

R U
2 6 9 4 0 5 5 C 2

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



(19)

RU (11)

2 694 055⁽¹³⁾ C2

(51) МПК
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 47/26 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
A61K 39/395 (2013.01); *A61K 47/26* (2013.01); *A61P 35/00* (2019.02)

(21)(22) Заявка: 2015143607, 13.03.2014

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
13.03.2014

Дата регистрации:
09.07.2019

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
13.03.2013 US 61/780,899

(43) Дата публикации заявки: 20.04.2017 Бюл. № 11

(45) Опубликовано: 09.07.2019 Бюл. № 19

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 13.10.2015

(86) Заявка РСТ:
US 2014/026824 (13.03.2014)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2014/160490 (02.10.2014)

Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, стр. 3, ООО
"Юридическая фирма Городисский и
Партнеры"

(72) Автор(ы):

ГОКАРН Ятин (US),
ЗАРРАГА Исидро Е. (US),
ЗАРЗАР Джонатан (US),
ПАТАПОФФ Томас (US)

(73) Патентообладатель(и):
ДЖЕНЕНТЕК, ИНК. (US)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: US 20110226650 A1, 22.09.2011.
SCHULE S., et al., Stabilization of IgG1 in
spray-dried powders for inhalation. Eur J Pharm
Biopharm. 2008 Aug; 69(3): 793-807. doi:
10.1016/j.ejpb.2008.02.010. Epub 2008 Feb 19.
RU 2426554 C2, 20.08.2011. SEHN LH., et al.,
A phase 1 study of obinutuzumab induction
followed by 2 years of maintenance in patients
with (см. прод.)

(54) СОСТАВЫ АНТИТЕЛ

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к медицине и
касается стабильного водного фармацевтического
состава, где состав содержит (а) моноклональное
антитело в количестве от 45 мг/мл до 55 мг/мл;
(б) трегалозу в количестве от 50 мМ до 70 мМ и
(с) фосфат натрия в количестве от 22 мМ до 28
мМ, где pH указанного состава составляет от 5,9
до 6,5, где указанное антитело представляет собой
бевацизумаб. Группа изобретений также касается
промышленного изделия, предназначенного для

лечения злокачественной опухоли у индивидуума,
содержащего контейнер, содержащий указанный
состав; способа получения указанного состава;
способа лечения злокачественной опухоли у
индивидуума, включающего введение указанного
состава. Группа изобретений обеспечивает
уменьшение образования агрегатов и снижение
образования хвостовых димеров в составах
антител. 5 н. и 37 з.п. ф-лы, 2 пр., 7 ил., 3 табл.

(56) (продолжение):

relapsed CD20-positive B-cell malignancies. *Blood*. 2012 May 31; 119(22): 5118-25. doi: 10.1182/blood-2012-02-408773. Epub 2012 Mar 20.

R U 2 6 9 4 0 5 5 C 2

R U 2 6 9 4 0 5 5 C 2

R U
C 2
5 0 5 5
2 6 9 4 0 5 5
C 2

RUSSIAN FEDERATION



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19)

RU

(11)

2 694 055

⁽¹³⁾ C2

(51) Int. Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 47/26 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

A61K 39/395 (2013.01); A61K 47/26 (2013.01); A61P 35/00 (2019.02)

(21)(22) Application: 2015143607, 13.03.2014

(24) Effective date for property rights:
13.03.2014

Registration date:
09.07.2019

Priority:

(30) Convention priority:
13.03.2013 US 61/780,899

(43) Application published: 20.04.2017 Bull. № 11

(45) Date of publication: 09.07.2019 Bull. № 19

(85) Commencement of national phase: 13.10.2015

(86) PCT application:
US 2014/026824 (13.03.2014)

(87) PCT publication:
WO 2014/160490 (02.10.2014)

Mail address:
129090, Moskva, ul. B. Spasskaya, 25, str. 3, OOO
"Yuridicheskaya firma Gorodisskij i Partnery"

(72) Inventor(s):

GOKARN Yatin (US),
ZARRAGA Isidro E. (US),
ZARZAR Dzhonatan (US),
PATAPOFF Tomas (US)

(73) Proprietor(s):

DZHENENTEK, INK. (US)

R U
2 6 9 4 0 5 5

C 2

(54) COMPOSITIONS OF ANTIBODIES

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: group of inventions refers to medicine and concerns a stable aqueous pharmaceutical composition, where the composition contains (a) a monoclonal antibody in amount of 45 mg/ml to 55 mg/ml; (b) trehalose in amount of 50 mM to 70 mM and (c) sodium phosphate in amount of 22 mM to 28 mM, wherein the pH of said composition ranges from 5.9 to 6.5, where said antibody is bevacizumab. Group of inventions also relates to an industrial article for treating

a malignant tumour in an individual comprising a container containing said composition; a method of producing said composition; method of treating a malignant tumour in an individual involving administering said composition.

