



**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)

R U 2 3 9 6 9 8 0 C 2

R U 2 3 9 6 9 8 0 C 2

**(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-

R U 2 3 9 6 9 8 0 C 2

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.

R U 2 3 9 6 9 8 0 C 2

<b>R U</b> <b>C 2</b> <b>9</b> <b>6</b> <b>9</b> <b>8</b> <b>0</b>	<p><b>RUSSIAN FEDERATION</b></p>  <p><b>FEDERAL SERVICE FOR INTELLECTUAL PROPERTY, PATENTS AND TRADEMARKS</b></p> <p><b>(12) ABSTRACT OF INVENTION</b></p> <p>(21), (22) Application: <b>2006146927/14, 02.06.2005</b></p> <p>(24) Effective date for property rights: <b>02.06.2005</b></p> <p>(30) Priority: <b>04.06.2004 US 60/577,235</b> <b>11.10.2004 US 60/617,997</b></p> <p>(43) Application published: <b>10.08.2008</b></p> <p>(45) Date of publication: <b>20.08.2010 Bull. 23</b></p> <p>(85) Commencement of national phase: <b>09.01.2007</b></p> <p>(86) PCT application: <b>US 2005/019550 (02.06.2005)</b></p> <p>(87) PCT publication: <b>WO 2005/120437 (22.12.2005)</b></p> <p>Mail address: <b>129090, Moskva, ul. B.Spasskaja, 25, str.3, OOO "Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery", pat.pov. E.E.Nazinoj, reg.№ 517</b></p> <hr/> <p><b>(54) METHOD OF TREATING LUPOUS</b></p> <p>(57) Abstract: FIELD: medicine.</p> <p>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.</p> <p>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.</p> <p>20 cl, 2 tbl, 6 dwg, 3 ex</p>	<p>(19) <b>RU (11) 2 396 980<sup>(13)</sup> C2</b></p> <p>(51) Int. Cl. <b>A61K 39/395</b> (2006.01) <b>A61P 37/00</b> (2006.01)</p> <p><b>R U</b>  <b>2</b>  <b>3</b>  <b>9</b>  <b>6</b>  <b>9</b>  <b>8</b>  <b>0</b>  <b>C 2</b></p>
--	--	--

Текст описания приведен в факсимильном виде.

**Область техники, к которой относится изобретение**

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

**Предшествующий уровень техники**

**Волчанка**

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

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

50

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 produцируют 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 20 также, возможно, связаны с расстройствами центральной нервной системы. Arbuckle *et al.* описывают выработку аутоантител до клинического начала SLE (Arbuckle *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 25 349(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 легкое, 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 курсы лечения пациентов, у которых была диагностирована SLE. С практической точки зрения врачи обычно применяют ряд сильных иммуносупрессивных лекарственных средств, таких как кортикостероиды в высокой дозе, например, преднизон или азатиоприн, или циклофосфамид, которые назначают в периоды внезапного обострения болезни, но могут также назначать постоянно тем, кто испытывает частые внезапные обострения болезни. Даже при эффективном лечении, которое ослабляет симптомы и увеличивает продолжительность жизни, многие из этих лекарств имеют потенциально неблагоприятные побочные эффекты у больных. Кроме того, эти иммуносупрессивные лекарственные средства препятствуют способности субъекта продуцировать все антитела, кроме аутореактивных антител против ДНК. Иммуносупрессанты также ослабляют защитные силы организма против других потенциальных патогенов, тем самым делая пациента крайне чувствительным к инфекции и другим потенциально летальным болезням, таким как рак. В некоторых случаях побочные эффекты распространенных лекарственных способов воздействия, сочетающиеся с длительной манифестацией болезни на низком уровне, могут вызвать тяжелое ухудшение и преждевременную смерть. Последние терапевтические схемы включают циклофосфамид, метотрексат, противомалярийные средства, гормональное лечение (например, DHEA) и противогормональную терапию (например, анти-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 (моноклональные антитела упоминаются в данном описании как анти-идиотипические антитела) и затем применения этих анти-идиотипических антител для удаления патогенных анти-ДНК-антител из организма пациента. Однако удаление больших количеств крови для лечения может быть опасным осложняющим процессом. Патент США № 6726909 раскрывает лечение SLE, где композиция антитела, вводимая пациенту, включает в себя очищенные анти-ДНК-анти-идиотипические антитела, и введение требует инъекции или другого эквивалентного способа введения.

Внутривенные вливания иммунного глобулина (IVIG) в высокой дозе также используют для лечения определенных аутоиммунных заболеваний. Вплоть до настоящего времени лечение SLE с помощью IVIG давало смешанные результаты, включая как разрешение 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.* 53:S164-169 (1989)).

#### **CD20-антитела и лечение с их помощью**

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-лимфоциты (Т-клетки). Лимфоцитами, представляющими особый интерес в данном описании, являются В-клетки.

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  
 5 специфичным, клетки начинают быстро делиться, и их потомство  
 дифференцируется в В-клетки памяти и эффекторные клетки,  
 названные «плазматическими клетками». В-клетки памяти имеют  
 10 более продолжительное время жизни и продолжают экспрессировать  
 мембраносвязанное антитело с такой же специфичностью, что и  
 исходная клетка. Плазматические клетки не продуцируют  
 15 мембраносвязанное антитело, но вместо этого продуцируют антитело  
 в форме, которая может быть секретирована. Секретированные  
 20 антитела являются основными эffекторными молекулами гуморального  
 иммунитета.

25 CD20-антigen (также называемый ограничивающим  
 дифференцировку В-лимфоцитов антигеном человека, Br35) является  
 гидрофобным трансмембранным белком с молекулярной массой  
 30 приблизительно 35 кД, локализованным на пре-В и зрелых В-  
 лимфоцитах (Valentine *et al.*, *J.Biol. Chem.* 264(19):11282-11287  
 35 (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)),  
 40 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  
 45 регулирует ранний этап(ы) активационных процессов стимуляции  
 клеточного цикла и дифференцировки (Tedder *et al.*, см. выше) и,  
 50 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 поверхности 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 поверхностью 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 мышьякским/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 низкозлокачественной 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 тимицина 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 сенсибилизирует 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 низкозлокачественной или фолликулярной CD20<sup>+</sup> В-клеточной NHL в дозе 375 мг/м<sup>2</sup>, по четыре дозы еженедельно. В апреле 2001 г. FDA утвердило дополнительные требования к лечению низкозлокачественной 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 иммunoупрессантом 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 пурпурой (D'Arena *et al.*, *Leuk. Lymphoma* 44:561-562 (2003); Stasi *et al.*, *Blood*, 98: 952-957 (2001); Saleh *et al.*, *Semin. Oncol.*, 27 (Supp 12):99-103 (2000); 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) PO5.128: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.*, 5 48(9):S439 (2003); Szczepanski *et al.*, *Arthritis Rheum.*, 10 48(9):S121 (2003). В общей сложности 161 пациента 15 рандомизировали на четыре группы, отличающиеся схемой лечения: метотрексат, отдельно ритуксимаб, ритуксимаб плюс метотрексат и ритуксимаб плюс циклофосфамид (СТХ). Лечебная схема ритуксимаба 20 составляла один грамм, вводимый внутривенно в дни 1 и 15. Инфузии ритуксимаба пациентам с RA хорошо переносились 25 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 30 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 35 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 40 инфекции в этой популяции пациентов с RA составила 4,66 на 100 пациентов-год, что ниже частоты инфекций, требующих госпитализации пациентов с RA (9,57 на 100 пациентов-год), по 45 данным широкомасштабного эпидемиологического исследования. Doran *et al.*, *Arthritis Rheum.* 46:2287-2293 (2002).

Представленный профиль безопасности ритуксимаба для 50 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 5 настоящее время испытании со спонсированием исследователя (IST) ритуксимаба в комбинации с интерфероном-Э(IFN-Э) или глатирамер- 10 ацетатом на пациентах с RRMS (Cross et al., см. выше) 1 из 10 подвергнутых лечению пациентов был госпитализирован для ночных наблюдения, с умеренной лихорадкой и ознобом, последовавшими за 15 первой инфузией ритуксимаба, тогда как остальные 9 пациентов закончили схему лечения из четырех инфузий без каких-либо отмеченных побочных эпизодов.

20 Патенты и патентные публикации, относящиеся к CD20-антителам и CD20-связывающим молекулам, включают Патент США № 5776456, 5736137, 5843439, 6399061 и 6682734, а также 25 US 2002/0197255, US 2003/0021781, US 2003/0082172, US 2003/0095963, US 2003/0147885 (Anderson et al.); Патент США № 30 6455043, US 2003/0026804 и WO 2000/09160 (Grillo-Lopez, A.); WO 2000/27428 (Grillo-Lopez & White); WO 2000/27433 и 35 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 & 40 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); 45 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 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 (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 A1 (Carr *et al.*); WO 2005/014618 (Chang *et al.*); US 2005/0079174 (Barbera-Guillem & Nelson); и US 2005/0106108 (Leung & Hansen).

Некоторые из них включают, среди прочего, лечение волчанки.

Публикации, относящиеся к лечению ритуксимабом, включают в 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 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.*, "Clinical outcome in 22 patients with rheumatoid arthritis treated with B lymphocyte depletion" Ann Rheum Dis, см. выше; Leandro *et al.*, "Lymphocyte depletion in rheumatoid arthritis: early evidence for safety, efficacy and dose response" Arthritis and Rheumatism 44(9): S370 (2001); Leandro *et al.*, "An open study of B lymphocyte depletion in systemic lupus erythematosus", Arthritis and Rheumatism, 46: 2673-2677 (2002), где в течение 2-недельного периода каждый пациент получал две 500-мг инфузии ритуксимаба, две 750-мг инфузии циклофосфамида и

высокую дозу оральных кортикоステроидов, и где двое из подвергнутых лечению пациентов перенесли рецидив через 7 и 8 месяцев, соответственно, и были повторно подвергнуты лечению, хоть и по другим схемам; "Successful long-term treatment of systemic lupus erythematosus with rituximab maintenance therapy" Weide et al., *Lupus*, 12: 779-782 (2003), где пациента лечили ритуксимабом ( $375 \text{ мг}/\text{м}^2 \times 4$ , повторяя через недельные интервалы), и далее аппликации ритуксимаба проводили каждые 5-6 месяцев, и затем давали поддерживающую терапию ритуксимабом  $375 \text{ мг}/\text{м}^2$  каждые три месяца, а второго пациента с резистентной SLE успешно лечили ритуксимабом, с проведением поддерживающей терапии ритуксимабом каждые три месяца; оба пациента хорошо отвечали на терапию ритуксимабом; Edwards & Cambridge, "Sustained improvement in rheumatoid arthritis following a protocol designed to deplete B lymphocytes" *Rheumatology* 40:205-211 (2001); Cambridge et al., "B lymphocyte depletion in patients with rheumatoid arthritis: serial studies of immunological parameters" *Arthritis Rheum.*, 46 (Suppl.9): S1350 (2002); Edwards et al., "B-lymphocyte depletion therapy in rheumatoid arthritis and other autoimmune disorders" *Biochem Soc. Trans.*, выше; Edwards et al., "Efficacy and safety of rituximab, a B-cell targeted chimeric monoclonal antibody: A randomized, placebo controlled trial in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism* 46(9): S197 (2002); Edwards et al., "Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis" *N. Engl. J. Med.* 350:2572-82 (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  
 5 (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-  
 10 refractory rheumatoid arthritis with rituximab." Представлен на Ежегодной Научной Конференции Американского Колледжа Ревматологии; октябрь 24-29; Новый Орлеан, Луизиана, 2002 г.;  
 15 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  
 20 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);  
 25 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:  
 30 45 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 4A, 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., "Responce of Wegener's granulomatosis to anti-CD20 chimeric monoclonal antibody therapy" *Arthritis and Rheumatism*, 44:2836-2840 (2001); реферат online приписывание и приглашение Koegh 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 Тolerантности, <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.,  
5 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  
10 diseases with ablative immunotherapy" Cohen & Nagler, *Autoimmunity Reviews*, 3 (2), p21-9 (Feb 2004); "A Phase I trial  
15 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);  
20 "Recent Advances in the Pathogenesis of Lupus Nephritis: Autoantibodies and B Cells" Sun Madaio, *Seminars in Nephrology*,  
25 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);  
30 "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  
35 rheumatic diseases" Hellmich & Gross, *Expert Opinion on Investigational Drug*, 12/10: 1713-1719 (2003); "Antibodies as therapeutic agents: Vive la renaissance!" Stockwin & Holmes,  
40 *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"  
45  
50

