, около 1-10 молекул мейтансина на молекулу антитела). Мейтансин может, например, превращаться в May-SS-Me, которой может быть восстановлен в May-SH3 и реагировать с модифицированным антителом (Chari et al., *Cancer Research* 52:127-131 (1992)) с генерацией конъюгата мейтансиноид-антитело.

В качестве альтернативы антитело конъюгирует с одним или несколькими молекулами калихеамицина. Калихеамициновое семейство антибиотиков способно продуцировать разрывы двунитевой ДНК в суб-пикомолярных концентрациях. Структурные аналоги калихеамицина, которые могут быть использованы, включают, но не ограничиваясь ими, γ_1^I , α_2^I , α_3^I , N-ацетил- γ_1^I , PSAG и θ^I1 (Hinman et al., *Cancer 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 дифтерийную А-цепь, несвязанные активные фрагменты дифтерийного токсина, экзотоксиновую А-цепь (из *Pseudomonas aeruginosa*), рициновую А-цепь, абриновую А-цепь, модессиновую А-цепь, альфа-сарцин, белки *Aleurites fordii*, диантиновые белки, белки *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII и PAP-S), ингибитор *Momordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор *Saponaaria officinalis*, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин, эномицин и трикотецены. См., например, WO 1993/21232, опубликованный 28 октября 1993 г.

Настоящее изобретение далее рассматривает антитела, конъюгированные с соединением с нуклеолитической активностью (например, рибонуклеаза или ДНК-эндонуклеаза, такая как дезоксирибонуклеаза; ДНКаза).

Множество радиоактивных изотопов приемлемы для продуцирования радиоконъюгированных антител. Примеры включают 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 множества бифункциональных белок-связывающих агентов, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитиол) пропионат (SPDP), сукцинимидил-4-(N-малеимидометил) циклогексан-1-карбоксилат, иминотиолан (IT), бифункциональные производные имидозэфиров (таких как диметил адипимидат HCl), активных сложных эфиров (таких как дисукцинимидил суберат), альдегиды (такие как глутаральдегид), бис-азидо-соединения (такие как бис(п-азидобензоил)гександиамин), производные бис-дiazония (такие как бис-(п-дiazонийбензоил)этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол 2,6-диизоцианат) и бис-активные фторовые соединения (такие как 1,5-дифторо-2,4-динитробензол). Например, рициновый иммунотоксин может быть получен, как описано Vitetta et al., Science 238:1098 (1987). Меченная углеродом-14 1-изотиоцианатбензил-3-метилдиэтилентриаминпентауксусная кислота (MX-DTPA) является примером хелатообразующего агента для конъюгации радионуклеотида с антителом. См. WO 1994/11026. Линкер может быть «расщепляющим линкером», способствующим

высвобождению цитотоксического лекарственного средства В-клетку. Например, могут быть использованы кислотолабильный линкер, пептидаза-чувствительный линкер, диметиловый линкер или дисульфид-содержащий линкер (Chari et al., *Cancer Research* 52: 127-131 (1992)).

В качестве альтернативы, слитый белок, включающий в себя антитело и цитотоксический агент, могут быть получены, например, путем рекомбинантных методик или пептидного синтеза.

Еще в одном из вариантов осуществления антитело может быть конъюгировано с «рецептором» (таким как стрептавидин) для утилизации в опухоли пренацеливания, когда конъюгат антитело - рецептор вводят субъекту, за которым следует удаление несвязанного конъюгата из кругооборота с использованием осветляющего агента и затем введение «лиганда» (например, авидина), который конъюгирует с цитотоксическим агентом (например, радионуклеотидом).

Антитела согласно изобретению также могут быть конъюгированы с активирующим пролекарство ферментом, который превращает пролекарство (например, пептидил химиотерапевтический агент, см. WO 1981/01145) в активное противоопухолевое средство. См., например, WO 1988/07378 и Патент США № 4975278.

Ферментативный компонент таких конъюгатов включает в себя любой фермент, способный действовать на пролекарство таким путем, чтобы превратить его в более активную цитотоксическую форму.

Ферменты, которые применяют в способе согласно изобретению, включают в себя, не ограничиваясь ими, щелочную фосфатазу,

применяемую для превращения фосфатаза-содержащих пролекарств в свободные лекарственные средства; арилсульфатазу, применяемую для превращения сульфат-содержащего пролекарства в свободные лекарственные средства; цитозиндезаминазу, применяемую для превращения нетоксичного 5-фторцитозина в противоопухолевое средство 5-фторурацил; протеазы, такие как протеаза *Serratia*, термолизин, субтилизин, карбоксипептидазы и катепсины (такие как катепсины В и L), которые применяют для превращения пептид-содержащих пролекарств в свободные лекарственные средства; D-аланилкарбоксипептидазы, применяемые для превращения пролекарств, которые содержат заместители D-аминокислот; углевод-расщепляющие ферменты, такие как β -галактозидаза и нейраминидаза, применяемые для превращения гликозилированных пролекарств в свободные лекарственные средства; β -лактамаза, применяемая для превращения лекарств, производных β -лактама, в свободные лекарственные средства и пенициллиновые амидазы, такие как пенициллин V амидаза или пенициллин G амидаза, применяемые для превращения лекарственных средств, производных от их аминных азотов с феноксиацетильными или фенилацетильными группами, соответственно, в свободные лекарственные средства. В качестве альтернативы антитела с ферментативной активностью, также известные в данной области как «абзимы», могут быть использованы для превращения пролекарств согласно изобретению в свободные активные лекарственные средства (см., например, Massey, *Nature* 328:457-458 (1987)). Конъюгаты антитело-абзим могут быть получены, как описано в данном описании, для доставки абзима в

популяцию опухолевых клеток.

Ферменты согласно изобретению могут быть ковалентно связаны
5 с антителом с помощью методик, хорошо известных в данной
области, таких как применение гетеробифункциональных сшивающих
реагентов, обсуждаемых выше. В качестве альтернативы слитые
10 белки, включающие в себя по меньшей мере антиген-связывающую
область антитела согласно изобретению, связанную по меньшей мере
с функционально активной частью фермента согласно изобретению,
15 могут быть сконструированы с использованием методики
рекомбинантной ДНК, хорошо известной в данной области. (см.,
20 например, Neuberger *et al.*, *Nature*, 312:604-608 (1984)).

Другие модификации антитела рассмотрены в данном описании.
Например, антитело может быть связано с одним из ряда небелковых
25 полимеров, например, полиэтиленгликолем (PEG),
полипропиленгликолем, полиоксикалкетонами или сополимерами
30 полиэтиленгликоля и полипропиленгликоля. Антительные фрагменты,
такие как Fab', связанные с одним или несколькими PEG-
молекулами, являются особенно предпочтительным вариантом
35 осуществления согласно изобретению.

Антитела, раскрытые в данном описании, также могут быть
40 составлены как липосомы. Липосомы, включающие антитела, получают
с помощью способов, известных в данной области, таких как
описанные у Epstein *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:3688
45 (1985); Hwang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4030
(1980); Патенты США № 4485045 и 4544545; и WO 1997/38731,
опубликованный 23 октября 1997 г. Липосомы с повышенным временем
50 циркуляции раскрыты в Патенте США № 5013556.

Особенно полезные липосомы могут быть генерированы посредством способа испарения с обращенной фазой с липидной композицией, включающей фосфатидилхолин, холестерин и PEG-производное фосфатидилэтаноламина (PEG-PE). Липосомы экструдируют через фильтры с определенным размером пор для выхода липосом с желаемым диаметром. Fab'-фрагменты антитела согласно изобретению могут быть конъюгированы с липосомами как описано у Martin et al., *L. Biol. Chem.* 257:286-288 (1982) через реакцию дисульфидного обмена. Химиотерапевтический агент необязательно содержится в липосоме. См. Gabizon et al., *J. National Cancer Inst.* 81 (19)1484 (1989).

Рассматривается модификация(и) аминокислотной последовательности белковых или пептидных антител, описанных в данном описании. Например, это может быть желательно для улучшения аффинности связывания и/или других биологических свойств антитела. Варианты аминокислотной последовательности антитела получены путем введения соответствующих нуклеотидных изменений в антительной нуклеиновой кислоте или путем пептидного синтеза. Такие модификации включают, например, делеции из, и/или инсерции в, и/или замещения остатков в аминокислотных последовательностях антитела. Любую комбинацию делеции, инсерции и замещения делают для достижения финальной конструкции, при условии, что финальная конструкция обладает желаемыми характеристиками. Аминокислотные изменения также могут изменять пост-трансляционные процессы антитела, такие как изменение числа или положения сайтов гликозилирования.