EFFECT: group of inventions provides reduced formation of aggregates and reduced formation of tail dimers in antibody compositions.

42 cl, 2 ex, 7 dwg, 3 tbl

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] По настоящей заявке испрашивается приоритет предварительной заявки США № 61/780899, зарегистрированной 13 марта 2013 года, таким образом, полностью включенной посредством ссылки.

5 ПРЕДОСТАВЛЕНИЕ СПИСОКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ В ТЕКСТОВОМ ФАЙЛЕ ASCII

[0002] Содержание следующего ниже предоставления в текстовом файле ASCII полностью включено в настоящее описание посредством ссылки: машиночитаемая форма (CRF) списка последовательностей (название файла: 146392012440SEQLIST.txt, 10 дата регистрации: 11 марта 2014 года, размер: 27 KB).

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0003] Настоящее изобретение относится к стабильным водным фармацевтическим составам, содержащим антитела.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ, ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ ИЗОБРЕТЕНИЮ

[0004] В последние годы успехи биотехнологии обеспечили возможность получения ряда белков для фармацевтических применений с использованием технологий рекомбинантной ДНК. Вследствие того, что белки являются более крупными и более сложными, чем общепринятые органические и неорганические лекарственные средства (например, содержащие многие функциональные группы в дополнение к сложным 20 трехмерным структурам), состав таких белков вызывает определенные трудности. Для белка для сохранения биологической активности состав может сохранять интактную конформационную целостность по меньшей мере коровой последовательности аминокислот белка, при этом одновременно защищая многие функциональные группы белка от разрушения. Пути разрушения белков могут включать химическую 25 нестабильность (например, любой процесс, который включает модификацию белка путем образования связи или расщепления, приводящего к новому химическому соединению) или физическую нестабильность (например, изменения структуры высшего порядка белка). Химическая нестабильность может приводить к дезамидированию, рацемизации, гидролизу, окислению, бета-элиминации или дисульфидному обмену. 30 Физическая нестабильность может приводить, например, к денатурации, агрегации, осаждению или адсорбции. Три наиболее общих пути разрушения белка представляют собой агрегацию, дезамидирован и окисление. Cleland et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 10(4): 307-377 (1993).

[0005] К белкам, используемым для фармацевтических применений, относятся 35 антитела. Для фармацевтических антител были разработаны стабильные водные составы. См., например, WO 2011/084750. В данной области все еще существует необходимость в стабильном водном фармацевтическом составе, содержащем антитело, такое как антитело против VEGF и антитело против CD20, которое уменьшает образование димеров, растворимых агрегатов и частиц.

40 CD20 и антитела против CD20

[0006] Молекула CD20 (также называемая ограниченный В-лимфоцитами человека антиген дифференцировки или Br35) представляет собой гидрофобный трансмембранный белок с молекулярной массой приблизительно 35 кДа, локализованный на предшественниках В-лифоцитов и зрелых В-лимфоцитах (Valentine 45 M.A. et al., J. Biol. Chem., 264(19) (1989) 11282-11287, и Einfield D.A. et al., (1988) EMBO J., 7(3):711-717; Tedder T.F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85 (1988) 208-12; Stamenkovic I. et al., J. Exp. Med., 167 (1988) 1975-80; Tedder T.F. et al., J. Immunol., 142 (1989) 2560-8). CD20 обнаружен на поверхности более 90% В-клеток из периферической крови или

лимфоидных органов и экспрессируется во время развития ранних предшественников В-клеток и сохраняется вовремя дифференцировки плазматических клеток. CD20 содержится как в нормальных В-клетках, так и в злокачественных В-клетках. В частности, CD20 экспрессируется при более чем 90% В-клеточных неходжкинских лимфом (NHL) (Anderson K.C. et al., Blood, 63(6) (1984) 1424-1433)), но не встречается в гемопоэтических стволовых клетках, про-В-клетках, нормальных плазматических клетках или других нормальных тканях (Tedder T.F. et al., J. Immunol., 135(2) (1985) 973-979).