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  
10 *Arthritis Res Ther*, 5/4 (160-164) (2003); "Rituximab in lupus" Eisenberg *Arthritis Res Ther*, 5/4 см. выше; "Antibody therapy  
15 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,  
20 Autoimmunity, 36/1: 33-40 (2003); "BAFF: B cell survival factor and emerging therapeutic target for autoimmune disorders" Kalled  
25 et al., *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 7/1: 115-123 (2003); Upcoming biologic agents for the treatment of rheumatic diseases" Shanahan et al., *Current Opinion In Rheumatology*, 15  
30 (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  
35 nephritis with a protocol including rituximab" Fra et al., *Lupus*, 12 (10); 783-7 (2003); "B cell depletion therapy in systemic lupus erythematosus" Anolik et al., *Current  
40 rheumatology reports*, 5, (5), p350-356 (Oct 2003); "A prospective, open label trial of B-cell depletion with rituximab  
45 in refractory systemic lupus erythematosus" Smith & Jayne, *Journal of the American Society of Nephrology*, Том: 14, Номер:  
50 Реферативный выпуск, Страница: 380A, 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:  
5 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  
10 treatment of severe central nervous system neuropsychiatric  
systemic lupus erythematosus" Neuwelt *Therapeutic apheresis and  
dialysis-official peer-reviewed journal of the International  
15 Society for Apheresis, the Japanese Society for Apheresis, the  
Japanese Society for Dialysis Therapy* 7 (2): 173-82 (April  
20 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  
25 refractory autoimmune diseases with ablative immunotherapy using  
monoclonal antibodies and/or high dose chemotherapy with  
30 hematopoietic stem cell support" Cohen et al., *Current  
Pharmaceutical Design* 9 (3): 279-88 (2003); "The relationship of  
FcgammaRIIIa genotype to degree of B cell depletion by rituximab  
35 in the treatment of systemic lupus erythematosus" Anolik et al.,  
*Arthritis and rheumatism*, 48 (2): 455-459 (Feb 2003); Oelke  
40 *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  
45 *Current Opinion in Investigational Drugs*, 3/5: 725-734 (May 1,  
2002); Workshop report on some new ideas about the treatment of  
50 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  
5 (Nov 1, 2002); "Biological treatments for systemic lupus erythematosus" Isenberg & Leckie *Scandinavian Journal of Rheumatology*, 31/4: 187-191 (2002); "Novel therapeutic agents 10 for systemic lupus erythematosus" Gescuk & Davis Jr *Current Opinion in Rheumatology*, 14/5 (515-521) (2002); "Management of 15 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" 20 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*, 25 206, (5), p519-27 (Dec 2002); "Anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab) for life-threatening autoimmune haemolytic anaemia 30 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 35 Chemistry*, 56: 369-421 (2001); "B lymphocyte depletion as a novel treatment for systemic lupus erythematosus (SLE): Phase 40 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 45 refractory thrombocytopenia" Mehta et al., *Blood*, 98/11 Part 2:61b-62b (November 16 2001); Perotta et al., *Blood* 94:646, 50 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),  
5 pS283-5 (Nov 2003); "Anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab,  
RTX) therapy in hemodialysis (HD) patient (Pt) with severe  
10 systemic lupus erythematosis (SLE)" Valentine et al., Journal of  
American Society of Nephrology, Том: 13, Номер: Выпуск программа  
и рефераты, страница: 683A, Сентябрь 2002, "Anti-CD20 monoclonal  
15 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  
20 treatment of systemic lupus erythematosus with rituximab  
maintenance therapy" Weide et al., Lupus, 12 (10): 779-782  
25 (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  
30 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  
35 et al., Annals of the Rheumatic Diseases, 62/SUPPL. 2, pp. 55-59  
40 (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-  
45 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  
50 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" Sfikakis et al., *Arthrit. Rheumat.*, 52 5 (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.

10 Субъекты, пораженные волчанкой, такой как SLE, которые проявляют клинические признаки волчаночного нефрита, и субъекты 15 с волчаночным нефритом нуждаются в эффективном по стоимости и безопасности лечении, которое будет уменьшать интенсивность повреждения тканей, которое в конечном счете ведет к почечной 20 недостаточности и требует хронического гемодиализа и/или почечной трансплантации, вызванной их состоянием.

#### Сущность изобретения

25 Настоящее изобретение включает в себя, по меньшей мере частично, выбор дозы CD20-антитела, которая обеспечит безопасную 30 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 35 способу лечения волчанки у субъекта, включающему в себя введение эффективного количества CD20-антитела субъекту для обеспечения 40 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 45 начального введения, и каждое введение антитела обеспечивают субъекту в виде разовой дозы или в виде двух или трех отдельных доз антитела.

50 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 осуществляется вторым лекарственным средством является химиотерапевтический агент, иммуносупрессивный агент, 10 противомалярийное лекарственное средство, цитотоксический агент, антагонист интегрина, антагонист цитокина или гормон. В более предпочтительном варианте осуществляется вторым лекарственным средством является иммуносупрессивный агент, противомалярийный агент или химиотерапевтический агент. В другом предпочтительном 15 варианте осуществляется иммуносупрессивный агент, противомалярийный агент или химиотерапевтический агент вводят с начальной экспозицией. В других вариантах их вводят со второй 20 экспозицией и/или с последующими экспозициями и/или с начальной экспозицией, и предпочтительно со всеми экспозициями. В еще 25 более предпочтительном варианте осуществляния вводят кортикостероид, гидроксихлороквин, хлороквин, квинакрин, метотрексат, циклофосфамид, азатиоприн, мифефенолат мофетил или 30 6-меркаптопурин. В другом аспекте иммуносупрессивный агент, противомалярийный агент или химиотерапевтический агент не вводят 35 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 40 CD20-антителом.

В другом варианте осуществляния никакой другое 45 лекарственное средство, кроме CD20-антитела, не вводят субъекту 50 для лечения волчанки.

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

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

- а) контейнер, содержащий CD20-антитело; и
- б) пакет со вложенными инструкциями по лечению волчанки у субъекта, где в инструкциях указывается, что количество антитела, введенного субъекту, которое является эффективным для 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 примерно через 16-54 недели после начальной экспозиции, и каждая экспозиция антитела обеспечивается субъекту в виде разовой дозы или двух или трех отдельных доз антитела.

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

субъектов, во избежание, насколько это возможно, побочных 5 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.

10

### Краткое описание чертежей

ФИГ. 1А представляет собой последовательность, выровненную 15 по сравнению с аминокислотными последовательностями вариабельного домена ( $V_L$ ) легкой цепи каждой мыши 2H7 (SEQ ID NO:1), гуманизированного 2H7.v16 варианта (SEQ ID NO:2) и 20 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).

25

ФИГ. 1В представляет собой последовательность, выровненную по сравнению с аминокислотными последовательностями 30 вариабельного 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 35 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 40 CDR3 (SEQ ID NO:12).

Как показано на ФИГ. 1А и ФИГ. 1В, CDR1, CDR2 и CDR3 в 45 каждой цепи заключены в квадратные скобки, фланкированные каркасными областями FR1-FR4. 2H7 относится к мышенному 2H7-антителу. Звездочки между двумя рядами последовательностей 50 указывают на положения, которые различаются между двумя последовательностями. Остатки пронумерованы по Kabat *et al.*,

Sequences of Immunological Interest, 5<sup>th</sup> Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991), со вставками, показанными как а, б, с, д и е.

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 вариабельного домена и пронумерованными остатками Еи 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 вариабельного домена и пронумерованными остатками Еи 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, 2<sup>nd</sup> 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 негликазилированный 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 5 клетках. Другие наименования CD20 в литературе включают «антиген, ограничивающий В-лимфоциты», и «Bp35». Например, CD20- 10 антиген описан Clark *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 82:1766 (1985).

«CD22»-антиген, или «CD22», также известный как BL-CAM или 15 Lyb8, представляет собой тип 1 интегрального мембранныго гликопroteина с молекулярной массой примерно от 130 (укороченный) до 140 кД (неукороченный). Он экспрессируется и в 20 цитоплазме и В-клеточной мембране В-лимфоцитов. CD22-антиген появляется на ранних этапах дифференцировки В-клеточных 25 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 30 стадии между зрелыми В-клетками (CD22+) и плазматическими клетками (CD22-). CD22-антиген описан, например, у Wilson *et 35 al.*, *J. Exp. Med.* 173:137 (1991) и Wilson *et al.*, *J. Immunol.* 150:5013 (1993).

«Антителный антагонист» в данном описании представляет 40 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- 45 клеточным функциям, например, путем снижения или предотвращения гуморального ответа, обеспечиваемого В-клетками. Антитело-антагонист предпочтительно способно истощать В-клетки (то есть 50 снижать уровни циркуляции В-клеток) у обработанного им

млекопитающего. Такое истощение может быть достигнуто посредством различных механизмов, таких как антитело-зависимая 5 клеточно-опосредованная (ADCC) и/или комплемент-зависимая цитотоксичность (CDC), ингибирование В-клеточной пролиферации 10 и/или индукция гибели В-клеток (например, посредством апоптоза).

10 Термин «антитело» в данном описании используется в широком смысле и специфически относится к моноклональным антителам, 15 поликлональным антителам, мультиспецифическим антителам (например, биспецифическим антителам), образованным по меньшей 20 из мере двух интактных антител, и антительным фрагментам, поскольку они проявляют желаемую биологическую активность.

«Антительные фрагменты» включают в себя часть интактного 25 антитела, предпочтительно включая его антиген-связывающую область. Примеры антительных фрагментов включают в себя Fab-, Fab'-, F(ab')<sub>2</sub>- и Fv-фрагменты; диантитела; линейные антитела; 30 одноцепочечные молекулы антител и мультиспецифические антитела, образованные из антительных фрагментов.

В данном описании «интактное антитело» представляет собой 35 антитело, включающее в себя тяжелый и легкий вариабельные домены, а также Fc-область.

40 «Антитело, которое связывается с маркером В-клеточной поверхности», представляет собой молекулу, которая при связывании с маркером В-клеточной поверхности разрушает или 45 истощает В-клетки млекопитающего и/или препятствует одной или нескольким В-клеточным функциям, например, путем снижения или предотвращения гуморального ответа, обеспечиваемого В-клетками.

50 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, ингибирированием В-клеточной пролиферации и/или индукцией гибели В-клеток (например, посредством апоптоза). Предпочтительно 10 маркером В-клеточной поверхности является CD20, так что антитело, которые связывается с маркером В-клеточной 15 поверхности, является антителом, которое связывается с CD20 или «CD20-антителом».

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

или его варианты, такие как химерное или гуманизированное A20-антитело (cA20, 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.*, B: *Leukocyte Typing* 10 III (McMichael, Ed., p. 440, Oxford University Press (1987)).

Термин «ритуксимаб» или «RITUXAN®» в данном описании 15 относится к генноинженерному химерному мышенному/человеческому моноклональному антителу, направленному против CD20-антигена и обозначеному «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 вариабельную область ( $V_H$ ) Н-цепи по меньшей мере CDR H3 последовательности SEQ ID NO:12 (Фиг.1В) 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 NO:6 и, в основном, человеческие консенсусные каркасные (FR) 50 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<sub>H</sub>-последовательность SEQ ID NO:8 (v16, как показано на Фиг. 1В), необязательно также включая V<sub>L</sub>-последовательность SEQ ID NO:2 (V16, как показано на Фиг. 1А), 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 антителенный фрагмент, включающий вариабельную

последовательность легкой цепи:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRSGSGSGTDF  
5 TLTISSLQPEDFATYYCQQWSFNPPTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:2);

и последовательность вариабельной тяжелой цепи:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPNGDTSYNQFKGR  
10 FTISVDKSNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYYSNSYWYFDVWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:8).

Где гуманизированное антитело 2H7 является интактным

антителом, предпочтительно оно включает в себя аминокислотную

15 последовательность легкой цепи:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRSGSGSGTDF  
20 TLTISSLQPEDFATYYCQQWSFNPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV р  
EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTTLSKADYEHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN  
RGEC (SEQ ID NO:13);

и аминокислотную последовательность тяжелой цепи:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPNGDTSYNQFKGR  
25 FTISVDKSNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYYSNSYWYFDVWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAP  
SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAPLVQSSGLYSLSSV р  
NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV р  
30 DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV р  
SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV р  
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:14)

или аминокислотную последовательность тяжелой цепи:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPNGDTSYNQFKGR  
35 FTISVDKSNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYYSNSYWYFDVWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAP  
SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAPLVQSSGLYSLSSV р  
NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV р  
40 DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNATYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV р  
SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV р  
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:15).

45 В предпочтительном варианте осуществления согласно

изобретению V область вариантов, основанная на версии 16 2H7,

50 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

10

«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 Fc $\gamma$ RIII, тогда как моноциты экспрессируют Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII и Fc $\gamma$ RIII. Экспрессия FcR на гемопоэтических клетках суммирована в таблице 3 на стр. 464 Ravetch & Kinet *Appl. 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).

40

«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 нейтрофины, 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 5 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 10 1976) и *Kim et al., J. Immunol.* 24:249 (1994).

«Комплément-зависимая цитотоксичность», или CDC относится к 15 способности молекулы лизировать мишень в присутствии комплемента. Путь активации комплемента инициируется путем связывания первого компонента системы комплемента (C1q) с 20 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). 25

«Рост-ингибирующие» антитела представляют собой антитела, 30 которые предотвращают или снижают пролиферацию клетки, экспрессирующей антиген, с которым антитело связывается. Например, антитело может предотвращать или снижать пролиферацию 35 В-клеток *in vitro* и/или *in vivo*.

Антитела, которые «индуцируют апоптоз», представляют собой 40 антитела, которые индуцируют запрограммированную гибель клеток, например, В-клеток, что определяется стандартным анализом апоптоза, как, например, связывание аннексина V, фрагментация 45 ДНК, сморщивание клеток, расширение эндоплазматического ретикулума, фрагментация клеток и/или образование мембранных везикул (названных апоптотическими тельцами). 50

«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 вариабельного домена ( $V_H$ ), за которым следует ряд константных доменов. Каждая легкая цепь имеет вариабельный 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 вариабельный домен легкой цепи выровнен с вариабельным доменом тяжелой цепи. Полагают, что отдельные аминокислотные остатки образуют поверхность раздела между вариабельными доменами легкой цепи и тяжелой цепи.

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

себя четыре FR, в значительной степени принимающих конфигурацию  $\beta$ -листка, связанную с тремя гипервариабельными областями, которые 5 образуют петлевые соединения, и в некоторых случаях формируют 10 часть  $\beta$ -листковой структуры. Гипервариабельные области в каждой цепи удерживаются вместе в тесной близости с FR и с 15 гипервариабельными областями из других цепей, способствуя образованию антиген-связывающего сайта антител. (см. Kabat *et* 20 *al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5<sup>th</sup> Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Константные домены не вовлекаются непосредственно в 25 связывание антитела с антигеном, но проявляют различные эффекторные функции, такие как участие антитела в ADCC.