Полезный способ идентификации определенных остатков или

областей антитела, которые предпочтительно локализируются для мутагенеза, называется «аланин-сканирующий мутагенез», как описано Cunningham & Wells *Science*, 244:1081-1085 (1989). В данном описании идентифицируют остаток или группу остатков-мишеней (например, заряженные остатки, такие как arg, asp, his, lys и glu) и замещают нейтральными или отрицательно заряженными аминокислотами (наиболее предпочтительны аланин или полиаланин) для влияния на взаимодействие аминокислот с антигеном. Эти аминокислотные положения, демонстрирующие функциональную чувствительность к замещениям, затем усовершенствуют путем введения другого или других вариантов в или для сайтов замещения. Таким образом, хотя сайт для введения вариации аминокислотной последовательности заранее определен, природа мутации, по существу, заранее не предопределена. Например, для анализа осуществления мутации в данном сайте ala-сканирующий или случайный мутагенез проводят в кодоне-мишени или области, и экспрессирующиеся антительные варианты подвергают скринингу на желаемую активность.

Инсерции аминокислотных последовательностей включают аминокислоты и/или карбокси-концевые слияния, ранжированные по длине от одного остатка до полипептидов, содержащих сотни или более остатков, а также инсерции внутри последовательности одного или множества аминокислотных остатков. Примеры концевых инсерций включают антитело с N-концевым метиониловым остатком или антитело, слитое с цитотоксическим полипептидом. Другие инсерционные варианты молекулы антитела включают слияние с N- или C-концом антитела фермента или полипептида, который повышает

период сывороточного полувыведения антитела.

Другим типом варианта является вариант аминокислотной замены. Эти варианты имеют по меньшей мере один аминокислотный остаток в молекуле антитела, замещенный другим остатком. Сайты, представляющие наибольший интерес для заместительного мутагенеза антител, включают гипервариабельные области, но FR-изменения также рассматриваются. Консервативные замены показаны в Таблице 1 под заголовком «предпочтительные замены». Если такие замены приводят к изменению биологической активности, тогда могут быть внесены более существенные изменения, обозначенные как «иллюстративные замены» в Таблице 1 или далее в описании, в отношении классов аминокислот, и полученные продукты могут быть подвержены скринингу.

Таблица 1

Первоначальный остаток	Иллюстративные замены	Предпочтительные замены
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; 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; Phe; Норлейцин	Leu
Leu (L)	Норлейцин; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu

Phe (F)	Trp; 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; Норлейцин	Leu

Существенные модификации биологических свойств антитела достигаются путем селекции замещений, которые значительно различаются по своему эффекту на поддержание (а) структуры полипептидного остова в области замещения, например, листка или спиральной конформации, б) заряда или гидрофобности молекулы в сайте-мишени, или в) объема боковой цепи. Аминокислоты могут быть сгруппированы в соответствии со сходством свойств своих боковых цепей (по A.L.Lehninger, в *Biochemistry*, second ed. pp. 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) кислые: Asp (D), Glu (E);

4) основные: Lys (K), Arg (R), His (H).

В качестве альтернативы природно встречающиеся остатки могут быть разделены на группы, основанные на общих свойствах боковой цепи:

1) гидрофобные: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

2) нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

3) кислые: Asp, Glu;

5 4) основные: His, Lys, Arg;

5) остатки, которые влияют на ориентацию цепи: Gly, Pro;

6) ароматические: Trp, Tyr, Phe.

10

Неконсервативные замены будут вызывать замену члена одного из этих классов на другой класс.

15

Любой цистеиновый остаток, не вовлеченный в поддержание соответствующей конформации антитела, также может быть замещен, обычно серином для улучшения оксидативной стабильности молекулы и предотвращения аномального сшивания. Наоборот, цистеиновая связь(и) может быть добавлена к антителу для улучшения его стабильности (особенно когда антитело является антительным фрагментом, таким как Fv-фрагмент).

20
25

30

Особенно предпочтительный тип замещенного варианта включает замещение одного или нескольких остатков гипервариабельной области исходного антитела. Обычно полученный в результате вариант(ы), выбранный для дальнейшей разработки, будет иметь улучшенные биологические свойства по сравнению с исходным антителом, из которого он получен. Удобным путем генерации таких замещенных вариантов является аффинное созревание с использованием фагового дисплея. Вкратце, несколько сайтов гипервариабельной области (например, 6-7 сайтов) мутируют для генерации всех возможных аминокислотных замен в каждом сайте. Полученные таким образом варианты антител распределены в виде моновалентных частиц нитчатого фага как результат слияния с продуктом гена III M13, упакованных внутри каждой частицы.

35
40
45
50

Проявляемые на фазе варианты затем подвергают скринингу на биологическую активность (например, аффинность связывания) как раскрыто в данном описании. Для того, чтобы идентифицировать кандидатные для модификации сайты гипервариабельной области, должен быть выполнен аланин-сканирующий мутагенез для идентификации остатков гипервариабельной области, значительно способствующих антигенному связыванию. В качестве альтернативы или дополнительно может быть полезен анализ кристаллической структуры антиген-антительного комплекса для идентификации контактных точек между антителом и антигеном. Такие контактные остатки и соседние остатки являются кандидатами для замены в соответствии с методиками, разработанными в данном описании. Если такие варианты генерированы, панель вариантов подвергают скринингу, как описано в данном описании, и антитела с улучшенными свойствами в одном или нескольких соответствующих способах могут быть отобраны для дальнейшей разработки.

В другом типе аминокислотного варианта антитела изменяется исходный паттерн гликозилирования антитела. Такие изменения включают делетирование одной или нескольких углеводных частей, созданных в антителе, и/или добавление одного или нескольких сайтов гликозилирования, которые не представлены в антителе.

Гликозилирование полипептидов обычно является или N-связанным или O-связанным. N-связанное относится к прикреплению углеводной части к боковой цепи аспарагинового остатка. Трипептидные последовательности аспарагин-X-серин и аспарагин-X-треонин, где X является любой аминокислотой, за исключением пролина, являются распознающими последовательностями для

ферментативного прикрепления углеводной части к аспарагину боковой цепи. Таким образом, присутствие любой из этих трипептидных последовательностей в полипептиде создает потенциалный сайт гликозилирования. О-связанное гликозилирование относится к прикреплению одного из сахаров N-ацетилгалактозамина, галактозы или ксилозы к гидроксикаминовой кислоте, наиболее обычно серина или треонина, хотя 5-гидроксипролин или 5-гидроксизин также могут быть использованы.

Добавление сайтов гликозилирования к антителу удобно выполнять путем изменения аминокислотной последовательности, так как она содержит одну или несколько вышеописанных трипептидных последовательностей (для N-связанных сайтов гликозилирования). Изменение также может быть проведено путем добавления или замены одного или нескольких сериновых или треониновых остатков в последовательности исходного антитела (для О-связанных сайтов гликозилирования).

Когда антитело содержит Fc-область, углевод, прикрепляемый к ней, может быть изменен. Например, антитела со зрелой углеводной структурой, которые не содержат фукозу, прикрепленную к Fc-области антитела, описаны в US 2003/0157108 (Presta, L.). См. также US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.). Антитела с бисекционным N-ацетилглюкозамином (GlcNAc) в углеводе, прикрепленном к Fc-области антитела, упоминаются в WO 2003/011878, Jean-Mairet et al., и Патенте США № 6602684, Umana et al. Антитела с по меньшей мере одним галактозидным остатком в олигосахариде, прикрепленном к Fc-области антитела,

описаны в WO 1997/30087, Patel et al. См. также WO 1998/58964 (Raju, S.) и WO 1999/22764 (Raju, S.) относительно антител с измененными углеводами, прикрепленными к своей Fc-области.

Предпочтительный гликозилированный вариант в данном описании включает Fc-область, где углеводная структура, прикрепленная к Fc-области, не содержит фукозу. Такие варианты имеют улучшенную функцию ADCC. Необязательно, Fc-область далее включает одно или несколько аминокислотных замен, что далее улучшает ADCC, например, замены в положениях 298, 333 и/или 334 Fc-области (Еи нумерация остатков). Примерами публикаций, связанных с «дефукозилированием» или «фукозо-дефектными» антителами являются: US 2003/0157108; WO2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/164328; 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; Okazaki et al., J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004) и Yamane-Ohnuki et al., Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004). Примеры клеточных линий, продуцирующих дефукозилированные антитела, включают Lec13 CHO-клетки, дефектные по фукозилированию белков (Ripka et al., Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986); США 2003/0157108, Presta, L; и WO 2004/056312, Adams et al., особенно в Примере 11), и нокаутные клеточные линии, такие как CHO-клетки с нокаутированным геном FUT8 альфа-1,6-фукозилтрансферазы (Yamane-Ohnuki et al., Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)).

Молекулы нуклеиновых кислот, кодирующих варианты аминокислотной последовательности антитела, получают с помощью

различных способов, известных специалистам в данной области. Эти способы включают, но не ограничиваясь ими, выделение из природного источника (в случае природно встречающихся вариантов аминокислотной последовательности) или получение путем олигонуклеотид-опосредованного (или сайт-направленного) мутагенеза, ПЦР-мутагенеза и кассетного мутагенеза ранее полученного варианта или невариантной версии антитела.