Лапаиновое переваривание антител продуцирует два идентичных 30 антиген-связывающих фрагмента, названных «Fab»-фрагментами, каждый с отдельным антиген-связывающим сайтом, и остаточный «Fc»-фрагмент, название которого отражает его способность легко 35 кристаллизоваться. Обработка пепсином приводит к получению F(ab')<sub>2</sub>-фрагмента, который имеет два антиген-связывающих сайта и сохраняет способность перекрестно-связывать антиген.

«Fv» представляет собой минимальный антителенный фрагмент, 40 который содержит полный антиген-распознающий и антиген-связывающий сайт. Эта область состоит из димера вариабельного 45 домена одной тяжелой цепи и одной легкой цепи в прочной нековалентной ассоциации. Он существует в такой конфигурации, в которой три гипервариабельных области каждого вариабельного 50 домена взаимодействуют, определяя антиген-связывающий сайт на поверхности димера V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>. 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 антителенного 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')<sub>2</sub>-антителные фрагменты сначала былиproduированы как пары Fab'-фрагментов, которые имеют между собой шарнирные цистеины. Также известны другие химические взаимодействия антителенных фрагментов.

«Легкие цепи» антител (иммуноглобулины) любых видов позвоночных могут быть приписаны к одному из двух четко различающихся типов, названныхkapпа ( $\kappa$ ) и лямбда ( $\lambda$ ), 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  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  и  $\mu$ , соответственно. Хорошо известны 5 субъединичные структуры и трехмерные конфигурации различных классов иммуноглобулинов.

«Одноцепочечные Fv» или «scFv»-антителенные фрагменты 10 включают  $V_H$ - и  $V_L$ -домены антитела, где эти домены представлены в отдельной полипептидной цепи. Предпочтительно Fv-полипептид 15 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. 20 Pluckthun в The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg & Moore eds., Springer-Verlag, New-York, pp. 269-315 25 (1994).

Термин «диантитела» относится к маленьким антителенным фрагментам с двумя антиген-связывающими сайтами, в которых 30 фрагменты включают в себя вариабельный домен ( $V_H$ ) тяжелой цепи, соединенный с вариабельным доменом ( $V_L$ ) легкой цепи в одной и той же полипептидной цепи ( $V_H-V_L$ ). С помощью линкера, который 35 является слишком коротким, чтобы допустить спаривание между двумя доменами на одной и той же цепи, домены вынуждены 40 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.*, 45 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993).

Термин «моноклональное антитело» в данном описании 50 относится к антителу, полученному из популяции по существу гомогенных антител, то есть индивидуальные антитела, образующие

этую популяцию, являются идентичными и/или связывают одинаковый эпитоп, за исключением возможных вариантов, которые могут возникнуть в процессе производства моноклонального антитела, такие варианты обычно представлены в незначительном количестве.

По сравнению с препаратами поликлональных антител, которые обычно включают в себя различные антитела, направленные против различных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело направлено против отдельной детерминанты на антигене. Кроме того, по своей специфичности моноклональные антитела имеют преимущество в том, что они не загрязнены другими

иммуноглобулинами. Модификатор «моноклональности» служит признаком антитела, полученного из существенно гомогенной популяции антител, и не подразумевает необходимости

производства антитела любым практическим способом. Например, моноклональные антитела для применения в соответствии с 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 основе рекомбинантной ДНК (см., например, Патент США № 4816567).

«Моноклональные антитела» могут быть также выделены из библиотек 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).

Моноклональные антитела в данном описании специфически включают в себя «химерные» антитела (иммуноглобулины), у которых 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 5 гомологичной соответствующим последовательностям антител, полученных из других видов или относящихся к другому классу или подклассу антител, а также фрагментов таких антител, поскольку 10 они проявляют желаемую биологическую активность (Патент США № 4816567; Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851- 15 6855 (1984)). Химерные антитела, представляющие интерес в данном описании, включают в себя «приматизированные» антитела, включающие в себя антиген-связывающие последовательности 20 вариабельного домена, полученные из примата-не-человека (например, низших узконосых обезьян, таких как павиан, макак-резус или яванский макак), и человеческие последовательности 25 константных областей (Патент США № 5693780).

«Гуманизированные» формы нечеловеческих (например, мышиных) 30 антител являются химерными антителами, которые содержат минимальную последовательность, полученную из нечеловеческого иммуноглобулина. Большой частью гуманизированные антитела 35 являются иммуноглобулинами человека (реципиентные антитела), в которых остатки из гипервариабельной области реципиента замещены 40 остатками из гипервариабельной области видов, отличных от человека (донорное антитело), таких как мышь, крыса, кролик или примат-не-человек, имеющими желаемую специфичность, аффинность и 45 способность. В некоторых случаях остатки каркасной области (FR) человеческого иммуноглобулина замещаются соответствующими 50 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 5 антител. Обычно гуманизированное антитело предпочтительно включает в себя в основном все, по меньшей мере одно и, типично, 10 два вариабельных домена, в которых все или в основном все гипервариабельные петли соответствуют таковым нечеловеческого 15 иммуноглобулина, и все или в основном все FR являются таковыми человеческой иммуноглобулиновой последовательности, за исключением FR замен как указано выше. Гуманизированное антитело 20 необязательно также может включать в себя по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина, обычно ту, что и у 25 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).

30 Термин «гипервариабельная область» в данном описании относится к аминокислотным остаткам антитела, которые 35 ответственны за антигенное связывание. Гипервариабельная область включает в себя аминокислотные остатки из «области, определяющей 40 комплементарность», или «CDR» (например, остатки 24-34 (L1), 50-56 (L2) и 89-97 (L3) в вариабельном домене легкой цепи и 31-35 (H1), 50-65 (H2) и 95-102 (H3) в вариабельном домене тяжелой 45 цепи; Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5<sup>th</sup> Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)) и/или эти остатки из 50 «гипервариабельной петли» (например, остатки 26-32 (L1), 50-52 (L2) и 91-96 (L3) в вариабельном домене легкой цепи и 26-32

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

5 «Каркасные» или «FR» остатки являются остатками вариабельного домена, отличающимися от остатков гипервариабельной 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.

20 «Изолированное» антитело представляет собой антитело, которое было идентифицировано и выделено и/или восстановлено из 25 компонента его природной окружающей среды. Загрязняющие 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 40 мере 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной 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 50 с использованием кумасси голубого, или предпочтительно серебристого красителя. Изолированное антитело включает в себя

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

«Субъект» в данном описании является субъектом человеческой природы. Обычно такой субъект подходит для лечения волчанки. Для целей данного описания таким подходящим субъектом является субъект, который испытывает или испытывал один или несколько признаков, симптомов или других признаков волчанки, или у него была диагностирована волчанка, или, например, вновь 10 диагностирована, предварительно диагностирована с новым внезапным обострением болезни, или при хронической стероидной 15 зависимости с новым внезапным обострением болезни, или с риском 20 развития волчанки. Субъект, подходящий для лечения волчанки, может необязательно быть идентифицирован как субъект, который 25 был подвергнут скринингу на предмет обнаружения повышенных 30 уровней инфильтрирующих CD20-клеток или скринингу с использованием способа детекции аутоантител, таких как антитела, 35 указанные ниже, где аутоантительная продукция оценивается 40 качественно и, предпочтительно, количественно. Образцами таких аутоантител, ассоциированных с SLE, являются анти-нуклеарные 45 антитела (ANA), антитела против двунитевой ДНК (днДНК), анти-Sm-антитела Ab, антитела против нуклеарных рибонуклеопротеинов, 50 анти-фосфолипидные антитела, антитела против рибосомных P, 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 существующими критериями (ACR) Американского Колледжа 15 Ревматологии. Активная болезнь может быть определена с помощью British Isles Lupus Activity Group's (BILAG) «A»-критериев или 20 двух BILAG «B»-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 30 сыпь или красные выпуклые петчи, светочувствительность, как, например, реакция на солнечный свет, приводящая к развитию или 35 увеличению кожной сыпи, оральные язвы, такие как язвы в носу или в полости рта, обычно безболезненные, артрит, такой как неэрозивный артрит, включающий два или несколько периферических 40 суставов (артрит, при котором кости, окружающие суставы, не разрушаются), серозит, плеврит или перикардит, почечное расстройство, такое как избыточный белок в моче (более чем 0,5 45 г/день или 3+ в тесте на клейкость) и/или клеточные цилиндры (аномальные элементы, полученные из мочи и/или лейкоцитов и/или 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 5 гематологические признаки, симптомы или другие показатели, такие как гемолитическая анемия или лейкопения (число лейкоцитов ниже 10 4000 клеток на кубический миллиметр) или лимфопения (менее чем 1500 лимфоцитов на кубический миллиметр), или тромбоцитопения (менее чем 100000 тромбоцитов на кубический миллиметр).  
10 Лейкопения и лимфопения должны быть детектированы в двух или 15 большем числе повторов. Тромбоцитопения должна быть детектирована в отсутствие лекарств, которые известны как ее 20 индукторы. Изобретение не ограничено этими признаками, симптомами или другими показателями волчанки.

«Лечение» субъекта в данном описании относится и к 25 терапевтическому лечению, и к профилактическим или превентивным мерам. Те, кто нуждается в лечении, включают тех, кто уже болеет 30 волчанкой, а также тех, у кого волчанка предотвращена. Следовательно, субъект может быть диагностирован как имеющий волчанку или как имеющий предрасположенность или 35 чувствительность к волчанке.

«Симптом» волчанки представляет собой любой болезненный 40 феномен или отклонение от нормы в структуре, функции или ощущении, испытанных субъектом и указывающих на болезнь.

Экспрессия «эффективного количества» относится к количеству 45 антитела, которое является эффективным для предотвращения, уменьшения интенсивности симптомов или лечения волчанки.

«Антителная экспозиция» в данном описании относится к 50 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 5 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 10 дней. Начальную и последнюю антительную экспозиции отделяют друг от друга во времени [введения антитела], как описано в деталях в 15 данном описании.

Термин «иммуносупрессивный агент», используемый в данном описании в отношении агентов для дополнительной терапии, 20 относится к веществам, которые действуют, вызывая супрессию или маскировку иммунной системы млекопитающего, подвергнутого лечению. Они включают в себя вещества, которые вызывают 25 супрессию выработки цитокинов, вызывают отрицательную регуляцию, или подавление, экспрессии аутоантигена или маскируют МНС-антитела. Примеры таких агентов включают в себя 2-амино-6-арил-30 5-замещенные пиримидины (см. Патент США № 4665077); нестероидные противовоспалительные лекарственные средства (NSAID); 35 ганцикловир, такролимус, глюкокортикоиды, такие как кортизол или альдостерон, противовоспалительные агенты, такие как ингибитор циклооксигеназы, ингибитор 5-липоксигеназы или антагонист 40 рецептора лейкотриена; пуриновые антагонисты, такие как азатиоприн или миофенолат мофетил (MMF); алкилирующие агенты, 45 такие как циклофосфамид; бромкриптин; даназол; дапсон; глутаральдегид (который маскирует МНС-антитела, как описано в 50 Патенте США № 4120649); антидиотипические антитела для МНС-антител и МНС-фрагментов; циклоспорин А; стероиды, такие как

кортикостериоиды или глюокортикостериоиды, или глюокортикоидные аналоги, например, преднизон, метилпреднизолон и дексаметазон;

5 дигидрофолатредуктазные ингибиторы, такие как метотрексат (перорально или подкожно); гидроксиклорохин; сульфасалазин;

10 лефлуномид; цитокиновые или цитокинрецепторные антитела, включая антитела против интерферона альфа, бета или гамма, антитела против фактора некроза опухолей-альфа (инфликсимаб или адалимумаб), анти-TNF-альфа-иммуноагезин (этанерцепт), антитела 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-Т-антитела, предпочтительно, анти-CD3- или анти-CD4/CD4a-антитела;

15 25 растворимый пептид, содержащий LFA-3-связывающий домен (WO 1990/08187, опубликованный 7/26/90); стрептокиназу; TGF-бета; стрептодорназу; РНК или ДНК хозяина; FK506; RS-61443; дезоксиспергуалин; рапамицин; Т-клеточной рецептор (Cohen *et al.*, Патент США № 5114721); фрагменты Т-клеточного рецептора (Offner *et al.*, *Science*, 251: 430-432 (1991); WO 1990/11294; Ianeway, *Nature*, 341:482 (1989); и WO 1991/01133); и Т-клеточнорецепторные антитела (EP 340109), такие как T10B9.