При желании можно модифицировать антитело согласно изобретению в отношении эффекторной функции, например, с тем, чтобы усилить ADCC и/или CDC антитела. Это может быть достигнуто путем введения одного или нескольких аминокислотных замен в Fc-область антитела. В качестве альтернативы или дополнительно, цистеиновый остаток(и) может быть введен в Fc-область, тем самым обеспечивая формирование межцепочечной дисульфидной связи в этой области. Гомодимерное антитело, генерированное таким образом, может иметь улучшенную интернализирующую способность и/или увеличенную комплемент-опосредованную гибель клеток и ADCC. См. Caron et al., *J. Exp Med.* 176:1191-1195 (1992) и Shopes, B. J. *Immunol.* 148:2918-2922 (1992). Гомодимерные антитела с увеличенной противоопухолевой активностью также могут быть получены с применением гетеробифункциональных перекрестных линкеров как описано у Wolff et al., *Cancer Research* 53:2560-2565 (1993). В качестве альтернативы антитело может быть сконструировано как имеющее двойные Fc-области и может, тем самым, иметь усиленный комплементный лизис и ADCC способности. См. Stevenson et al., *Anti-Cancer Drug Design* 3:219-230 (1989).

WO 2000/42072 (Presta, L.) описывает антитела с улучшенной

ADCC функцией в присутствии человеческих эффекторных клеток, где антитела включают аминокислотные замены в своей Fc-области.

5 Предпочтительно антитело с улучшенным ADCC включает замены в положениях 298, 333 и/или 334 Fc-области. Предпочтительно измененная Fc-область является человеческой IgG1 Fc-областью, включающей или состоящей из замещений в одном, двух или трех
10 этих положениях.

15 Антитела с измененным Clq связыванием и/или CDC описаны в WO 1999/51642 и Патентах США № 6194551, 6242195, 6528624 и 6538124 (Idusogie et al.). Антитела включают аминокислотную
20 замену в одном или нескольких аминокислотных положениях 270, 322, 326, 327, 329, 313, 333 и/или 334 Fc-области.

25 Для увеличения периода сывороточного полувыведения антитела оно может включать связывающий рецептор реутилизации эпитоп в антителе (особенно антительный фрагмент) как описано, например,
30 в Патенте США № 5739277. Как использовано в данном описании термин «связывающий рецептор реутилизации эпитоп» относится к эпитопу Fc-области IgG молекулы (например, IgG₁, IgG₂, IgG₃ или
35 IgG₄), которая ответственна за увеличение in vivo периода сывороточного полувыведения IgG молекулы. Антитела с замещениями
40 в своей Fc-области и увеличенным периодом сывороточного полувыведения также описаны в WO 2000/42072 (Presta, L.).

45 Сконструированные антитела с тремя или более (предпочтительно четырьмя) функциональными антиген-связывающими сайтами также рассматриваются (США 2002/0004587 A1, Miller et al.).
50 al.).

V. Фармацевтические составы

Терапевтические составы антитела, применяемые в соответствии с настоящим изобретением, получены для хранения путем смешивания антитела, имеющего желаемую степень чистоты, с необязательными фармацевтически приемлемыми носителями, эксципиентами или стабилизаторами (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)) в форме лиофилизированных составов или водных растворов. Приемлемые носители, эксципиенты или стабилизаторы являются нетоксичными для реципиентов в применяемых дозах и концентрациях и включают в себя буферы, такие как фосфатный, цитратный и другие органические кислоты; антиоксиданты, включающие аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как октадецилметилбензил аммоний хлорид; гексаметоний хлорид; бензалконий хлорид; бензетоний хлорид; фенол, бутил или бензиловый спирт; алкил парабены, такие как метиловый или пропиловый парабен; катехол; резорцинол; циклогексано́л; 3-пентанол и м-крезол); низкомолекулярные (менее чем 10 остатков) полипептиды; 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, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатообразующие агенты, такие как ЭДТА; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; соль-формирующие счетные ионы, такие как натрий; металлические комплексы (например, Zn-протеиновые комплексы); и/или неионные сурфактанты, такие как TWEENTM, PLURONICSTM или

PEG.

Примерные анти-CD20-антительные составы описаны в WO
5 1998/56418. Эта публикация описывает жидкий мультидозовый
состав, содержащий 40 мг/мл ритуксимаба, 25 мМ ацетата, 150 мМ
трегалозы, 0,9% бензилового спирта, 0,02% POLYSORBATE™ 20
10 эмульгирующего агента при pH 5,0, который имеет минимальный срок
годности два года при температуре 2-8°C. Другой анти-CD20 состав,
15 представляющий интерес, включает 10 мг/мл ритуксимаба в 9,0
мг/мл натрия хлорида, 7,35 мг/мл дигидрата натрия цитрата, 0,7
мг/мл POLYSORBATE™ 80 эмульгирующего агента и Стерильную Воду
20 для Инъекции, pH 6,5.

Лиофилизированные составы, адаптированные для подкожного
25 введения, описаны, например, в Патенте США № 6267958 (Andya et
al.). Такие лиофилизированные составы могут быть восстановлены с
приемлемым разбавителем в высокой белковой концентрации, и
30 восстановленный состав может быть введен подкожно
млекопитающему, подвергнутому лечению согласно описанию.

Кристаллизованные формы антитела также рассматриваются.
35 См., например, US 2002/0136719A1 (Shenoy et al.).

Состав в данном описании может также содержать более чем
40 одно активное соединение (второе лекарственное средство) как
необходимый для отдельного показания, которое должно быть
подвергнуто лечению, предпочтительно с комплементарными
45 активностями, которые не влияют неблагоприятно друг на друга.
Например, может быть далее желательно обеспечить цитотоксический
50 агент (например, митоксантрон (NOVANTRONE®), метотрексат,
циклофосфамид, хлорамбуцил или азатиоприн), химиотерапевтический

агент, иммуносупрессивный агент, цитокин, антагонист цитокина или антитело, фактор роста, гормон (например, тестостерон или гормон-заместительную терапию), интегрин, антагонист интегрина или антитело (например, LFA-1-антитело, такое как эфализумаб/RAPTIVA®, коммерчески доступное от Genentech, или альфа-4-интегриновое антитело, такое как натализумаб/ANTEGREN®, доступное от Biogen, или другие, как указано выше), лекарственные средства интерферонового класса, такие как IFN-бета-1a (REBIF® и AVONEX®) или IFN-бета-1b (BETASERON®), олигопептид, такой как глатирамер ацетат (COPAXONE®), внутривенный иммуноглобулин (гамма-глобулин), лимфоцит-истощающее лекарственное средство (например, митоксантрон, циклофосфамид, CAMPATH™ антитела, анти-CD4 или кладрибин), нелимфоцит-истощающее иммуносупрессивное лекарственное средство (например, ММГ или циклоспорин), холестерин-понижающее лекарственное средство «статинового», класса, эстрадиол, лекарственное средство, которое лечит вторичные или связанные с волчанкой симптомы (например, спастичность, недержание, боль, утомление), ингибитор TNF, DMARD, NSAID, кортикостероид (например, метилпреднизолон, преднизон, дексаметазон или глюкокортикоид), левотироксин, циклоспорин А, соматостатиновый аналог, антиметаболит, другие антагонисты/антитела В-клеточной поверхности и т.п., в составе. Тип и эффективность количества таких других агентов (называемых в данном описании вторыми лекарственными средствами, где первым лекарственным средством является CD20-антитело) зависит, например, от количества антитела, представленного в составе, типа волчанки, которая

должна быть подвергнута лечению, и клинических параметров субъекта.

5 Активные ингредиенты также могут быть захвачены в микрокапсулы, полученные, например, с помощью методики коацервации или путем межфазной полимеризации, например, 10 гидроксиметилцеллюлозы или посредством желатиновых микрокапсул и поли-(метилметацилат) микрокапсул, соответственно, в коллоидных системах доставки лекарственных средств (например, липсомы, 15 альбуминовые микросферы, микроэмульсии, наночастицы и нанокапсулы) или в макроэмульсиях. Такие методики раскрыты, например, в *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16th edition, 20 Osol, A. Ed. (1980)).

25 Могут быть получены непрерывно высвобождаемые препараты. Подходящие примеры непрерывно высвобождаемых препаратов включают полупроницаемые матрицы твердых гидрофобных полимеров, 30 содержащих антитело, в которых матрицы находятся в виде формованных изделий, например, пленок или микрокапсул. Примеры непрерывно высвобождаемых матриц включают полиэферы, гидрогели 35 (например, поли(2-гидроксиэтилметакрилат) или поли(виниловый спирт)), полилактиды (Патент США № 3773919), сополимеры L-глутаминовой кислоты и γ -этил-L-глутамата, нерасщепляемый этилен-винилацетат, расщепляемые сополимеры молочной кислоты-гликолевой кислоты, такие как LUPRON DEPOTTM (инъецируемые 45 микросферы, составленные из сополимера молочной кислоты-гликолевой кислоты и лейпролидацетата) и поли-D-(-)-3-гидроксимасляную кислоту. 50

Составы, предназначенные для применения *in vivo*, должны

быть стерильными. Это легко достигается путем фильтрации через стерильные фильтрующие мембраны.