30 35 40

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

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

«Химиотерапевтический агент» представляет собой химическое соединение, применяемое для лечения рака. Примеры химиотерапевтических агентов включают в себя алкилирующие агенты, такие как тиотера и СУТОХАН® циклофосфамид; алкилсульфонаты, такие как бисульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбохион, метуредопа и уредопа; этиленимини и метиламеламины, включая альтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилентиофосфорамид и триметилоломеламин; ацетогенины (особенно, буллатацин и буллатацинон); камптотецин (включая синтетический аналог топотекан); бриостатин; каллистатин; СС-1065 (включая его синтетические аналоги адозелесин, карзелесин и бизелесин); криптофицины (особенно криптофицин 1 и криптофицин 8); доластатин; диокармицин (включая синтетические аналоги KW-2189 и CB1-TM1); элеутеробин; панкратистатин; саркодиктиин; спонгистатин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, холофосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлоретамин, гидрохлорид мехлоретаминоксида, мелфалан, новембицин, фенестерин, преднимустин, троfosфамид, урациловый иприт; нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин и ранимнастин; антибиотики, такие как енедииновые антибиотики (например, калихеамицин, особенно калихеамицин гамма I1 и калихеамицин омега I1 (см. Angew. Chem. Int'l. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)); динемицин, включая

динемицин А; бисфосфонаты, такие как клодронат; эсперамицин; а также неокарциностатиновый хромофор и родственные хромопротеиновые хромоформы енединовых антибиотиков, 5 аклациномизины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицин, кактиномицин, карабицин, карминомицин, карцинофилин, 10 хромомицинус, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, ADRIAMYCIN® доксорубицин (включая морфолино-15 доксорубицин, цианоморфолино-доксорубицин, 2-пирролино-доксорубицин и дезоксидоксорубицин), эпирубицин, экорубицин, идарубицин, марцелломицин, митомицины, такие как митомицин С, 20 миофеноловая кислота, ногаломицин, оливомицин, пепломицин, потфиромицин, пиромицин, квеламицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, юбенимекс, зиностатин, зорубицин; 25 антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметрексат; пуриновые аналоги, такие как 30 флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; пиrimидиновые аналоги, такие как анцитабин, азацитидин, 6-азауридин, кармоур, 35 цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин; андрогены, такие как калустерон, дромостанолона 40 пропионат, эпитетиостанол, мепитиостан, тестолактон; потивонадпочечниковые средства, такие как аминоглутетимид, митотан, трилостан; наполнители фолиевой кислоты, такие как 45 фролиновая кислота; ацеглатон; альдофосфамида гликозид; аминолевулиновая кислота; энилурацил; амсакрин; бестрабуцил; 50 бисантрен; эдатраксат; дефофамин; демеколцин; диазихион; элфорнитин; эллиптиния ацетат; эпотилон; этоглюцид; галлия

нитрат; гидроксимочевина; лентинан; лониданин; мейтансиноиды, такие как мейтансин и ансамитоцины; митогуазон; митоксанtron; 5 мопиданмол; нитраерин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; лозоксанtron; подофиллиновая кислота; 2-этилгидразид; прокарбазин; PSK® полисахаридный комплекс (JHS Natural Products, 10 Eugene, OR); разоксан; ризоксин; сизофиран, спирогерманиум; тенуазоновая кислота; триазиквон; 2,2',2''-трихлортриэтиламин; 15 трихотецины (особенно Т-2 токсин, верракурин А, роридин А и ангуидин); уретан; виндесин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид 20 (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, Schaumberg, Illinois) и TAXOTERE® 30 доксетаксел (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France); хлоранбуцил; GEMZAR® гемцитабин; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платины, такие как цисплатин и карбоплатин; винblastин; 35 платина; этопозид (VP-16); ифосфамид; митоксанtron; 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, тамоксиfen (включая NOLVADEX® тамоксиfen), ралоксиfen, 5 дролоксиfen, 4-гидрокситамоксиfen, триоксиfen, кеоксиfen, LY117018, онапристон и FARESTON® торемифен; ароматазные ингибиторы, которые ингибируют фермент ароматазу, который 10 регулирует продукцию эстрогенов в надпочечниках, таких как, например, 4(5)-имидазолы, аминоглутетимид, MEGASE® мегестрола 15 ацетат, AROMASIN® экземестан, форместан, фадрозол, RIVISOR® ворозол, FEMARA® летрозол и ARIMIDEX® анастровол; и анти-андрогены, такие как флутамид, нилутамид, бикалутамид, лейпролид 20 и госерелин; а также троксаситабин (1,3-диоксолановый аналог цитозинового нуклеозида); антисмыловые олигонуклеотиды, 25 особенно те, которые ингибируют экспрессию генов сигнальных путей, вовлеченных в аномальную клеточную пролиферацию, такие как, например, РКС-альфа, Raf и H-Ras; вакцины, такие как 30 генотерапевтические вакцины, например, ALLOVECTIN® вакцина, 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 $\alpha$ , 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- $\alpha$  или TNF- $\beta$ ; 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 5 последовательностей цитокинов, включая синтетически полученные части маленьких молекул и их фармацевтически приемлемые производные и соли.

10 Термин «гормон» относится к полипептидным гормонам, которые обычно секретируются гlandулярными органами через протоки. В 15 гормоны включены, например, гормон роста, такой как гормон роста человека, N-метиониловый гормон роста человека и гормон роста крупного рогатого скота; паратиреоидный гормон; тироксин; 20 инсулин; проинсулин; релаксин; прорелаксин; гликопротеиновые гормоны, такие как фолликулостимулирующий гормон (FSH), 25 тиреотропный гормон (TSH) и лютеинизирующий гормон (LH); пролактин, плацентарный лактоген, гонадотропин-ассоциированный пептид мыши, ингибин; активин; мюллеровское ингибирующее 30 вещество и тромбопоэтин. Как использовано в данном описании, термин гормон включает белки из естественных источников или из рекомбинантной клеточной культуры и биологически активные 35 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; 45 фактор роста фибробластов; фактор роста сосудистого эндотелия; фактора роста нервов, такой как NGF- $\beta$ ; полученный из тромбоцитов 50 фактор роста; трансформирующие факторы роста (TGF), такие как TGF- $\alpha$  и TGF- $\beta$ ; инсулиноподобный фактор роста-I и II;

эритропоэтин (EPO); остеоиндуктивные факторы; интерферины, такие как интерферон- $\alpha$ , - $\beta$  и - $\gamma$ ; и колониестимулирующие факторы (CSF), такие как колониестимулирующий (CSF) фактор макрофагов (M-CSF); колониестимулирующий фактор (CSF) гранулоцитов-макрофагов (GM-CSF) и колониестимулирующий фактор (CSF) гранулоцитов (G-CSF).

Как использовано в данном описании, термин «фактор роста» включает белки из природных источников или из рекомбинантной клеточной культуры и биологически активные эквиваленты нативной последовательности фактора роста, включая синтетически полученные части маленьких молекул и их фармацевтически приемлемые производные и соли.

Термин «интегрин» относится к рецепторному белку, который 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 клеток и апоптоз. Интегрины являются частью большого семейства рецепторов клеточной адгезии, которые вовлечены во взаимодействие клеток с внеклеточным матриксом и в межклеточное взаимодействие. Функциональные интегрины состоят из двух трансмембранных гликопротeinовых субъединиц, названных альфа и бета, которые являются нековалентно связанными. Все альфа-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 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, ибuprofen, 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<sup>®</sup>) коммерчески доступный от Genentech, или альфа-4-интегриновое антитело, такое как натализумаб (ANTEGREN<sup>®</sup>), 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 дизинтегрина (США 2002/0042368), антитела к альфа-бета-3 интегрину (ЕР 633945), производные бициклических аминокислот с аза-мостиком (WO 2002/02556), и т.п.

«Кортикоид» относится к любому из нескольких синтетических или природно встречающихся веществ с общей химической структурой стероидов, которые имитируют или увеличивают эффекты природных кортикоидов. Примеры синтетических кортикоидов 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  
 15 чем одна доза была введена в этой экспозиции. Например, когда две дозы вводят в начальной экспозиции, вторую экспозицию не проводят ранее чем по меньшей мере примерно через 16-54 недели,  
 20 отсчитанные от времени первой или второй дозы, введенной до этой 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.

«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 антителной 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 антителная экспозиция обеспечивается как разовая доза антитела. В альтернативном

варианте осуществления каждая антительная экспозиция обеспечивается в виде раздельных доз антитела. Однако не каждая 5 антительная экспозиция требует разовой дозы или раздельных доз.

Антитело может быть голым антителом или может быть 10 конъюгировано с другой молекулой, такой как цитотоксический агент, 15 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 вариабельного домена) или 20 HUMAX-CD20<sup>TM</sup>-антитело (Genmab), более предпочтительно, ритуксимаб или гуманизированное антитело 2H7.

В одном варианте осуществления субъект никогда не был ранее 25 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 30 лечению CD20-антителом). В другом варианте осуществления субъект был ранее подвергнут лечению лекарственным средством(ами) для 35 лечения волчанки и/или был ранее подвергнут лечению таким антителом. В другом варианте осуществления CD20-антитело 40 является только лекарственным средством, вводимым субъекту для лечения волчанки. В другом варианте осуществления CD20-антитело является одним из лекарственных средств, применяемых для лечения 45 волчанки. В другом варианте осуществления субъект не имеет ревматоидного артрита. Еще в другом варианте осуществления 50 субъект не имеет множественного склероза. Еще в другом варианте осуществления субъект не имеет аутоиммунного заболевания,

отличающегося от волчанки. Для целей самого последнего высказывания «автоиммунное 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 15 ухудшается посредством продуцирования В-клетками антител, 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 аутоантigена (например, нуклеарного 25 антигена).

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

различных способов введения. В одном варианте осуществления каждой экспозиции дается путем внутривенного введения. В другом варианте осуществления каждой экспозиции 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 дифенгидрамином 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, противомалярийный 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, САМРАТН™ антитела, анти-CD4-кладрибин, полное облучение тела, трансплантация костного мозга), кортикостероидом (например, метилпреднизолон, преднизон, такой как низкодозовый преднизон, дексаметазон или глюокортикоид, например, посредством внутрисуставной инъекции, включая системную 10 кортикостероидную терапию), не-лимфоцит-истощающей иммуносупрессивной терапией (например, MMF или циклоспорин), холестерин-понижающим лекарственным средством «статинового», 15 класса (которое включает серивастиatin (BAYCOL™), флувастиatin (LESCOL™), аторвастиatin (LIPITOR™), ловастатин (MEVACOR™), 20 правастатин (PRAVACHOL™) и симвастиatin (ZOCOR™)), эстрadiолом, тестостероном (необязательно в повышенных дозах; Stuve *et al.*, 25 *Neurology* 8:290-301 (2002)), гормон-заместительной терапией, противомалярийным лекарственным средством, таким как, например, гидроксихлороквин, хлороквин или квинакрин, лечением симптомов, 30 вторичных или связанных с волчанкой (например, спастичность, недержание, боль, утомление), ингибитором TNF, DMARD, NSAID, анти-интегриновым антителом или антагонистом, плазмаферезом, 35 левотироксином, циклоспорином А, соматостатиновым аналогом, цитокином, анти-цитокиновым антагонистом или антителом, 40 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 45 средством, включают в себя химиотерапевтический агент, цитотоксический агент, антиинтегрин, противомалярийное 50

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

30 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  
 35 примененных доз. Если такие вторые лекарственные средства  
 применяют полностью, предпочтительно они применяются в более  
 40 низком количестве, чем если бы CD20-антитело не было  
 представлено, особенно при последующих дозировках выше начальной  
 дозы антитела, так, чтобы элиминировать или снизить побочные  
 45 эффекты, вызванные терапией.

Когда второе лекарственное средство вводят в эффективном  
 50 количестве с антителной 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 иммunoсупрессивный агент, противомалярийный агент или химиотерапевтический агент вводят с начальной экспозицией, более предпочтительно, кортикостероид, метотрексат, циклофосфамид, гидроксихлороквин, хлороквин, квинакрин, азатиоприн, миофенолат мофетил или 6-меркаптопурин. В другом аспекте иммunoсупрессивный агент, противомалярийный 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 5 экспозицией.

Если волчанка является волчаночным нефритом, предпочтительно около 2-3 граммов CD20-антитела вводят в виде 10 начальной экспозиции, более предпочтительно, около 2 граммов. В другом предпочтительном варианте осуществления, если вводят 15 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 20 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 25 месяцев после начальной экспозиции и вводят в количестве около 2 граммов. Еще в другом варианте осуществления вторую экспозицию 30 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 40 и/или вместе с CD20-антителом. Предпочтительно субъект в/в получает метилпреднизолон около 1000 мг ежедневно в течение двух 45 дней на первую антителную экспозицию. Для первой антителной экспозиции это лечение является предпочтительным, за которым следует перорально преднизон в начальной дозе около 0,75 50 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.

5      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  
10     преднизон вводят в более низком количестве со второй экспозицией, чем применяют в начальной экспозиции, но не вводят  
15     в третьей и последующих экспозициях. Дополнительно или альтернативно MMF предпочтительно вводят с начальной антителной экспозицией с сопутствующим введением MMF и кортикоステроида, 20     являющимися особенно предпочтительными. Предпочтительно MMF дают сначала с CD20-антителом около 1500 мг/день в разделенных дозах  
25     (3×/день) и субъекта титруют вплоть до мишениной дозы около 3 г/день в разделенных дозах (3×/день) к примерно 4 неделе как толерантного. Если уменьшение дозы необходимо, допускается  
30     снижение дозы примерно на 250-500 мг. В другом аспекте циклофосфамид может быть введен субъекту с или без кортикостеоида в начальной антителной экспозиции. Если вводят  
35     циклофосфамид, его предпочтительно не вводят со второй экспозицией или вводят со второй экспозицией, но в более низком количестве, чем в начальной экспозиции. Также предпочтительно, 40     если циклофосфамид не вводят с третьей и последующими экспозициями.

45     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 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 экспозиции и вводят около 1 грамма антитела примерно через две недели после другого примерно 1 грамма антитела.