VI. Изделия производства

В другом варианте осуществления согласно изобретению предлагается изделие производства, содержащее материалы, применяемые для лечения волчанки, описанные выше. Предпочтительно изделие производства включает: а) контейнер, включающий композицию, включающую антитело, которое связывается с маркером В-клеточной поверхности (например, CD20-антителом) и фармацевтически приемлемым носителем или разбавителем в контейнере; и б) листовку-вкладыш с инструкциями по лечению волчанки у субъекта, где инструкции указывают, какое количество антитела вводят субъекту, которое является эффективным для обеспечения начального уровня антитела (около 0,5-4 граммов), затем второго введения антитела (около 0,5-4 граммов), причем второе введение производят не ранее чем примерно через 16-54 недели после начального введения, и каждое введение обеспечивают субъекту в виде разовой дозы или в виде двух или трех отдельных доз антитела.

Листовка-вкладыш находится на или связана с контейнером. Приемлемые контейнеры включают, например, бутылки, пробирки, шприцы, и т.п. Контейнеры могут быть сформированы из различных материалов, таких как стекло или пластик. Контейнер вмещает или содержит композицию, которая является эффективной для лечения волчанки, и может иметь стерильное доступное входное отверстие (например, пакет с раствором для внутривенного вливания или пробирка, имеющая пробку, поддающуюся прокалыванию с помощью

иглы для подкожной инъекции). По меньшей мере одним активным агентом в композиции являются антитело. Метка или листовка-вкладыш указывают, что композицию используют для лечения волчанки у субъекта, подходящего для лечения, со специфическим руководством относительно дозируемых количеств и интервалов антитела и любого другого предоставленного лекарственного средства. Изделие производства может далее включать второй контейнер, включающий фармацевтически приемлемый разбавляющий буфер, такой как бактериостатическая вода для инъекции (BWFI), забуференный фосфатным буфером солевой раствор, раствор Рингера и раствор декстрозы. Еще изделие производства может далее включать второй или третий контейнер, включающий второе лекарственное средство, где CD20-антитело является первым лекарственным средством, где изделие производства далее содержит инструкции на листовке-вкладыше по лечению субъекта вторым лекарственным средством. Примерные вторые лекарственные средства включают в себя химиотерапевтический агент, иммуносупрессивный агент, противомаларийный агент, цитотоксический агент, антагонист интегрина, антагонист цитокина или гормон. Предпочтительным вторым лекарственным средством является химиотерапевтический агент, противомаларийный агент или иммуносупрессивный агент, более предпочтительны гидроксихлороквин, хлороквин, квинакрин, циклофосфамид, преднизон, микофенолат мофетил, метотрексат, азатиоприн или 6-меркаптопурин. Более конкретно, если волчанка является SLE, такое второе лекарственное средство является предпочтительно кортикостероидом, таким как преднизон (необязательно наряду с

метотрексатом, гидроксихлороквином, хлороквином, квинакрином, MMF или азатиоприном с или без 6-меркаптопурина), и, если
5 волчанка является волчаночным нефритом, второе лекарственное средство является предпочтительно кортикостероидом, таким как преднизон, а также MMF или циклофосфамид. Изделие производства
10 может далее включать другие материалы, желательно из коммерческих источников и употребляемые стандартно, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы и шприцы. Далее детали
15 изобретения иллюстрированы следующими неограничивающими Примерами. Раскрытие всех ситуаций в описании изобретения специально включено в данное описание посредством ссылки.

Пример 1

Исследование эффективности и безопасности ритуксимаба у 25 субъектов с волчаночным нефритом ISN/RPS 2003 класса III или IV

В этом исследовании оценивают преимущество эффективности и
30 безопасности ритуксимаба (MABTHERA®/RITUXAN®), добавленного к микофенолат мофетилу (MMF) и кортикостероидам, по сравнению с
раздельным применением MMF плюс кортикостероиды, у субъектов с
35 активным волчаночным нефритом ISN/RPS 2003 класса III или IV. Ритуксимаб (1000 мг × 2) вводят внутривенно в двух начальных
40 дозах в дни 1 и 15 с в/в и оральными кортикостероидами, следующие по 1 г × 2 шесть месяцев. Эту экспериментальную схему
лечения (ритуксимаб, добавленный к MMF + кортикостероиды)
45 сравнивают с плацебо (плацебо, добавленное к MMF + кортикостероиды). Эта схема лечения симптоматики обычного
стандартного обслуживания на основе ритуксимаба исключает
50 обработку пациента CYTOXAN® циклофосфамидом (CYC) с его

известными токсическими свойствами и демонстрирует улучшенную суммарную клиническую пользу. Пациентов подвергают мониторингу на активность болезни, либо ренальную, либо экстраренальную, внезапные обострения болезни и эпизоды, связанные с безопасностью, в течение 52 недель исследования. Основной эффективной конечной точкой испытания являются 52 недели. Для безопасности последующее врачебное наблюдение необходимо вплоть до 12 месяцев после приема последней дозы ритуксимаба или В-клеточного восстановления, независимо от состояния больного.

Основной целью является определение пропорции пациентов, достигших или полного или частичного почечного ответа.

Полный почечный ответ определяют как:

1. нормальный креатинин или нормализация креатинина до базовой линии ($\pm 0,2$ мг/дл), если базовая линия креатинина ниже, чем диапазон нормальных значений;

2. неактивный мочевой осадок (как показано, <10 эритроцитов (RBC/высокая напряженность поля (HPF) и отсутствие эритроцитарных цилиндров);

3. отношение мочевого белка к креатинину $<0,5$.

Частичный почечный ответ определяется как:

1. стабильный ($\pm 10\%$ от данных скрининга) или улучшенный оцененный уровень гломерулярной фильтрации (GFR) (как рассчитано по уравнению Модификации Диеты при Почечной Болезни (MDRD);

2. отсутствие ухудшения мочевого осадка по отношению к базовой линии;

3. если отношение базовой линии мочевого белка к креатинину составляет $\leq 3,5$, затем наблюдают снижение протеинурии по

отношению мочевого белка к креатинину <1 , или если отношение базовой линии мочевого белка к креатинину составляет $>3,5$, затем
5 наблюдают снижение протеинурии на $\geq 50\%$ от нижнего уровня отношения мочевого белка к креатинину $3,5$.

Согласившиеся субъекты участвуют в скрининге периодом до 14
10 дней для определения приемлемости. После скрининга субъекты уже без MMF должны быть инициированы по 1500 мг/день в разделенных
15 дозах ($3\times$ /день). Все субъекты будут оттитрованы вплоть до мишенной дозы 3 г/день в разделенных дозах ($3\times$ /день) до 4 недели как толерантные. Если снижения в дозе необходимы, снижения будут
20 допускаться до снижения $250\text{--}500$ мг. При рандомизации субъектам после или продолжения или стимуляции MMF начнут давать
25 метилпреднизолон 1000 мг в/в только день через два дня и затем, начиная с 3 дня, пациентам начнут давать орально преднизон по
0,75 мг/кг/день, снижая по $10\text{--}15$ мг в день до 16 недели.
30 Субъекты будут получать или ритуксмаб или плацебо в 1 и 15 дни и 168 и 182 дни со 100 мг в/в метилпреднизолона 30–60 минут до
35 инфузий, даваемых в дни 15, 168 и 182. Субъекты, которые испытывают ухудшение почечной функции, могут быть отозваны и подвергнуты лечению по усмотрению Исследователя. Эти субъекты
40 будут считаться как неудачно подвергнутые лечению, но с последующим внимательным наблюдением безопасности отдаленных результатов.

45 Субъекты являются подходящими для исследования, если будут удовлетворять всем трем нижеизложенным критериям. Они:

50 – диагностированы как имеющие волчаночный нефрит ISN/RPS класса III или IV, что доказано почечной биопсией, сделанной в

течение 12 месяцев скрининга, показавшей <50% клубочков со склерозом;

5 - имеют активное заболевание, что доказано посредством протеинурии с отношением мочевого белка к креатинину >1,0 и или почечной биопсией в течение 3 месяцев скрининга, показавшей
10 волчаночный нефрит ISN/RPS 2003 класс III или IV, или активным мочевым осадком с >10 RBC/HPF или присутствием эритроцитарных
15 цилиндров;

 - имеют оцененный GFR (как рассчитано с помощью уравнения MDRD) ≥ 30 мл/мин за 12 недель до скрининга.

20 Определение количества В-клеток (CD19) оценивают по базовой линии в конце каждого курса ритуксимаб/плацебо и каждые 4 недели
25 после этого в течении всего исследования. Все определения количества В-клеток проводят в определенной спонсором
30 центральной лаборатории. В конце 78 недели субъекты, получавшие плацебо ритуксимаб или активный ритуксимаб, но показавшие
35 восстановление В-клеток, будут полностью участвовать в исследовании. Субъекты, получавшие ритуксимаб, но не показавшие
40 восстановления к норме В-клеток, будут наблюдаться до восстановления В-клеток, определенного по базовой линии или по
 низшему лимиту нормы, каким бы он ни был низким.

 После 52 недели, состояние субъектов может быть подходящим для инфузий ритуксимаба. Все субъекты, которые получали дозу
45 ритуксимаба после 52 недели, должны наблюдаться в течение 12 месяцев после последней дозы ритуксимаба или до восстановления
50 уровня В-клеток, каким бы он ни был.