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

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 дозы преднизона в течение 7-дневного периода. Примерно на 16

день после начального введения CD20-антитела субъектам 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

кортикостериоида как толерантные к мишенней дозе, меньшей или равной около 5 мг/день. Еще более предпочтительным является

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 вводят в более низком количестве со второй экспозицией, чем

применяют с начальной экспозицией, но не вводят в третьей и последующих экспозициях. В другом предпочтительном аспекте в

дополнение к преднизону вводят противомалярийное лекарственное

средство, такое, например, как гидроксихлороквин, хлороквин или квинакрин, или метотрексат, миофенолат мофетил, азатиоприн или 5 6-меркаптопурин. Оно может быть введено в течение одной или нескольких экспозиций, как, например, начальной или второй 10 экспозиции, или последующей экспозиции или в течение всех 15 экспозиций. В таком варианте осуществления противомалярийное лекарственное средство метотрексат, миофенолат мофетил, 20 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 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-антigen, 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 50 получения антител, должны быть очевидны для специалистов в 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 адьюванта. Это может быть использовано для конъюгации релевантного антигена с белком, 15 который является иммуногенным для видов, которые предполагается иммунизировать, например, гемоцианином блюдечка, сывороточным альбумином, тиреоглобулином крупного рогатого скота или соевым 20 ингибитором трипсина с использованием бифункционального или производного агента, например, сложного эфира малеимидобензоилсульфосукцинида (конъюгация через цистеиновые 25 остатки), N-гидрокисукцинида (через лизиновые остатки), глутаральдегида, янтарного ангидрида,  $\text{SOCl}_2$ , или  $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ , где  $\text{R}$  30 и  $\text{R}^1$  являются различными алкильными группами.

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

антигена, но конъюгированного с другим белком и/или через другой  
 5 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.

10 (ii) Моноклональные антитела

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

Например, моноклональные антитела могут быть получены с  
 30 использованием гибридомного способа, впервые описанного Kohler  
<sup>35</sup> 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-  
 40 хозяин, такое как хомячок, иммунизируют как описано выше для  
 извлечения лимфоцитов, которые производят или способны  
 45 производить антитела, которые будут специфически связываться с  
 белком, используемым для иммунизации. В качестве альтернативы  
 лимфоциты могут быть иммунизированы *in vitro*. Лимфоциты затем  
 50 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)).

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

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

Культуральную среду, в которой гибридомные клетки

выращивают, анализируют для продуцирования моноклональных антител, направленных против антигена. Предпочтительно 5 специфичность связывания моноклональных антител, продуцируемых гибридомными клетками, определяют путем иммунопреципитации или 10 путем *in vitro* анализа связывания, такого как радиоиммуноанализ (RIA) или иммуноабсорбентный анализ с ферментной меткой (ELISA).

Аффинность связывания моноклонального антитела может быть, 15 например, определена посредством анализа Скэтчарда по Munson *et al.*, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

После идентификации гибридомных клеток, которые продуцируют 20 антитела желаемой специфичности, аффинности и/или активности, 25 клонь 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 30 целей включает, например, D-MEM или RPMI-1640 среду. Кроме того, гибридомные клетки могут быть выращены *in vivo* как асцитные 35 опухоли у животных.

Моноклональные антитела, секретируемые субклонами, выделяют 40 из культуральной среды, асцитной жидкости или сыворотки с помощью стандартных методик очистки иммуноглобулина, таких как, например, белок A-SEPHAROSE™, сшитый с агарозой, хроматографии с 45 гидроксиапатитом, гель-электрофореза, диализа или аффинной хроматографии.

ДНК, кодирующую моноклональные антитела, легко выделяют и 50 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*, обезьячьи клетки COS, клетки яичника китайского хомячка (CHO) или миеломные клетки, которые иначе не производят 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 Plückthun, *Immunol. Revs.*, 130:151-188 (1982).

В дальнейшем варианте осуществления антитела или антителные 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 производование 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

моно克лональных антител.

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

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

(iii) Гуманизированные антитела

Способы гуманизации нечеловеческих антител были описаны в данной области. Предпочтительно гуманизированное антитело имеет один или несколько аминокислотных остатков, введенных в него из источника, который является нечеловеческим. Эти нечеловеческие аминокислотные остатки часто относятся к «импортируемым» остаткам, которые обычно взяты из «импортного» вариабельного 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 (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 10 менее чем интактный человеческий вариабельный домен были замещены соответствующей последовательностью из нечеловеческих 15 видов. На практике такие гуманизированные антитела являются типично человеческими антителами, в которых некоторые остатки гипервариабельной области и, возможно, некоторые FR остатки 20 являются замещенными остатками из аналогичных участков антител грызунов.

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 35 последовательность, которая близка к таковой грызуна, затем принимается как человеческая каркасная область (FR) для 40 гуманизированного антитела (Sims et al., J. Immunol., 151:2296 (1993); Chothia et al., J. Mol. Biol., 196:901 (1987)). В другом способе применяют отдельную каркасную область, полученную из 45 консенсусной последовательности всех человеческих антител 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  
10 биологическими свойствами. Для достижения этой задачи в  
соответствии с предпочтительным способом гуманизированные  
антитела получают с помощью процесса анализа исходных  
15 последовательностей и различных концептуальных гуманизированных  
продуктов с применением трехмерных моделей исходных и  
гуманизированных последовательностей.

Трехмерные  
20 иммуноглобулиновые модели обычно являются приемлемыми и хорошо  
знакомы специалистам в данной области. Доступны иллюстрирующие  
компьютерные программы и дисплей вероятных трехмерных  
25 конформационных структур селективных кандидатов  
иммуноглобулиновых последовательностей. Инспектирование этих  
30 дисплеев позволяет проводить анализ возможной роли остатков в  
функционировании кандидатных иммуноглобулиновых  
последовательностей, то есть анализ остатков, которые влияют на  
35 способность кандидатного иммуноглобулина связывать свой антиген.  
Таким образом, FR остатки могут быть выбраны и объединены от  
40 реципиента и импортных последовательностей так, чтобы достигнуть  
желаемой антительной характеристики, такой как повышенная  
45 аффинность к мишенному антигену(ам). В общем, остатки  
гипервариабельной области непосредственно и наиболее значительно  
вовлекаются во влияние на антигенные связывание.

50 (iv) Человеческие антитела

В качестве альтернативы гуманизации могут быть генерированы

человеческие антитела. Например, сейчас существует возможность продуцирования трансгенных животных (например, мыши), которые способны при иммунизации продуцировать полный репертуар человеческих антител в отсутствие продуцирования 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 15 ингибированию эндогенного продуцирования антитела. Перенос чипа гена иммуноглобулина зародышевой линии человека в такую зародышевую линию мутантной мыши будет приводить к 20 продуцированию 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 антителенных 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 антителенные фрагменты на поверхности фаговой частицы. Так как нитчатая частица содержит однонитевую 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  
 5 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 Structural Biology*  
 10 3:564-571 (1993). Некоторые источники сегментов V-гена могут  
 быть применены для фагового дисплея. Clackson *et al.*, *Nature*,  
 15 352:624-628 (1991) выделил несходный чип анти-оксазолиновых  
 антител из слаборандомизированной комбинаторной библиотеки V  
 генов, полученных из селезенок иммунизированных мышей. Репертуар  
 20 V генов из иммунизированных человеческих доноров может быть  
 сконструирован и антитела к несходному чипу антигенов (включая  
 аутоантигены) могут быть изолированы, в основном, следуя  
 25 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.

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

35 (v) Антителные фрагменты

Были разработаны различные методики производства  
 40 антителных фрагментов. Традиционно эти фрагменты получают путем  
 протеолитического переваривания интактных антител (см.,  
 45 например, Morimoto *et al.*, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992) и Brennan *et al.*, *Science*,  
 50 229:81 (1985)). Одако эти фрагменты сейчас могут быть  
 продуцированы непосредственно с помощью рекомбинантных клеток-  
 хозяев. Например, антителные фрагменты могут быть изолированы

из антителных фаговых библиотек, обсужденных выше. В качестве альтернативы Fab'-SH-фрагменты могут быть непосредственно выделены из *E. coli* и химически связаны с формированием F(ab')<sub>2</sub>-фрагментов (Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). В соответствии с другим подходом, F(ab')<sub>2</sub>-фрагменты могут быть изолированы непосредственно из культуры рекомбинантных клеток-хозяев. Другие методики получения антителных 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. Антителный фрагмент также может быть «линейным антителом», например, как описано в Патенте США № 5641870. Такие линейные антителные 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-антитела. 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, 5 которое связывает цитотоксический агент (например, сапорин, анти-интерферон- $\alpha$ , алкалоид барвинка, рициновая А-цепь, метотрексат или радиоактивный изотоп гаптена). Биспецифичные 10 антитела могут быть получены как полноразмерные антитела или антителльные фрагменты (например,  $F(ab')_2$ -биспецифичные антитела).

15 Способы получения биспецифичных антител известны в данной области. Традиционное производство полноразмерных биспецифичных антител основано на коэкспрессии двух 20 иммуноглобулиновых пар тяжелая цепь-легкая цепь, где две цепи имеют различные специфичности. (Millstein *et al.*, *Nature*, 25 305:537-539 (1983)). Из-за случайной сортировки тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина эти гибриодомы (квадромы) производят потенциальную смесь 10 различных молекул антител, из которых 30 только одна имеет правильную биспецифичную структуру. Очистка правильной молекулы, которую обычно делают с помощью стадий 35 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).

40 В соответствии с другим подходом вариабельные домены антитела с желаемыми специфичностями связывания (антитело-антиген комбинирующие сайты) сливают с последовательностями 45 константного домена иммуноглобулина. Предпочтительным является слияние с константным доменом тяжелой цепи иммуноглобулина, 50 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, 5 кодирующие слияния тяжелой цепи иммуноглобулина, и, по желанию, легкую цепь иммуноглобулина, вставляют в отдельные экспрессирующиеся векторы и котрансфицируют ими соответствующий 10 хозяйский организм. Это обеспечивает большую гибкость в регулировке взаимных пропорций трех полипептидных фрагментов в 15 варианте осуществления, когда неравные отношения трех полипептидных цепей, применяемые в конструкции, обеспечивают оптимальные выходы. Существует, однако, возможность вставки 20 кодирующих последовательностей двух или трех полипептидных цепей в один экспрессионный вектор, когда экспрессия по меньшей мере 25 двух полипептидных цепей в равных отношениях приводит к высоким выходам или когда отношения ограничены незначительно.

В предпочтительном варианте осуществления этого подхода 30 биспецифичные антитела составляют гибридную тяжелую цепь иммуноглобулина с первой специфичностью связывания в одном плече и гибридную иммуноглобулиновую пару тяжелая цепь-легкая цепь 35 (обеспечивающую вторую специфичность связывания) в другом плече. Обнаружено, что эта асимметричная структура облегчает отделение 40 желаемого биспецифичного соединения от нежелательных комбинаций иммуноглобулиновой цепи, хотя присутствие иммуноглобулиновой 45 легкой цепи только в одной половине биспецифичной молекулы обеспечивает легкий путь выделения. Этот подход раскрыт в WO 1994/04690. Для дальнейшей детализации генерации биспецифичных 50 антител см., например, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

В соответствии с другом 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 10 клеток. Предпочтительная поверхность раздела включает по меньшей 15 мере часть С<sub>h3</sub>-домена антителенного константного домена. В этом способе одна или несколько маленьких аминокислотных боковых 20 цепей поверхности раздела первой молекулы антитела замещают большими боковыми цепями (например, тирозин или триптофан). Компенсаторные «полости» идентичного или подобного размера в 25 большой боковой цепи(ях) создают на поверхности раздела второй молекулы антитела путем замещения больших аминокислотных боковых цепей на более маленькие цепи (например, аланин или треонин). Это обеспечивает механизм увеличения выхода гетеродимера по 30 сравнению с другими нежелательными конечными продуктами, такими как гомодимеры.

Биспецифичные антитела включают сшитые или 35 «гетероконъюгированные» антитела. Например, одно из антител в гетероконъюгате может быть связано с авидином, другое с биотином. Такие антитела, например, были предложены для 40 нацеливания на клетки иммунной системы в нежелательных клетках (Патент США № 4676980) и для лечения ВИЧ-инфекции (WO 1991/00360, WO 1992/200373 и ЕР 03089). Гетероконъюгированные 45 антитела могут быть получены с использованием любых удобных способов сшивания. Приемлемые сшивающие агенты хорошо известны в 50 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 15 натрия арсенита для стабилизации вициналь дитиолов и предотвращения межмолекулярного формирования дисульфида. Генерированные 20  $Fab'$ -фрагменты затем превращают в тионитробензоатные (TNB) производные. Один из  $Fab'$ -TNB производных затем репревращают в  $Fab'$ -тиол путем восстановления 25 с меркаптоэтиламином и смешивают с эквимолярным количеством 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 35 биспецифичных антительных фрагментов непосредственно из культуры 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 45  $Fab'$ -частями двух различных антител путем генного слияния. Антительные 50 гомодимеры восстанавливают в области шарнира с формированием мономеров и затем реокисляют с формированием 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 антителенных фрагментов. Фрагменты включают вариабельный домен ( $V_H$ ) тяжелой цепи, соединенный с вариабельным доменом ( $V_L$ ) легкой цепи с помощью линкера, который является слишком коротким, чтобы допустить спаривание между двумя доменами на той же самой цепи. Соответственно  $V_H$ - и  $V_L$ -домены одного фрагмента вынуждены спариваться с комплементарными  $V_H$ - и  $V_L$ -доменами другого фрагмента, тем самым формируя два антигенсвязывающих сайта. Также была сообщена другая стратегия получения биспецифичных антителенных 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 al.*, *J. Immunol.*, 147:60 (1991).