 Предсказывается и ожидается, что введение ритуксимаба или

гуманизированного антитела 2H7 субъекту по методике, изложенной выше, будет уменьшать интенсивность одного или нескольких признаков, симптомов или других показателей волчаночного нефрита по сравнению с контролем. Также ожидается, что другая 2-г доза CD20-антитела, даваемая снова между 12 и 18 месяцами после начальной терапии CD20-антителом, или вся сразу или растянутая на примерно 14-16 дней в 1-граммовом количестве, должна быть эффективной в непрерывном ответе на начальную терапию или индуцировать другой полный/частичный ответ, если субъект испытывает внезапное обострение болезни с или без преднизона и/или других иммуносупрессивных агентов. Так CD20-антитело должно быть введено сначала в примерно 2-недельный период времени, за которым следует другое лечение в течение примерно 6 месяцев, за которым следует другое потенциальное лечение примерно от одного до полутора лет от начального лечения (измеренное от времени любой одной из данных доз) с предполагаемым успехом. Ожидается, что этот протокол повторного лечения будет успешно применен для лечения пролиферативного волчаночного нефрита.

Пример 2

Исследование оценки эффективности и безопасности ритуксимаба у субъектов с системной красной волчанкой в состоянии от умеренного до тяжелого

Это исследование оценивает эффективность и безопасность ритуксимаба (MAVThera®/RITUXAN®), добавленного к преднизону и одному дополнительному иммуносупрессанту (MMF, метотрексат (MTX), азатиоприн (AZA) или 6-меркаптопурин (6-MP), по сравнению

с плацебо у субъектов с активной SLE без активного гломерулонефрита, зарегистрированного в Фазе II/III испытания.

5 Субъектов могут оценить по проявлению тяжелого обострения волчанки как определено с помощью одного нового BILAG A-критерия или двух новых BILAG B-критериев и они будут получать начальную
10 пероральную схему лечения преднизонам 0,5 мг/кг/день, 0,75 мг/кг/день или 1,0 мг/кг/день, основанную на своих BILAG
15 индексах и преисследовательскую дозу преднизона в течение 7-дневного периода. Субъектов затем рандомизируют для получения ритуксимаба или плацебо и в день 16 будут инициировать
20 преднизонам, снижая в течение 10 недель до достижения дозы преднизона <10 мг/день. Субъектам будут продолжать снижать их дозу кортикостероида как толерантную к мишенной дозе ≤ 5 мг/день.
25 Субъектов подвергают мониторингу на активность болезни, применение дополнительных иммуносупрессантов, внезапные обострения болезни, применение преднизона и события, связанные с
30 безопасностью в течение 52 недель исследования. Основной эффективной конечной точкой испытания являются 52 недели.
35 Последующее изучение безопасности требует до 12 месяцев после последней дозы ритуксимаба или восстановления В-клеток, чтобы ни
40 произошло позднее.

Основной целью этого исследования является оценка эффективности ритуксимаба по сравнению с плацебо в достижении и
45 поддержании основного клинического ответа (MCR) или частичного клинического ответа (PCR) у субъектов с состоянием от умеренного до тяжелого системной красной волчанки (SLE), как определено с
50 помощью BILAG оценки. Клинические ответы должны быть

сгруппированы с помощью следующих трех взаимоисключающих категорий:

- субъекты, которые достигли MCR;
- субъекты, которые не достигли MCR, но достигли PCR;
- субъекты, которые не достигли или MCR или PCR (то есть неклинический ответ (NCR)).

MCR, PCR и NCR определены следующим образом:

- MCR: субъекты, которые достигли BILAG C индексов или лучших за 24 недели и поддерживают этот ответ без проявления внезапного обострения болезни (один или несколько новых доменов с BILAG A- или B-индексом) за 52 недели.

- PCR: субъекты, которые достигли BILAG C индексов или лучших за 24 недели и поддерживают этот ответ без проявления внезапного обострения болезни (один или несколько новых доменов с BILAG B-индексом) за 16 последующих недель или достигли максимума одного домена с BILAG B-индексом за 24 недели и поддерживают этот ответ без проявления внезапного обострения болезни (один или несколько новых доменов с BILAG B- или новым BILAG A-индексом) за 52 недели.

- NCR: все субъекты, которые испытывают тяжелое внезапное обострение болезни (один новый домен с BILAG A-индексом или два новых домена с BILAG B-индексом) с 1 дня до 24 недели, или любой субъект, который не удовлетворяет определению MCR или PCR, как определено выше.

Вторичные цели или измерение эффективности последствий в этом исследовании (сравнение ритуксимаба с плацебо) будет оценено следующим образом:

– способность ритуксимаба уменьшать общую активность SLE болезни по измерению время-регулируемой области под кривой минус базовая линия (AUCMB), рассчитанной по BILAG оценке в течение 52 недель;

– способность ритуксимаба индуцировать MCR (включая PCR) или PCR (включая MCR), как измерено, например, путем определения пропорции субъектов, которые достигли MCR (включая PCR) и пропорции субъектов, которые достигли PCR (включая MCR) на 52 неделе;

– безопасность и толерабельность ритуксимаба;

– способность обработанных ритуксимабом субъектов достигать BILAG C-индекса или лучшего на 24 неделе, измеренная, например, путем определения пропорции субъектов, которые достигли BILAG C-индекса или лучшего во всех доменах 24 недели;

– способность ритуксимаба пролонгировать время от умеренного до тяжелого внезапного обострения болезни свыше 52 недель;

– способность ритуксимаба улучшать качество жизни, измеренное с помощью индекса физической функции Расширенного Обследования Здоровья SLE от базовой линии 52 недели (SF-36-индекс с дополнительными элементами, специфичными для волчанки);

– умеренность в отношении кортикостероида у субъектов, получавших ритуксимаб, измеренный, например, путем определения пропорции субъектов, которые достигли MCR с <10 мг преднизона в день от 24 до 52 недели;

– фармакокинетика ритуксимаба у субъектов с SLE.

Давшие согласие субъекты участвуют в скрининговом периоде,

длительностью до 7 дней для определения приемлемости. У
субъектов должна присутствовать активная волчанка, определенная
по ACR критерию и одной новой BILAG категории «А» или двум новым
BILAG категории «В» критериям без доказательства активного
гломерулонефрита, хотя на фоне иммуносупрессанта. При скрининге
субъектов сначала лечат перорально преднизоном 0,5 мг/кг/день,
0,75 мг/кг/день или 1,0 мг/кг/день в течение 7 дней, на
основании начального индекса BILAG и пре-скрининговой дозы
кортикостероида. Приемлемых субъектов рандомизируют в отношении
2:1 для получения ритуксимаба 1000 мг в/в x 2 (дни 1, 15) плюс
снижение преднизона или плацебо ритуксимаба в/в эквивалент плюс
снижение преднизона в течение 52-недельного лечения и периода
наблюдения. Первая инфузия ритуксимаб/плацебо происходит в день
1 при второй инфузии, происходящей в день 15. Запланированное
снижение преднизона начинается при исследовании 16 дня и
пациентам фракционно снижают преднизон до 10 мг/день п/о в
течение 10 недель, за которым следует продолжительное снижение
до <5 мг/день к 52 неделе как толерантной. Исследовательский
персонал должен быть обучен, как правильно вводить ритуксимаб.
Субъекты могут быть госпитализированы для наблюдения, особенно
при первой инфузии по направлению Исследователя. Ритуксимаб
должен быть введен при строгом контроле, и полное реанимационное
оборудование должно быть в полной готовности. Всем субъектам
будут повторно вводить дозы или ритуксимаба или плацебо на 24 и
26 неделе. Кроме того, субъекты будут получать 100 мг в/в
солумедрола 30-60 минут перед каждой исследовательской
лекарственной (ритуксимаб или плацебо) инфузией.

Всех субъектов инструктируют для продолжения приема базовой иммуносупрессивной лекарственной терапии (например, MMF, AZA/6-MP, MTX), которая была представлена в скрининге, и для продолжения своей противомаларийной лекарственной терапии (по показаниям), а также своей базовой некортикостероидной SLE лекарственной терапии(й), на протяжении всего исследования без изменения, если только не получена инструкция лечащим Исследователем. NSAID будет показан для лечения болезни со слабой симптоматикой. Запросы о снижении иммуносупрессивного лекарственного средства должны быть обсуждены заранее с Медицинским Монитором. Следующая таблица показывает перечень противомаларийных агентов и диапазоны доз, предполагаемых для использования в течение хода испытания, если они показаны.

Противомаларийная лекарственная терапия	Диапазон доз (перорально)
Гидроксихлороквин	100-250 мг/день
Хлороквин	500 мг каждый день или каждый второй день
Квинакрин	100 мг каждый день

Субъекты, которые испытывают определенное протоколом от умеренного к тяжелому внезапное обострение SLE (безуспешное лечение), могут получать дополнительно лечение оральными кортикостероидами, если проведена оценка клинической адекватности исследователем. Эти субъекты могут быть повторно подвергнуты лечению преднизолом (0,5-1,0 мг/кг) на основании тяжести болезни. Кортикостероиды в/в в эквивалентных дозах могут быть разрешены, если поражение желудочно-кишечного тракта временно устранено оральными кортикостероидами. Субъекты,

которые испытывают внезапное обострение болезни, которое не отвечает на кортикостероиды, относятся к таковым без улучшения по своим BILAG A- или B-симптомам после 2 недель усиленного кортикостероидного лечения. Они будут подходить для зачисления на освобождение от лечения в открытом – маркированном длительном испытании по желанию субъекта и Исследователя. Субъектов, которых стимулируют новым иммуносупрессивным агентом или любым другим новым медикаментозным лечением SLE, будут группировать в безопасном периоде изучения отдаленных результатов испытания, и они не будут далее получать изучаемые лекарственные средства до начала второго этапа исследования схемы введения лекарств (6 месяцев).