#### **IV. Конъюгаты и другие модификации антитела**

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

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

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

(Патент США № 5208020), трихотен и СС1065, 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,  $\gamma_1^I$ ,  $\alpha_2^I$ ,  $\alpha_3^I$ , N-ацетил- $\gamma_1^I$ , PSAG и  $\theta^I$  (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 *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII и PAP-S), ингибитор *Momordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор *Sapaponaria officinalis*, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин, эномицин и трикотецины. 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 10 продуцирования радиоконъюгированных антител. Примеры включают At<sup>211</sup>, I<sup>131</sup>, I<sup>125</sup>, Y<sup>90</sup>, Re<sup>186</sup>, Re<sup>188</sup>, Sm<sup>153</sup>, Bi<sup>212</sup>, P<sup>32</sup> и радиоактивные 15 изотопы Lu.

Конъюгаты антитела и цитотоксического агента могут быть получены с использованием множества бифункциональных белок-20 связывающих агентов, таких как N-сукининимидил-3-(2-пиридилдитиол) пропионат (SPDP), сукининимидил-4-(N-малеимидометил) циклогексан-1-карбоксилат, иминотиолан (IT), 25 бифункциональные производные имидоэфиров (таких как диметиладипимидат HCl), активных сложных эфиров (таких как дисукининимидил суберат), альдегиды ( такие как глутаральдегид), бис-азидо-соединения (такие как бис(п-азидобензоил) гександиамин), производные бис-диазония (такие как 30 бис-(п-диазонийбензоил) этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол 2,6-диизоцианат) и бис-активные фторовые соединения 35 (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 40 1-изотиоцианатбензил-3-метилдиэтилентриаминпентауксусная кислота (MX-DTPA) является примером хелатообразующего агента для 45 конъюгации радионуклеотида с антителом. См. WO 1994/11026. 50 Линкер может быть «расщепляющим линкером», способствующим

высвобождению цитотоксического лекарственного средства В-клетку.

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

10 В качестве альтернативы, слитый белок, включающий в себя антитело и цитотоксический агент, могут быть получены, например, 15 путем рекомбинантных методик или пептидного синтеза.

Еще в одном из вариантов осуществления антитело может быть 20 конъюгировано с «рецептором» (таким как стрептавидин) для 25 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, 30 авидина), который конъюгирует с цитотоксическим агентом (например, радионуклеотидом).

Антитела согласно изобретению также могут быть 35 конъюгированы с активирующим пролекарство ферментом, который превращает пролекарство (например, пептидил химиотерапевтический агент, см. WO 1981/01145) в активное противоопухолевое средство.

40 См., например, WO 1988/07378 и Патент США № 4975278.

Ферментативный компонент таких конъюгатов включает в себя любой фермент, способный действовать на пролекарство таким 45 путем, чтобы превратить его в более активную цитотоксическую форму.

Ферменты, которые применяют в способе согласно изобретению, 50 включают в себя, не ограничиваясь ими, щелочную фосфатазу,

применяемую для превращения фосфатаза-содержащих пролекарств в свободные лекарственные средства; арилсульфатазу, применяемую 5 для превращения сульфат-содержащего пролекарства в свободные лекарственные средства; цитозиндезаминазу, применяемую для превращения нетоксичного 5-фторцитозина в противоопухолевое 10 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; 15 D-аланилкарбоксипептидазы, применяемые для превращения пролекарств, которые содержат заместители D-аминокислот; 20 углевод-расщепляющие ферменты, такие как  $\beta$ -галактозидаза и нейраминидаза, применяемые для превращения гликозилированных 25 пролекарств в свободные лекарственные средства;  $\beta$ -лактамаза, применяемая для превращения лекарств, производных  $\beta$ -лактама, в 30 свободные лекарственные средства и пенициллиновые амидазы, такие как пенициллин V амидаза или пенициллин G амидаза, применяемые 35 для превращения лекарственных средств, производных от их аминных азотов с феноксиацетильными или фенилацетильными группами, соответственно, в свободные лекарственные средства. В качестве 40 альтернативы антитела с ферментативной активностью, также известные в данной области как «абзимы», могут быть использованы 45 для превращения пролекарств согласно изобретению в свободные активные лекарственные средства (см., например, Massey, *Nature* 328:457-458 (1987)). Конъюгаты антитело-абзим могут быть 50 получены, как описано в данном описании, для доставки абзима в

популяцию опухолевых клеток.

Ферменты согласно изобретению могут быть ковалентно связаны с антителом с помощью методик, хорошо известных в данной области, таких как применение гетеробифункциональных сшивающих реагентов, обсуждаемых выше. В качестве альтернативы слитые белки, включающие в себя по меньшей мере антиген-связывающую область антитела согласно изобретению, связанную по меньшей мере с функционально активной частью фермента согласно изобретению, могут быть сконструированы с использованием методики рекомбинантной ДНК, хорошо известной в данной области. (см., 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, полиоксиалкиленами или сополимерами 30 полиэтиленгликоля и полипропиленгликоля. Антильные 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, 50 опубликованный 23 октября 1997 г. Липосомы с повышенным временем 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 антильной 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 локализуются для мутагенеза, называется «аланин-сканирующий мутагенез», как 5 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, 10 lys и glu) и замещают нейтральными или отрицательно заряженными аминокислотами (наиболее предпочтительны аланин или полиаланин) 15 для влияния на взаимодействие аминокислот с антигеном. Эти аминокислотные положения, демонстрирующие функциональную чувствительность к замещениям, затем усовершенствуют путем 20 введения другого или других вариантов в или для сайтов замещения. Таким образом, хотя сайт для введения вариации 25 аминокислотной последовательности заранее определен, природа мутации, по существу, заранее не предопределена. Например, для анализа осуществления мутации в данном сайте ala-сканирующий или 30 случайный мутагенез проводят в кодоне-мишени или области, и экспрессирующиеся антителенные варианты подвергают скринингу на 35 желаемую активность.

Инсерции аминокислотных последовательностей включают амино- и/или карбокси-концевые слияния, ранжированные по длине от 40 одного остатка до полипептидов, содержащих сотни или более остатков, а также инсерции внутри последовательности одного или множества аминокислотных остатков. Примеры концевых инсерций 45 включают антитело с N-концевым метиониловым остатком или антитело, слитое с цитотоксическим полипептидом. Другие 50 инсерционные варианты молекулы антитела включают слияние с N- или С-концом антитела фермента или полипептида, который повышает

период сывороточного полуыведения 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;
- 10 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  
 20 и предотвращения аномального сшивания. Наоборот, цистеиновая связь (*и*) может быть добавлена к антителу для улучшения его стабильности (особенно когда антитело является антителным  
 25 фрагментом, таким как Fv-фрагмент).

Особенно предпочтительный тип замещенного варианта включает замещение одного или нескольких остатков гипервариабельной области исходного антитела. Обычно полученный в результате варианты, 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.  
 45 Полученные таким образом варианты антител распределены в виде моновалентных частиц нитчатого фага как результат слияния с продуктом гена III M13, упакованных внутри каждой частицы.

Проявляемые на фаге варианты затем подвергают скринингу на биологическую активность (например, аффинность связывания) как раскрыто в данном описании. Для того, чтобы идентифицировать 5 кандидатные для модификации сайты гипервариабельной области, должен быть выполнен аланин-сканирующий мутагенез для 10 идентификации остатков гипервариабельной области, значительно способствующих антигенному связыванию. В качестве альтернативы 15 или дополнительно может быть полезен анализ кристаллической структуры антиген-антителного комплекса для идентификации контактных точек между антителом и антигеном. Такие контактные 20 остатки и соседние остатки являются кандидатами для замены в соответствии с методиками, разработанными в данном описании.

Если такие варианты генерированы, панель вариантов подвергают 25 скринингу, как описано в данном описании, и антитела с улучшенными свойствами в одном или нескольких соответствующих 30 способах могут быть отобраны для дальнейшей разработки.

В другом типе аминокислотного варианта антитела изменяется исходный паттерн гликозилирования антитела. Такие изменения 35 включают делетирование одной или нескольких углеводных частей, созданных в антителе, и/или добавление одного или нескольких 40 сайтов гликозилирования, которые не представлены в антителе.

Гликозилирование полипептидов обычно является или N-связанным или O-связанным. N-связанное относится к прикреплению 45 углеводной части к боковой цепи аспарагинового остатка. Трипептидные последовательности аспарагин-X-серин и аспарагин-X- 50 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 5 трипептидных последовательностей в полипептиде создает потенциальный сайт гликозилирования. О-связанное гликозилирование относится к прикреплению одного из сахаров N- 10 ацетилгалактозамина, галактозы или ксилозы к гидроксиаминовой кислоте, наиболее обычно серина или треонина, хотя 5- 15 гидроксипролин или 5-гидроксилизин также могут быть использованы.

Добавление сайтов гликозилирования к антителу удобно 20 выполнять путем изменения аминокислотной последовательности, так как она содержит одну или несколько вышеописанных трипептидных 25 последовательностей (для N-связанных сайтов гликозилирования). Изменение также может быть проведено путем добавления или замены 30 одного или нескольких сериновых или треониновых остатков в последовательности исходного антитела (для O-связанных сайтов гликозилирования).

Когда антитело содержит Fc-область, углевод, прикрепляемый 35 к ней, может быть изменен. Например, антитела со зрелой углеводной структурой, которые не содержат фукозу, прикрепленную 40 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 45 углеводе, прикрепленном к Fc-области антитела, упоминаются в WO 2003/011878, Jean-Mairet et al., и Патенте США № 6602684, 50 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 5 измененными углеводами, прикрепленными к своей Fc-области.

Предпочтительный гликозилированный вариант в данном 10 описании включает Fc-область, где углеводная структура, прикрепленная к Fc-области, не содержит фукозу. Такие варианты имеют улучшенную функцию ADCC. Необязательно, Fc-область далее 15 включает одно или несколько аминокислотных замен, что далее улучшает ADCC, например, замены в положениях 298, 333 и/или 334 Fc-области (Eu нумерация остатков). Примерами публикаций, 20 связанных с «дефукозилированием» или «фукозо-дефектными» антителами являются: US 2003/0157108; WO2000/61739; 25 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; 30 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, производящих дефукозилированные 35 антитела, включают Lec13 СНО-клетки, дефектные по фукозилированию белков (Ripka *et al.*, Arch. Biochem. Biophys. 40 249:533-545 (1986); США 2003/0157108, Presta, L; и WO 2004/056312, Adams *et al.*, особенно в Примере 11), и нокаутные клеточные линии, такие как СНО-клетки с нокаутированным геном 45 FUT8 альфа-1,6-фукозилтрансферазы (Yamane-Ohnuki *et al.*, Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)).

Молекулы нуклеиновых кислот, кодирующих варианты 50 аминокислотной последовательности антитела, получают с помощью

различных способов, известных специалистам в данной области. Эти способы включают, но не ограничиваясь ими, выделение из 5 природного источника (в случае природно встречающихся вариантов аминокислотной последовательности) или получение путем олигонуклеотид-опосредованного (или 10 сайт-направленного) мутагенеза, ПЦР-мутагенеза и кассетного мутагенеза ранее полученного варианта или невариантной версии антитела.

15 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 20 путем введения одного или нескольких аминокислотных замен в Fc-область антитела. В качестве альтернативы или дополнительно, 25 цистеиновый остаток(и) может быть введен в Fc-область, тем самым обеспечивая формирование межцепочечной дисульфидной связи в этой области. Гомодимерное антитело, генерированное таким образом, 30 может иметь улучшенную интернализующую 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. 35 Immunol.* 148:2918-2922 (1992). Гомодимерные антитела с увеличенной противоопухолевой активностью также могут быть 40 получены с применением гетеробифункциональных перекрестных линкеров как описано у Wolff et al., *Cancer Research* 53:2560-2565 (1993). В качестве альтернативы антитело может быть 45 сконструировано как имеющее двойные Fc-области и может, тем самым, иметь усиленный комплементный лизис и ADCC способности.

50 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,  
10 включающей или состоящей из замещений в одном, двух или трех 10 этих положениях.

15 Антитела с измененным C1q связыванием и/или CDC описаны в WO 1999/51642 и Патентах США № 6194551, 6242195, 6528624 и 20 6538124 (Idusogie *et al.*). Антитела включают аминокислотную 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 антителенный фрагмент) как описано, например, 30 в Патенте США № 5739277. Как использовано в данном описании термин «связывающий рецептор реутилизации эпитоп» относится к 35 эпитопу Fc-области IgG молекулы (например, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> или IgG<sub>4</sub>), 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* 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, 5  
экспиентами или стабилизаторами (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16<sup>th</sup> edition, Osol, A. Ed. (1980)) в форме лиофилизованных составов или водных растворов. Приемлемые 10 носители, экспиенты или стабилизаторы являются нетоксичными для реципиентов в применяемых дозах и концентрациях и включают в себя буферы, такие как фосфатный, цитратный и другие 15 органические кислоты; антиоксиданты, включающие аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как октадецилметилбензил 20 аммоний хлорид; гексаметоний хлорид; бензалконий хлорид; бензетоний хлорид; фенол, бутил или бензиловый спирт; алкил 25 парабены, такие как метиловый или пропиловый парабен; катехол; резорцинол; циклогексанол; 3-пентанол и м-крезол); низкомолекулярные (менее чем 10 остатков) полипептиды; белки, 30 такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидроильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, 35 аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатообразующие агенты, 40 такие как ЭДТА; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; соль-формирующие счетные ионы, такие как натрий; металлические комплексы (например, Zn-протеиновые комплексы); 45 и/или неионные сурфактанты, такие как TWEEN™, PLURONICS™ или 50

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<sup>TM</sup> 20 10 эмульгирующего агента при pH 5,0, который имеет минимальный срок годности два года при температуре 2-8°C. Другой анти-CD20 состав, представляющий интерес, включает 10 мг/мл ритуксимаба в 9,0 15 мг/мл натрия хлорида, 7,35 мг/мл дигидрата натрия цитрата, 0,7 мг/мл POLYSORBATE<sup>TM</sup> 80 эмульгирующего агента и Стерильную Воду 20 для Инъекции, pH 6,5.