Пациентов оценивают ежемесячно в течение 12 месяцев. Определение количества В-клеток оценивают по базовой линии в конце каждого курса инфузии ритуксимаб/плацебо и впоследствии каждые 4 недели на протяжении всего периода лечения/наблюдения. Все подсчеты В-клеток выполняют в центральной лаборатории и врачи должны затемнять свет при подсчете В-клеток. В конце 78 недели субъекты, которые получали ритуксимаб плацебо или ритуксимаб, и демонстрируют восстановление В-клеток, определенное по базовой линии или низшему лимиту нормы, каким бы он ни был низким, будут полностью участвовать в исследовании. Субъекты, получавшие ритуксимаб, но не показавшие восстановления В-клеток за 78 недель, будут наблюдаться до восстановления В-клеток.

Предсказывается и ожидается, что введение ритуксимаба или гуманизированного антитела 2H7 субъекту по протоколу,

изложенному выше, будет уменьшать интенсивность одного или нескольких признаков, симптомов или других показателей волчаночного нефрита по сравнению с контролем. Также ожидается, что другая 2-я доза CD20-антитела, даваемая снова между 12 и 18 месяцами после начальной терапии CD20-антителом, или вся сразу, или растянутая на примерно 14-16 дней в 1-граммовом количестве, должна быть эффективной в непрерывном ответе на начальную терапию или индуцировать другой полный/частичный ответ, если субъект испытывает внезапное обострение болезни с или без преднизона и/или других иммуносупрессивных агентов. Так CD20-антитело должно быть введено сначала в примерно 2-недельный период времени, за которым следует другое лечение в течение примерно 6 месяцев, за которым следует другое потенциальное лечение примерно от одного до полутора лет от начального лечения (измеренное от времени любой одной из данных доз) с предполагаемым успехом. Ожидается, что этот протокол повторного лечения будет успешно применен для лечения пролиферативного волчаночного нефрита.

Пример 3

Гуманизированные варианты антитела 2H7, применяемые в данном описании

Подходящими для целей данного описания являются гуманизированные антитела 2H7, включающие одну, две, три, четыре, пять или шесть следующих CDR-последовательностей:

CDR L1-последовательность RASSSVSYXH, где X является M или L (SEQ ID NO:18), например, SEQ ID NO:4 (Фиг. 1A),

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

CDR L3-последовательность QQWXFNPPT, где X является S или A (SEQ ID NO:19), например, SEQ ID NO:6 (Фиг. 1A),

5 CDR H1-последовательность SEQ ID NO:10 (Фиг. 1B),

CDR H2-последовательность AIYPGNGXTSYNQKFKG, где X является D или A (SEQ ID NO:20), например, SEQ ID NO:11 (Фиг. 1B), и

10 CDR H3-последовательность VVYYSSXXYWYFDV, где X в положении 6 является N, A, Y, W, или D и X в положении 7 является S или R (SEQ ID NO:21), например, SEQ ID NO:12 (Фиг.1B).

15 Вышеупомянутые CDR-последовательности обычно присутствуют в вариабельной легкой и вариабельной тяжелой каркасных последовательностях, таких как, в основном, человеческие консенсусные FR-остатки человеческой подгруппы I(V_L6I) легкой цепи каппа и, в основном, человеческие консенсусные FR-остатки 25 человеческой подгруппы III(V_HIII) тяжелой цепи. См. также WO 2004/056312 (Lowman et al.).

30 Вариабельная тяжелая область может быть соединена с человеческой константной областью IgG, где область может быть, например, IgG1 или IgG3, включая константные области нативной 35 последовательности и не нативной последовательности.

В предпочтительном варианте осуществления такое антитело 40 включает в себя вариабельную последовательность тяжелого домена SEQ ID NO:8 (v16, как показано на Фиг. 1B), необязательно также включает в себя вариабельную последовательность легкого домена 45 SEQ ID NO:2 (v16, как показано на Фиг. 1A), которая необязательно включает в себя одно или несколько аминокислотных замен в положениях 56, 100 и/или 100a, например, D56A, N100A или 50 N100Y и/или S100aR в вариабельном тяжелом домене, и одно или

несколько аминокислотных замен в положениях 32 и/или 92, например, M32L и/или S92A в переменном легком домене.

5 Предпочтительно антитело является интактным антителом, включающим в себя аминокислотную последовательность легкой цепи SEQ ID NO:13 или 16 и аминокислотную последовательность тяжелой
10 цепи SEQ ID NO:14, 15, 17 или 22, где SEQ ID NO:22 указана ниже.

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

Антитело в данном описании может далее включать по меньшей мере одно аминокислотная замена в Fc-области, которое улучшает
20 ADCC-активность, как например, активность, где аминокислотными заменами являются положения 298, 333 и 334, предпочтительно S298A, E333A и K334A, с применением Eu нумерации остатков
25 тяжелой цепи. См. также Патент США № 6737056, L. Presta.

Любое из этих антител может включать по меньшей мере одно
30 замещение в Fc-области, которое улучшает FcRn-связывание или сывороточное полувыведение, например, замена в положении 434 тяжелой цепи, такого как N434W. См. также Патент США № 6737056,
35 L. Presta.

Любое из этих антител может далее включать по меньшей мере
40 одно аминокислотная замена в Fc-области, которое улучшает CDC активность, например, включает по меньшей мере замена в положении 326, предпочтительно K326A или K326W. См. также Патент
45 США № 6528624, Idusogie et al.

Некоторые предпочтительные гуманизированные варианты
50 антитела 2H7 являются вариантами, включающими переменный легкий домен SEQ ID NO:2 и переменный тяжелый домен SEQ ID

NO:8, включая их с или без замен в Fc-области (если представлены) и варианты, содержащие переменный тяжелый домен с изменением в SEQ ID NO:8 N100A; или D56A и N100A; или D56A, N100Y и S100aR; и переменный легкий домен с изменением в SEQ ID NO:2 M32L; или S92A; или M32L и S92A.

M34 в переменном тяжелом домене 2H7.v16 был идентифицирован как потенциальный источник антителной стабильности, и является другим потенциальным кандидатом на замену.

Суммируя некоторые различные предпочтительные варианты осуществления согласно изобретению, установлено, что переменная область вариантов, основанных на 2H7.v16, включает аминокислотные последовательности v16, за исключением положений аминокислотных замен, которые показаны в Таблице 2 ниже. Если не указано особо, 2H7 варианты будут иметь легкую цепь, подобную таковой v16.

Таблица 2

Примерные варианты гуманизированного 2H7 антитела

2H7 версия	Изменения тяжелой цепи (V_H)	Изменения легкой цепи (V_L)	Изменения Fc
16 в ссылке			-
31	-	-	S298A, E333A, K334A
73	N100A	M32L	
75	N100A	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
588	-	-	S298A, E333A, K334A, K326A
511	D56A, N100Y, S100aR	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, K326A

Одно предпочтительное гуманизированное антитело 2H7

включает 2H7.v16 переменную последовательность легкого домена:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFSGSGSGTDF
TLTISSLQPEDFATYYCQQWSFNPPTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:2);

и 2H7.v16 переменную последовательность тяжелого домена:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSYNQKFKGR
FTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSNSYWFYFDVWGQGTILTVSS (SEQ ID NO:8).

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

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFSGSGSGTDF
TLTISSLQPEDFATYYCQQWSFNPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR
EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN
RGEC (SEQ ID NO:13);

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

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSYNQKFKGR
FTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSNSYWFYFDVWGQGTILTVSSASTKGPSVFPLAP
SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC
NVNHKPSNTIKVDKKVEPKSCDKTHTCTPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:15).

Другое предпочтительное гуманизированное антитело 2H7 включает 2H7.v511 переменную последовательность легкого домена:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFSGSGSGTDF
TLTISSLQPEDFATYYCQQWAFNPPTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:23)

и 2H7.v511 переменную последовательность тяжелого домена:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGATSYN
QKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSYRYWFYFDVWGQGTILTVSS (SEQ ID NO:24).

См. Фигуры 5 и 6, в которых выровнены зрелые легкая и
тяжелая цепи, соответственно, гуманизированного 2H7.v511 с
гуманизированным 2H7.v16.

Когда гуманизированное антитело 2H7.v31 является интактным
антителом, оно может включать аминокислотную последовательность
легкой цепи:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFSGSGSGTDF
TLTISSLQPEDFATYYCQQWAFNPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR
EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN
RGEC (SEQ ID NO:13)

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

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGATSYNQKFKGR
FTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSYRYWYFDVWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLA
PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI
CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNALPAPIAA
TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGS
FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:22).