Лиофилизированные составы, адаптированные для подкожного введения, описаны, например, в Патенте США № 6267958 (Andy et 25 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 45 лечению, предпочтительно с комплементарными активностями, которые не влияют неблагоприятно друг на друга. Например, может быть далее желательно обеспечить цитотоксический 50 агент (например, митоксанtron (NOVANTRONE<sup>®</sup>), метотрексат, циклофосфамид, хлорамбуцил или азатиоприн), химиотерапевтический

агент, иммуносупрессивный агент, цитокин, антагонист цитокина или антитело, фактор роста, гормон (например, тестостерон или 5 гормон-заместительную терапию), интегрин, антагонист интегрина или антитело (например, LFA-1-антитело, такое как эфализумаб/RAPTIVA®, коммерчески доступное от Genentech, или 10 альфа-4-интегриновое антитело, такое как натализумаб/ANTEGREN®, доступное от Biogen, или другие, как указано выше), 15 лекарственные средства интерферонового класса, такие как IFN-бета-1a (REBIF® и AVONEX®) или IFN-бета-1b (BETASERON®), олигопептид, такой как глатирамер ацетат (COPAXONE®), 20 внутривенный иммуноглобулин (гамма-глобулин), лимфоцит-истощающее лекарственное средство (например, митоксантрон, циклофосфамид, CAMPATH™ антитела, анти-CD4 или кладрибин), 25 нелимфоцит-истощающее иммуносупрессивное лекарственное средство (например, MMF или циклоспорин), холестерин-понижающее 30 лекарственное средство «статинового», класса, эстрadiол, лекарственное средство, которое лечит вторичные или связанные с волчанкой симптомы (например, спастичность, недержание, боль, 35 утомление), ингибитор TNF, DMARD, NSAID, кортикостероид (например, метилпреднизолон, преднизон, дексаметазон или 40 глюкокортикоид), левотироксин, циклоспорин А, соматостатиновый аналог, антиметаболит, другие антагонисты/антитела В-клеточной поверхности и т.п., в составе. Тип и эффективность количества 45 таких других агентов (называемых в данном описании вторыми лекарственным средствами, где первым лекарственным средством является CD20-антитело) зависит, например, от количества 50 антитела, представленного в составе, типа волчанки, которая

должна быть подвергнута лечению, и клинических параметров субъекта.

5 Активные ингредиенты также могут быть захвачены в  
 10 микроаппараты, полученные, например, с помощью методики коацервации или путем межфазной полимеризации, например, гидроксиметилцеллюлозы или посредством желатиновых микроаппаратов и  
 15 поли-(метилметакрилат) микроаппаратов, соответственно, в коллоидных системах доставки лекарственных средств (например, липосомы, альбуминовые микросфера, микроэмulsionи, наночастицы и нанокапсулы) или в макроэмulsionях. Такие методики раскрыты,  
 20 например, в *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16<sup>th</sup> edition, Osol, A. Ed. (1980)).

25 Могут быть получены непрерывно высвобождаемые препараты. Подходящие примеры непрерывно высвобождаемых препаратов включают полуупроницаемые матрицы твердых гидрофобных полимеров, 30 содержащих антитело, в которых матрицы находятся в виде формованных изделий, например, пленок или микроаппаратов. Примеры непрерывно высвобождаемых матриц включают полиэфиры, гидрогели 35 (например, поли(2-гидроксиэтилметакрилат) или поли(виниловый спирт)), полилактиды (Патент США № 3773919), сополимеры 40 L-глутаминовой кислоты и γ-этил-L-глутамата, нерасщепляемый этилен-винилацетат, расщепляемые сополимеры молочной кислоты-гликолевой кислоты, такие как LUPRON DEPOT™ (инъецируемые 45 микросфера, составленные из сополимера молочной кислоты-гликолевой кислоты и лейпролидацетата) и поли-D-(-)-3-50 гидроксимасляную кислоту.

Составы, предназначенные для применения *in vivo*, должны

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

**5 VI. Изделия производства**

В другом варианте осуществления согласно изобретению предлагается изделие производства, содержащее материалы, 10 применяемые для лечения волчанки, описанные выше.

Предпочтительно изделие производства включает: а) контейнер, 15 включающий композицию, включающую антитело, которое связывается с маркером В-клеточной поверхности (например, CD20-антителом) и фармацевтически приемлемым носителем или разбавителем в 20 контейнере; и б) листовку-вкладыш с инструкциями по лечению волчанки у субъекта, где инструкции указывают, какое количество 25 антитела вводят субъекту, которое является эффективным для обеспечения начального уровня антитела (около 0,5-4 граммов), за тем второго введения антитела (около 0,5-4 граммов), причем 30 второе введение производят не ранее чем примерно через 16-54 недели после начального введения, и каждое введение обеспечивают 35 субъекту в виде разовой дозы или в виде двух или трех отдельных доз антитела.

Листовка-вкладыш находится на или связана с контейнером.

40 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 45 содержит композицию, которая является эффективной для лечения волчанки, и может иметь стерильное доступное входное отверстие (например, пакет с раствором для внутривенного вливания или 50 пробирка, имеющая пробку, поддающуюся прокалыванию с помощью

иглы для подкожной инъекции). По меньшей мере одним активным агентом в композиции являются антитело. Метка или листовка-  
5 вкладыш указывают, что композицию используют для лечения волчанки у субъекта, подходящего для лечения, со специфическим руководством относительно дозируемых количеств и интервалов  
10 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  
15 и раствор декстрозы. Еще изделие производства может далее включать второй или третий контейнер, включающий второе лекарственное средство, где CD20-антитело является первым  
20 лекарственным средством, где изделие производства далее содержит инструкции на листовке-вкладыше по лечению субъекта вторым лекарственным средством. Примерные вторые лекарственные средства  
25 включают в себя химиотерапевтический агент, иммуносупрессивный агент, противомалярийный агент, цитотоксический агент, антигонист интегрина, антигонист цитокина или гормон.  
30 Предпочтительным вторым лекарственным средством является химиотерапевтический агент, противомалярийный агент или иммуносупрессивный агент, более предпочтительны гидроксихлороквин, хлороквин, квинакрин, циклофосфамид,  
35 преднизон, миофенолат мофетил, метотрексат, азатиприн или 6-меркаптопурин. Более конкретно, если волчанка является SLE, такое второе лекарственное средство является предпочтительно кортикоステроидом, таким как преднизон (необязательно наряду с

метотрексатом, гидроксихлороквином, хлороквином, квинакрином, MMF или азатиоприном с или без 6-меркаптурина), и, если волчанка является волчаночным нефритом, второе лекарственное средство является предпочтительно кортикоидом, таким как преднизон, а также MMF или циклофосфамид. Изделие производства может далее включать другие материалы, желательно из коммерческих источников и употребляемые стандартно, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы и шприцы. Далее детали 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 субъектов с волчаночным нефритом ISN/RPS 2003 класса III или IV**

В этом исследовании оценивают преимущество эффективности и безопасности ритуксимаба (MABTHERA®/RITUXAN®), добавленного к миофенолат мофетилу (MMF) и кортикоидам, по сравнению с раздельным применением MMF плюс кортикоиды, у субъектов с активным волчаночным нефритом ISN/RPS 2003 класса III или IV.

Ритуксимаб (1000 мг × 2) вводят внутривенно в двух начальных дозах в дни 1 и 15 с в/в и оральными кортикоидами, следующие по 1 г × 2 шесть месяцев. Эту экспериментальную схему лечения (ритуксимаб, добавленный к MMF + кортикоиды) сравнивают с плацебо (плацебо, добавленное к MMF + кортикоиды). Эта схема лечения симптоматики обычного стандартного обслуживания на основе ритуксимаба исключает 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 экстравенальную, внезапные обострения болезни и эпизоды, связанные с безопасностью, в течение 52 недель исследования. Основной 10 эффективной конечной точкой испытания являются 52 недели. Для безопасности последующее врачебное наблюдение необходимо вплоть до 12 месяцев после приема последней дозы ритуксимаба или 15 В-клеточного восстановления, независимо от состояния больного.

Основной целью является определение пропорции пациентов, 20 достигших или полного или частичного почечного ответа.

Полный почечный ответ определяют как:

1. нормальный креатинин или нормализация креатинина до 25 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);
- 35 3. отношение мочевого белка к креатинину  $<0,5$ .

Частичный почечный ответ определяется как:

1. стабильный ( $\pm 10\%$  от данных скрининга) или улучшенный 40 оцененный уровень гломеруллярной 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 50 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 ≥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×/день). Все субъекты будут оттитрованы вплоть до мишенной дозы 3 г/день в разделенных дозах (3×/день) до 4 недели 20 как толерантные. Если снижения в дозе необходимы, снижения будут допускаться до снижения 250-500 мг. При рандомизации субъектам 25 после или продолжения или стимуляции MMF начнут давать 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 10-15 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 отзваны и подвергнуты лечению по усмотрению Исследователя. Эти субъекты 40 будут считаться как неудачно подвергнутые лечению, но с последующим внимательным наблюдением безопасности отдаленных 45 результатов.

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 центральной лаборатории. В конце 78 недели субъекты, получавшие 30 плацебо ритуксимаб или активный ритуксимаб, но показавшие восстановление В-клеток, будут полностью участвовать в 35 исследовании. Субъекты, получавшие ритуксимаб, но не показавшие восстановления В-клеток, будут наблюдаться до 40 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 2Н7 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-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 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 (МАВТHERA®/RITUXAN®), добавленного к преднизону и одному дополнительному иммуносупрессанту (ММФ, метотрексат (МТХ), азатиоприн (АЗА) или 6-меркаптопурин (6-МР), 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 В-критериев и они будут получать начальную

10 пероральную схему лечения преднизоном 0,5 мг/кг/день, 0,75 мг/кг/день или 1,0 мг/кг/день, основанную на своих BILAG индексах и преисследовательскую дозу преднизона в течение 7-

15 дневного периода. Субъектов затем рандомизируют для получения ритуксимаба или плацебо и в день 16 будут инициировать

20 преднизоном, снижая в течение 10 недель до достижения дозы преднизона <10 мг/день. Субъектам будут продолжать снижать их

25 дозу кортикоステроида как толерантную к мишенней дозе ≤5 мг/день.

Субъектов подвергают мониторингу на активность болезни, применение дополнительных иммуносупрессантов, внезапные

30 обострения болезни, применение преднизона и события, связанные с безопасностью в течение 52 недель исследования. Основной

35 эффективной конечной точкой испытания являются 52 недели.

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

45 эффективности ритуксимаба по сравнению с плацебо в достижении и поддержании основного клинического ответа (MCR) или частичного

50 клинического ответа (PCR) у субъектов с состоянием от умеренного до тяжелого системной красной волчанки (SLE), как определено с 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 С индексов или лучших за 24 недели и поддерживают этот ответ без проявления внезапного обострения болезни (один или несколько новых доменов с BILAG А- или В-индексом) за 52 недели.

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

- NCR: все субъекты, которые испытывают тяжелое внезапное обострение болезни (один новый домен с BILAG А-индексом или два новых домена с BILAG В-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 С-индекса или лучшего на 24 неделе, измеренная, например, путем определения пропорции субъектов, которые достигли BILAG С-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 «A» или двум новым BILAG категории «B» 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 дозе кортикоステроида. Приемлемых субъектов рандомизируют в отношении 2:1 для получения ритуксимаба 1000 мг в/в × 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 противомалярийной лекарственной терапии (по показаниям), а также своей базовой некортикоидной 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 противомалярийных агентов и диапазоны доз, предполагаемых для использования в течение хода испытания, если они показаны.

Противомалярийная 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 кортикоидами, если проведена оценка клинической адекватности исследователем. Эти субъекты могут быть повторно подвергнуты лечению преднизоном (0,5-1,0 мг/кг) на основании тяжести болезни. Кортикоиды в/в в эквивалентных дозах могут быть разрешены, если поражение желудочно-кишечного тракта временно устранено оральными кортикоидами. Субъекты,

которые испытывают внезапное обострение болезни, которое не отвечает на кортикостероиды, относятся к таковым без улучшения по своим BILAG A- или В-симптомам после 2 недель усиленного кортикоидного 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 2Н7 субъекту по протоколу,

изложенном 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 предназона 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 AIYPNGXTSYNQKFKG, где X является D или A (SEQ ID NO:20), например, SEQ ID NO:11 (Фиг. 1B), и  
 10 CDR H3-последовательность VVYYSSXYWYFDV, 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<sub>16I</sub>) легкой цепи каппа и, в основном, человеческие консенсусные FR-остатки человеческой подгруппы III (V<sub>HIII</sub>) 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 вариабельном 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 25 S298A, E333A и K334A, с применением Eu нумерации остатков 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 полуыведение, например, замена в положении 434 35 тяжелой цепи, такого как N434W. См. также Патент США № 6737056, 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 вариабельный легкий домен SEQ ID NO:2 и вариабельный тяжелый домен SEQ ID

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

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

Суммируя некоторые различные предпочтительные варианты  
 20 осуществления согласно изобретению, установлено, что  
 вариабельная область вариантов, основанных на 2H7.v16, включает  
 25 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  
 30 таковой v16.

#### Таблица 2

##### **Примерные варианты гуманизированного 2H7 антитела**

2H7 версия	Изменения тяжелой цепи (V <sub>H</sub> )	Изменения легкой цепи (V <sub>L</sub> )	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 вариабельную последовательность легкого домена:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFSGSGSGTDF  
TLTISSLQPEDFATYYCQQWSFNPPTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:2);

5

и 2H7.v16 вариабельную последовательность тяжелого домена:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSYNQFKGR  
FTISVDKSNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYYSNSYWYFDVWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:8).

10

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

15

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFSGSGSGTDF  
TLTISSLQPEDFATYYCQQWSFNPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP  
20 EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN  
RGEC (SEQ ID NO:13);

25

и аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID

NO:14 или:

30

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSYNQFKGR  
FTISVDKSNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYYSNSYWYFDVWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAP  
SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC  
NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH  
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT  
SKAKGQPREGQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF  
35 LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:15).

35

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

40

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFSGSGSGTDF  
TLTISSLQPEDFATYYCQQWAFNPPTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:23)

45

и 2H7.v511 вариабельную последовательность тяжелого домена:

50

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGATSYN  
QKFKGRFTISVDKSNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYYSRYWYFDVWGQGTLTVSS (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 10 легкой цепи:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRSGSGSGTDF  
TLTISSLPEDFATYYCQQWAFNPPFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR  
15 EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN  
RGEC (SEQ ID NO:13)

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

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGATSYNQFKGR  
FTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYYSRYWYFDVVGQGTLTVSSASTKGPSVFPLA  
25 PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI  
CNVNHKPSNTKVDDKVEPKSCDKTHICPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH  
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAAKTKPREEQYNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNAALPAPIAA  
TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGS  
30 FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:22).

Предпочтительным вариантом осуществления в данном описании является вариант, в котором антитело является гуманизированным 35 антителом 2H7, включающим вариабельные последовательности домена в SEQ ID NO:2 и 8. Другим предпочтительным вариантом осуществления в данном описании является вариант, в котором 40 антитело является гуманизированным антителом 2H7, включающим вариабельные последовательности домена в SEQ ID NO:23 и 24.

45

50

&lt;110&gt; GENENTECH, INC. et al.

&lt;120&gt; Способ лечения волчанки

&lt;130&gt; P2133R1 PCT

5

&lt;140&gt; PCT/US2005/019550

&lt;141&gt; 2005-06-02

<150> US 60/577,235  
<151> 2004-06-04

10

<150> US 60/617,997  
<151> 2004-10-11

&lt;160&gt; 24

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 107

15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 1

Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro  
1 5 10 15

20

Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser  
20 25 30Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro  
35 40 45

25

Trp Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg  
50 55 60Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser  
65 70 75

30

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

Lys Arg

35

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 107

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Последовательность синтезирована

40

&lt;400&gt; 2

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

45

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

	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	
	<b>Lys Arg</b>			
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	
	<b>Ile Lys Arg</b>			
35				
	<210> 4			
	<211> 26			
	<212> PRT			
	<213> Искусственная последовательность			
	<220>			
40	<223> Последовательность синтезирована			
	<400> 4			
	Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Ala Pro Ser Asn Leu			
	1	5	10	15
	Ala Ser Gln Gln Trp Ser Phe Asn Pro Pro Thr			
45	20	25		
	<210> 5			
	<211> 26			
	<212> PRT			
	<213> Искусственная последовательность			
50	<220>			

<223> Последовательность синтезирована

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

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

<210> 6  
<211> 27

<212> PRT

## <213> Искусственная последовательность

10 226

<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 Gin 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

25 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

30 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**

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

20 <212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность синтезирована

<400> 9

25 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser 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 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

45 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность синтезирована

<400> 10

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His Ala Ile Tyr Pro Gly

50

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

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 40

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

10

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Последовательность синтезирована

&lt;400&gt; 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

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 37

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Последовательность синтезирована

25

&lt;400&gt; 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

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 213

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Последовательность синтезирована

&lt;400&gt; 13

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

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

45

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

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

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 452

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

<220>  
<223> Последовательность синтезирована

&lt;400&gt; 14

30 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser 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

35 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 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  
 5 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  
 10 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  
 15 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr  
 245 250 255  
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp  
 260 265 270  
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
 275 280 285  
 20 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln  
 290 295 300  
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His  
 305 310 315  
 25 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 320 325 330  
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys  
 335 340 345  
 30 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg  
 350 355 360  
 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys  
 365 370 375  
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly  
 380 385 390  
 35 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  
 40 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

45 Gly Lys

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 452

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Последовательность синтезирована

&lt;400&gt; 15

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

5

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		

10

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		

15

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		

20

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		

25

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		

30

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		

35

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		

40

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		

45

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		

50

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  
 5 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  
 15 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

<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 40 45  
 35 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  
 50 Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp  
 140 145 150

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln  
 155 160 165  
 Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu  
 170 175 180  
 5 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

10 Gly Glu Cys

<210> 17

<211> 452

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

15 <220>

<223> Последовательность синтезирована

<400> 17

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

20

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

25

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

30

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

35

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

40

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

45

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

50

	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  
<213> Искусственная последовательность  
40 <220>  
<223> Последовательность синтезирована  
<220> Не определена  
<221>  
<222> 9  
45 <223> X = M ИЛИ L  
<400> 18  
Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Xaa His  
5 10  
<210> 19

<211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Последовательность синтезирована

5

<220>  
 <221> Не определена  
 <222> 4  
 <223> X = S или A

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

10 5

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

15

<220>  
 <223> Последовательность синтезирована

<220> Не определена  
 <221> 8  
 <223> X = D или A

<400> 20  
 Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Xaa Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe

20 1 5 10 15

Lys Gly

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

<220>  
 <223> X = S или R

25

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

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

30 5 10

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

<220>  
 <223> Последовательность синтезирована

<400> 22  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly

35 1 5 10 15

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

45 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  
 Tyr Asn Ala Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His  
                   305                         310                         315  
 40 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  
 45 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg  
                   350                         355                         360  
 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys  
                   365                         370                         375

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly  
 380 385 390  
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser  
 395 400 405  
 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**

15 <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  
 30 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
 65 70 75  
 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp  
 80 85 90  
 Ala Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile  
 95 100 105  
 35 Lys Arg  
 <210> 24  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Последовательность синтезирована  
 40 <400> 24  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser 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  
 45  
 50

## 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

- a) отдельные дозы составляют первую и вторую дозу; или
- b) отдельные дозы составляют первую, вторую и третью дозу.

9. Способ по п.8, в котором

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

b) вторую или третью дозу вводят через 6-16 дней после введения предыдущей

10 дозы;

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

d) 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;

15

e) 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;

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

20

g) 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.

25

12. Способ по п.11, в котором

a) второе лекарственное средство вводят вместе с начальным введением;

b) второе лекарственное средство вводят вместе с начальным и вторым введениеми;

30

c) второе лекарственное средство вводят вместе со всеми введениями;

d) вторым лекарственным средством является химиотерапевтический агент, иммunoсупрессивный агент, противомалярийный агент, цитотоксический агент, антагонист интегрина, антагонист цитокина или гормон; и/или

35

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

40

13. Способ по п.1, в котором

45

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

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

50

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

d) 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;

5        e) 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 где преднизон вводят в меньшем количестве вместе со вторым введением, чем вместе с начальным введением, но не вводят при третьем и последующих введениях;

10      f) вводят микофенолат мофетил; и/или

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

14. Способ по п.1, в котором

- 14      a) субъекта никогда ранее не лечили CD20-антителом;
- 14      b) антителом является голое антитело или антитело конъюгировано с другой молекулой, при этом, в частности, другой молекулой является цитотоксический агент и/или
- 15      c) 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

20      нефрита не вводят никакого другого лекарственного средства, кроме CD20-антитела.

16. Способ по п.15, в котором

- 16      a) антителом является ритуксимаб;
- 16      b) антителом является гуманизированное антитело 2H7, содержащее последовательности SEQ ID NO:2 и 8 вариабельного домена и/или
- 25      c) антителом является гуманизированное антитело 2H7, содержащее последовательности SEQ ID NO:23 и 24 вариабельного домена.

17. Способ по п.1 или 16, где субъект имеет повышенный уровень

30      инфильтрирующих CD20-клеток, анти-нуклеарных антител (ANA), антител против двунитевых ДНК (днДНК), анти-Sm-антител, антинуклеарных 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

- 45      a) контейнер, содержащий CD20-антитело; и

45      b) 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 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 дозы или в виде двух или трех отдельных доз антитела.

20. Изделие производства по п.19, в котором

- 5 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, противомалярийный агент, цитотоксический агент, антагонист интегрина, антагонист цитокина или гормон, и/или при этом, в частности, вторым лекарственным средством является химиотерапевтический агент, 10 противомалярийный агент или иммуносупрессивный агент; и/или
- б) вторым лекарственным средством является метилпреднизолон, преднизон, миофенолат мофетил, метотрексат, гидроксихлороквин, хлороквин, квинакрин, азатиоприн или 6-меркаптопурин.

15

20

25

30

35

40

45

50

## Выравнивание последовательности вариабельного домена легкой цепи

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

**ФИГ.1А**

## Выравнивание последовательности вариабельного домена тяжелой цепи

	FR1			CDR1		
	10			20		
2H7	QAYLQQSGAELVRPGASVKMSCKAS		[GYTFTSYNMH]	WVKQT		
	*** * * ** * * *** *					*
hu2H7.v16	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS		[GYTFTSYNMH]	WVRQA		
				*	*	*
hum III	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS		[GFTFSSYAMS]	WVRQA		
	FR2			CDR2		
	50	a	60	70	80	
2H7	PRQGLEWIG		[AIYPNGDTSYNQKFKG]	KATLTVDKSSSTAYM		
	**	*		***	***	***
hu2H7.v16	PGKGLEWVG		[AIYPNGDTSYNQKFKG]	RFTISVDKSKNLTL		
	*	*	*****	*	***	*
hum III	PGKGLEWVA		[VISGDGGSTYYADSVKG]	RFTISRDNSKNLTL		
	FR3			CDR3		
	abc	90			100abcde	110
2H7	QLSSLTSEDSAVYFCAR		[VVYYNSNSYWYFDV]	WGTGTTVTVSS		
	**	**	*	*		*
hu2H7.v16	QMNSLRAEDTAVYYCAR		[VVYYNSNSYWYFDV]	WGQGTLVTVSS		
			*****	***		*
hum III	QMNSLRAEDTAVYYCAR		[GRVGYSLY---DY]	WGQGTLVTVSS		

**ФИГ.1В**  
**Гуманизированная 2H7.v16 легкая цепь**

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFSG  
 SGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWSFNPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS  
 GTASVVCLLNPFREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLKADYEKHK  
 VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:13)

**ФИГ.2**

## Гуманизированная 2H7.v16 тяжелая цепь

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPNGDTSYNQK  
 FKGRFTISVDKSNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYYNSYWYFDVWGQTLTVSSASTK  
 GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPABLQSSGLYSLSS  
 VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHCPCPAPELLGGPSVFLFPPKP  
 KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLH  
 QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY  
 PSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY  
 TQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:14)

### ФИГ.3 Гуманизированная 2H7.v31 тяжелая цепь

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPNGDTSYNQK  
 FKGRFTISVDKSNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYYNSYWYFDVWGQTLTVSSASTK  
 GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPABLQSSGLYSLSS  
 VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHCPCPAPELLGGPSVFLFPPKP  
 KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNATYRVSVLTVLH  
 QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIAATISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY  
 PSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY  
 TQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:15)

### ФИГ.4 Выравнивание легкой цепи

	1	32
hu2H7.v16	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAP	*****
hu2H7.v511	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYAP	*****
	52	
hu2H7.v16	SNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSFNPPPTFGQG	*****
hu2H7.v511	SNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWAFNPPTFGQG	*****
	102	
hu2H7.v16	TKVEIKRTVAAPSFIGPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYREAKVQWKVD	*****
hu2H7.v511	TKVEIKRTVAAPSFIGPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYREAKVQWKVD	*****
	152	
hu2H7.v16	NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGL	*****
hu2H7.v511	NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGL	*****
	202	214
hu2H7.v16	SSPVTKSFNRGEC	*****
hu2H7.v511	SSPVTKSFNRGEC	

### ФИГ.5

## Выравнивание тяжелой цепи

	1		
hu2H7.v16	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHW *****		
hu2H7.v511	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHW		
	37	52a	82abc
hu2H7.v16	VRQAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSYNQKFGRFTISVDKSNTLYLQMNSL *****		
hu2H7.v511	VRQAPGKGLEWVGAIYPGNGATSYNQKFGRFTISVDKSNTLYLQMNSL		
	83	100abcde	113
hu2H7.v16	RAEDTAVYYCARVYYYSNSYWYFDVWGQGTLTVSS *****		
hu2H7.v511	RAEDTAVYYCARVYYYSYRYWYFDVWGQGTLTVSS		
	118		
hu2H7.v16	ASTKGPSVFPLAPS *****		
hu2H7.v511	ASTKGPSVFPLAPS		
	132		
hu2H7.v16	SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTPAVLQSSGLYS *****		
hu2H7.v511	SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTPAVLQSSGLYS		
	182		
hu2H7.v16	LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA *****		
hu2H7.v511	LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA		
	232		
hu2H7.v16	PELLGGPSVFLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG *****		
hu2H7.v511	PELLGGPSVFLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG		
	282		
hu2H7.v16	VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP *****		
hu2H7.v511	VEVHNAKTKPREEQYNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNALPAP		
	332		
hu2H7.v16	IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAEWF *****		
hu2H7.v511	IAATISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAEWF		
	382		
hu2H7.v16	ESNGQOPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEA *****		
hu2H7.v511	ESNGQOPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEA		
	432	447	
hu2H7.v16	LHNHYTQKSLSLSPGK *****		
hu2H7.v511	LHNHYTQKSLSLSPGK		

**ФИГ.6**