Предпочтительным вариантом осуществления в данном описании
является вариант, в котором антитело является гуманизированным
антителом 2H7, включающим переменные последовательности домена
в SEQ ID NO:2 и 8. Другим предпочтительным вариантом
осуществления в данном описании является вариант, в котором
антитело является гуманизированным антителом 2H7, включающим
переменные последовательности домена в SEQ ID NO:23 и 24.

<110> GENENTECH, INC. et al.

<120> Способ лечения волчанки

<130> P2133R1 PCT

<140> PCT/US2005/019550

<141> 2005-06-02

<150> US 60/577,235

<151> 2004-06-04

<150> US 60/617,997

<151> 2004-10-11

<160> 24

<210> 1

<211> 107

<212> PRT

<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> PRT

<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
 5 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
 10
 <210> 3
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 15
 <220>
 <223> Последовательность синтезирована
 <400> 3
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 20 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
 25 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
 30 Tyr Asn Ser Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 95 100 105
 Ile Lys Arg
 35
 <210> 4
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Последовательность синтезирована
 40
 <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
 45
 <210> 5
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 50

<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> PRT

<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> PRT

<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> PRT

<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
 5 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
 10 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
 15 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> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Последовательность синтезирована

<400> 9
 25 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
 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
 35 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
 40 Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 110 115

<210> 10
 <211> 40
 <212> PRT
 <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
 5 Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
 35 40
 <210> 11
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 10 <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
 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
 20 <210> 12
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Последовательность синтезирована
 25 <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
 30 Gly Tyr Ser Leu Tyr Asp Tyr
 35
 <210> 13
 <211> 213
 <212> PRT
 <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
 40 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
 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
 50

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
 5 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
 10 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
 15 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
 20 Gly Glu Cys

<210> 14
 <211> 452
 <212> PRT
 25 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Последовательность синтезирована

<400> 14
 30 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
 35 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
 40 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
 45 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
 50 Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 140 145 150

	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
5	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
10	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
15	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
20	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
25	Tyr	Asn	Ser	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
30	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala 335	Pro	Ile	Glu	Lys	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
35	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
40	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
45	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> 15
 <211> 452
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность синтезирована

<400> 15

5

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

10

Glu Trp Val Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr
50 55 60Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser
65 70 75

15

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser
95 100 105

20

Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
110 115 120Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
125 130 135Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
140 145 150

25

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
155 160 165Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
170 175 180

30

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
185 190 195Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
200 205 210

35

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
215 220 225Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
230 235 240Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
245 250 255

40

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
260 265 270Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
275 280 285

45

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
290 295 300Tyr Asn Ala Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
305 310 315

50

5 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
 10 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
 20 Gly Lys

 <210> 16
 <211> 213
 <212> PRT
 25 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Последовательность синтезирована

 <400> 16
 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 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
 40 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
 45 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
 50

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> 17
 <211> 452
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Последовательность синтезирована

<400> 17
 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
5	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
10	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
15	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
20	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
25	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
30	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
35	Gly Lys					
	<210> 18					
	<211> 10					
	<212> PRT					
40	<213> Искусственная последовательность					
	<220>					
	<223> Последовательность синтезирована					
	<220> Не определена					
	<221>					
45	<222> 9					
	<223> X = M ИЛИ L					
	<400> 18					
	Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Xaa His					
		5				10
50	<210> 19					

5

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Последовательность синтезирована
 <220>
 <221> Не определена
 <222> 4
 <223> X = S или A

10

<400> 19
 Gln Gln Trp Xaa Phe Asn Pro Pro Thr
 5

15

<210> 20
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

20

<220>
 <223> Последовательность синтезирована
 <220>
 <221> Не определена
 <222> 8
 <223> X = D или A
 <400> 20
 Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Xaa Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 1 5 10 15
 Lys Gly

25

<210> 21
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

30

<220>
 <223> X = S или R
 <220>
 <221> Не определена
 <222> 6
 <223> X = N, A, Y, W, или D

35

<400> 21
 Val Val Tyr Tyr Ser Xaa Xaa Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
 5 10

40

<210> 22
 <211> 451
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

45

<220>
 <223> Последовательность синтезирована
 <400> 22
 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

50

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
 5 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
 10 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
 15 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
 20 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
 25 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
 30 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
 35 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
 40 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
 45 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
 50 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
 5 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
 10 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 440 445 450
 Gly

<210> 23
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Последовательность синтезирована

20 <400> 23
 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
 25 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
 30 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
 35 Lys Arg

<210> 24
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Последовательность синтезирована

45 <400> 24
 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

50

					35					40					45				
					Glu	Trp	Val	Gly	Ala	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asn	Gly	Ala	Thr	Ser	Tyr
					50									55					60
5					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
10					95									100					105
					Tyr	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val
					110									115					120
					Ser	Ser													

15

Формула изобретения

1. Способ лечения волчаночного нефрита у субъекта, включающий введение эффективного количества CD20-антитела субъекту для обеспечения начального уровня антитела от 0,5 до 4 г, затем второго введения антитела на уровне от 0,5 до 4 г, где второе введение производят не ранее чем через 16-54 недели после начального введения, и где каждое введение антитела производят субъекту в виде разовой дозы или в виде двух или трех отдельных доз антитела.

2. Способ по п.1, в котором

а) второе введение производят не ранее чем через 20-30 недель после начального введения;

б) второе введение производят не ранее чем примерно через 46-54 недели после начального введения;

каждое из начального и второго введения антитела обеспечивается в количестве от 1,5 до 3,5 г; и/или каждое из начального и второго введения антитела обеспечивается в количестве от 1,5 до 2,5 г.

3. Способ по п.1, дополнительно включающий в себя введение субъекту эффективного количества CD20-антитела для обеспечения третьего введения антитела на уровне от 0,5 до 4 г, где третье введение производят не ранее чем через 46-60 недель после начального введения, и третье введение антитела обеспечивается субъекту в виде разовой дозы или в виде двух или трех отдельных доз антитела.

4. Способ по п.3, в котором

а) третье введение антитела обеспечивается в количестве от 1,5 до 3,5 г;

б) третье введение антитела обеспечивается в количестве от 1,5 до 2,5 г;

с) третье введение производят не ранее чем через 46-55 недель после начального введения; и/или

д) третье введение антитела производят не ранее чем через 70-75 недель после начального введения, в частности, не ранее чем через 74-80 недель после начального введения.

5. Способ по п.1, где одно или несколько введений антитела обеспечивают субъекту в виде разовой дозы антитела, в частности, каждое введение антитела обеспечивают субъекту в виде разовой дозы антитела.

6. Способ по п.1, где одно или несколько введений антитела обеспечивают субъекту в виде отдельных доз антитела.

7. Способ по п.6, где каждое введение антитела обеспечивают в виде отдельных

доз антитела.

8. Способ по п.7, в котором

- а) отдельные дозы составляют первую и вторую дозу; или
- б) отдельные дозы составляют первую, вторую и третью дозу.

9. Способ по п.8, в котором

а) вторую или третью дозу вводят через 1-20 дней после введения предыдущей дозы;

б) вторую или третью дозу вводят через 6-16 дней после введения предыдущей дозы;

в) вторую или третью дозу вводят через 14-16 дней после введения предыдущей дозы;

г) отдельные дозы вводят в течение общего периода примерно от 1 дня до 4 недель, в частности, в течение общего периода примерно от 1 дня до 25 дней;

е) отдельные дозы вводят примерно еженедельно, причем вторую дозу вводят примерно через одну неделю после первой дозы, а любую третью дозу вводят примерно через одну неделю после второй дозы;

ф) каждая отдельная доза антитела составляет от 0,5 до 1,5 г; и/или

г) каждая отдельная доза антитела составляет от 0,75 до 1,3 г.

10. Способ по п.1 или 9, где субъекту производят от 4 до 20 введений антитела.

11. Способ по п.1, где введение второго лекарственного средства в эффективном количестве производят вместе с введением антитела, где CD20-антитело является первым лекарственным средством.

12. Способ по п.11, в котором

а) второе лекарственное средство вводят вместе с начальным введением;

б) второе лекарственное средство вводят вместе с начальным и вторым введениями;

в) второе лекарственное средство вводят вместе со всеми введениями;

г) вторым лекарственным средством является химиотерапевтический агент, иммуносупрессивный агент, противомаларийный агент, цитотоксический агент, антагонист интегрин, антагонист цитокина или гормон; и/или

е) в котором i) вторым лекарственным средством является иммуносупрессивный агент, противомаларийный агент или химиотерапевтический агент, и, в частности, иммуносупрессивный агент, противомаларийный агент или химиотерапевтический агент вводят вместе с начальным введением, при этом, в частности, вводят кортикостероид, метотрексат, циклофосфамид, гидроксихлороквин, хлороквин, квинакрин, азатиоприн, микофенолат мофетил или 6-меркаптопурин; и/или ii) иммуносупрессивный агент, противомаларийный агент или химиотерапевтический агент не вводят вместе со вторым введением или вводят в меньших количествах, чем вместе с начальным введением.

13. Способ по п.1, в котором

а) около 2 г CD20-антитела вводят в виде начального введения;

б) около 1 г CD20-антитела вводят примерно через две недели после введения следующего примерно 1 г антитела в качестве начального введения;

в) второе введение в количестве около 2 г производят примерно через шесть месяцев после начального введения;

г) второе введение в количестве около 1 г антитела, а затем примерно через две недели еще около 1 г антитела, производят примерно через шесть месяцев после начального введения;

е) вводят кортикостероид, в частности, кортикостероидом является метилпреднизолон или преднизон, или же оба этих средства, при этом, в частности, преднизон вводят в меньшем количестве вместе со вторым введением, чем вместе с начальным введением, или где преднизон не вводят вместе со вторым введением, или
 5 где преднизон вводят в меньшем количестве вместе со вторым введением, чем вместе с начальным введением, но не вводят при третьем и последующих введениях;

ф) вводят микофенолат мофетил; и/или

г) третье введение CD20-антитела производят через промежуток времени
 10 примерно от 1 года до 18 месяцев после начального введения.

14. Способ по п.1, в котором

а) субъекта никогда ранее не лечили CD20-антителом;

б) антителом является голое антитело или антитело конъюгировано с другой молекулой, при этом, в частности, другой молекулой является цитотоксический агент
 15 и/или

с) антитело вводят внутривенно, в частности, при каждом введении антитела, или антитело вводят подкожно, в частности, при каждом введении антитела.

15. Способ по любому из пп.1-9, 13 и 14, где субъекту для лечения волчаночного нефрита не вводят никакого другого лекарственного средства, кроме CD20-антитела.
 20

16. Способ по п.15, в котором

а) антителом является ритуксимаб;

б) антителом является гуманизированное антитело 2H7, содержащее последовательности SEQ ID NO:2 и 8 варибельного домена и/или
 25

с) антителом является гуманизированное антитело 2H7, содержащее последовательности SEQ ID NO:23 и 24 варибельного домена.

17. Способ по п.1 или 16, где субъект имеет повышенный уровень инфильтрирующих CD20-клеток, анти-нуклеарных антител (ANA), антител против двунитевых ДНК (днДНК), анти-Sm-антител, антинуклеарных
 30 рибонуклеопротеиновых антител, антифосфолипидных антител, антирибосомных Р-антител, анти-Ro/SS-A-антител, анти-Ro-антител или анти-La-антител, или же комбинацию из двух или нескольких таких клеток или антител.

18. Применение CD20-антитела для изготовления лекарственного средства для
 35 лечения волчаночного нефрита у субъекта, где эффективное количество CD20-антитела, вводимого субъекту, обеспечивает начальный уровень антитела от 0,5 до 4 г, затем при втором введении обеспечивает уровень антитела от 0,5 до 4 г, где второе введение производят не ранее чем через 16-54 недели после начального введения, и
 40 где каждое введение антитела производят субъекту в виде разовой дозы или в виде двух или трех отдельных доз антитела, и, в частности, антитело представляет собой антитело, определенное в любом из пп.2-17.

19. Изделие производства, включающее

а) контейнер, содержащий CD20-антитело; и

б) листовку-вкладыш с инструкциями по лечению волчаночного нефрита у субъекта, где в инструкциях указано, какое количество антитела вводят субъекту, которое является эффективным для обеспечения при начальном введении антитела
 45 уровня от 0,5 до 4 г, затем, при втором введении антитела, уровня от 0,5 до 4 г, где второе введение производят не раньше чем через 16-54 недели после начального введения, и каждое из введений антитела обеспечивается субъекту в виде разовой
 50 дозы или в виде двух или трех отдельных доз антитела.

20. Изделие производства по п.19, в котором

а) дополнительно включен контейнер, содержащий второе лекарственное средство, где CD20-антитело является первым лекарственным средством, и дополнительно содержащее инструкции на листовке-вкладыше по лечению субъекта вторым лекарственным средством, и в частности, вторым лекарственным средством является химиотерапевтический агент, иммуносупрессивный агент, противомаларийный агент, цитотоксический агент, антагонист интегрина, антагонист цитокина или гормон, и/или при этом, в частности, вторым лекарственным средством является химиотерапевтический агент, противомаларийный агент или иммуносупрессивный агент; и/или

б) вторым лекарственным средством является метилпреднизолон, преднизон, микофенолат мофетил, метотрексат, гидроксихлороквин, хлороквин, квинакрин, азатиоприн или 6-меркаптопурин.

Выравнивание последовательности вариабельного домена легкой цепи

		FR1		CDR1	
		10	20	30	40
2H7		QIVLSQSPAILSASPG	EKVTMTC	[RASSSVS-YMH]	WYQQKP
		* * * *	* * *		*
hu2H7.v16		DIQMTQSPSSLSASV	GDRVITTC	[RASSSVS-YMH]	WYQQKP
				* * * *	
hum KI		DIQMTQSPSSLSASV	GDRVITTC	[RASQISNYLA]	WYQQKP
		FR2		CDR2	
		50	60	70	80
2H7		GSSPKPWIY	[APSNLAS]	GVPARFSGSGSGT	SYSLTISRVEA
		** *		*	*** ****
hu2H7.v16		GKAPKPLIY	[APSNLAS]	GVPSRFSGSGSGT	DFTLTISLQP
		*	* * *		
hum KI		GKAPKLLIY	[AASSLES]	GVPSRFSGSGSGT	DFTLTISLQP
				CDR3	
				90	100
2H7		EDAATYYC	[QQWSFNPPT]	FGAGTKLELKR	
		*		* * *	
hu2H7.v16		EDFATYYC	[QQWSFNPPT]	FGQGTKVEIKR	
				*****	*
hum KI		EDFATYYC	[QQYNSLPWT]	FGQGTKVEIKR	

ФИГ.1А

Выравнивание последовательности вариабельного домена тяжелой цепи

		FR1		CDR1	
		10	20	30	40
2H7		QAYLQQSGAELVRPGASVKMSCKAS	[GYTFTSYNMH]	WVKQT	
		*** ** * * * * *		* *	
hu2H7.v16		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	[GYTFTSYNMH]	WVRQA	
			* * * *		
hum III		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	[GFTFSSYAMS]	WVRQA	
		FR2	CDR2	FR3	
		50 a 60	70	80	
2H7		PRQGLEWIG	[AIYPGNGDTSYNQKFKG]	KATLTVDKSSSTAYM	
		** *		** ** * * *	
hu2H7.v16		PGKGLEWVG	[AIYPGNGDTSYNQKFKG]	RFTISVDKSKNTLYL	
		* * * * *		* *	
hum III		PGKGLEWVA	[VISGDGGSTYYADSVKG]	RFTISRDNKNTLTL	
		CDR3	FR4		
		abc 90	100abcde	110	
2H7		QLSSLTSEDSAVYFCAR	[VVYYSNSYWYFDV]	WGTGTTVTVSS	
		** ** *		* *	
hu2H7.v16		QMNSLRAEDTAVYYCAR	[VVYYSNSYWYFDV]	WGQGTLLTVSS	
			***** * * *		
hum III		QMNSLRAEDTAVYYCAR	[GRVGYSLY---DY]	WGQGTLLTVSS	

ФИГ.1В Гуманизированная 2H7.v16 легкая цепь

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFSG
SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSFNPPFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS
GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHK
VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:13)

ФИГ.2

Гуманизированная 2H7.v16 тяжелая цепь

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSYNQK
FKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSNSYWFVDVWGQGTLVTVSSASTK
GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHY
TQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:14)

ФИГ.3

Гуманизированная 2H7.v31 тяжелая цепь

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSYNQK
FKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSNSYWFVDVWGQGTLVTVSSASTK
GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNATYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIAATISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHY
TQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:15)

ФИГ.4

Выравнивание легкой цепи

	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.5

Выравнивание тяжелой цепи

	1	
hu2H7.v16	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHW	

hu2H7.v511	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHW	
	37	52a
hu2H7.v16	VRQAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSL	82abc
	*****	*****
hu2H7.v511	VRQAPGKGLEWVGAIYPGNGATSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSL	
	83	100abcde
hu2H7.v16	RAEDTAVYYCARVVYYSNSYWFYFDVWGQGTTLVTVSS	113
	*****	*****
hu2H7.v511	RAEDTAVYYCARVVYYSYRYWFYFDVWGQGTTLVTVSS	
	118	
hu2H7.v16	ASTKGPSVFPLAPS	

hu2H7.v511	ASTKGPSVFPLAPS	
	132	
hu2H7.v16	SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS	

hu2H7.v511	SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS	
	182	
hu2H7.v16	LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA	

hu2H7.v511	LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA	
	232	
hu2H7.v16	PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG	

hu2H7.v511	PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG	
	282	
hu2H7.v16	VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP	
	*****	*****
hu2H7.v511	VEVHNAKTKPREEQYNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNAALPAP	
	332	
hu2H7.v16	IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW	
	* *****	
hu2H7.v511	IAATISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW	
	382	
hu2H7.v16	ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEA	

hu2H7.v511	ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEA	
	432	447
hu2H7.v16	LHNHYTQKSLSLSPGK	

hu2H7.v511	LHNHYTQKSLSLSPGK	

ФИГ.6