[0007] Карбокси-концевая область белка CD20 длиной 85 аминокислот располагается

10 в цитоплазме. Длина этой области отличается от длины других специфических для поверхности В-клеток структур, таких как тяжелые цепи IgM, IgD и IgG или антигены гистосовместимости класса II или β -цепи, которые содержат относительно короткие внутрицитоплазматические области 3, 3, 28, 15 и 16 аминокислот, соответственно (Komaromy M. et al., NAR 11 (1983) 6775-6785). Из 61 карбокси-концевых аминокислот 15 21 представляют собой кислотные остатки, при этом только 2 представляют собой основания, свидетельствуя о том, что эта область обладает сильным отрицательным суммарным зарядом. Номер доступа GeneBank представляет собой NP-690605. Полагают, что CD20 может участвовать в регуляции раннего этапа(ов) процессов активации и дифференцировки В-клеток (Tedder T.F. et al., Eur. J. Immunol. 16 (8) (1986) 881-887) и 20 может функционировать как ионный кальциевый канал (Tedder, T.F. et al., J. Cell Biochem. 14D (1990) 195).

[0008] Существует два различных типа антител против CD20, значительно различающихся их способом связывания с CD20 и видами биологической активности (Cragg M.S. et al., Blood, 103 (2004) 2738-2743, и Cragg M.S. et al., Blood, 101 (2003) 1045-

25 Антитела I типа, такие как, например, ритуксимаб (нефукозилированное, гликоинженерное антитело с нормальным паттерном гликозилирования, также называемое "RTX"), являются эффективными при опосредованной комплементом цитотоксичности, тогда как антитела типа II, такие как, например, тозитумомаб (B1), 11B8, AT80 или 30 гуманизированные антитела B-Ly1, эффективно индуцируют гибель клетки-мишени путем независимым от каспазы апоптозом с сопутствующим раскрытием фосфатидилсерина.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0009] В одном из аспектов изобретение относится к стабильному водному фармацевтическому составу, где состав содержит моноклональное антитело, трегалозу 35 и буфер, где массовое отношение моноклонального антитела к трегалозе в составе составляет приблизительно от 1,65 приблизительно до 4,95, и где pH состава составляет приблизительно от 5,5 приблизительно до 7,0. В некоторых вариантах осуществления массовое отношение моноклонального антитела к трегалозе составляет приблизительно от 1,65 приблизительно до 3,30. В некоторых вариантах осуществления массовое 40 отношение моноклонального антитела к трегалозе составляет приблизительно от 1,70 приблизительно до 2,91. В некоторых вариантах осуществления массовое отношение моноклонального антитела к трегалозе составляет приблизительно от 2,00 приблизительно до 3,30. В некоторых вариантах осуществления массовое отношение моноклонального антитела к трегалозе представляет собой приблизительно любую 45 величину из 1,65, 1,70, 1,80, 1,90, 2,00, 2,08, 2,10, 2,20, 2,30, 2,31, 2,38, 2,40, 2,48, 2,50, 2,60, 2,70, 2,80, 2,90, 2,91, 3,00, 3,10, 3,20, 3,30, 3,40, 3,50, 3,70, 3,80, 3,90, 4,00, 4,10, 4,20, 4,30, 4,40, 4,50, 4,60, 4,70, 4,80, 4,90 и 4,95, включая каждое значение в диапазоне этих чисел. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело в составе содержится

в диапазоне приблизительно от 25 мг/мл приблизительно до 100 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело в составе содержится в диапазоне приблизительно от 45 мг/мл приблизительно до 55 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело в составе содержится в диапазоне

- 5 приблизительно от 35 мг/мл приблизительно до 75 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления трегалоза в составе содержится в диапазоне приблизительно от 40 мМ приблизительно до 120 мМ. В некоторых вариантах осуществления трегалоза в составе содержится в диапазоне приблизительно от 50 мМ приблизительно до 70 мМ. В некоторых вариантах осуществления трегалоза в составе содержится в диапазоне
- 10 приблизительно от 40 мМ приблизительно до 80 мМ. В некоторых вариантах осуществления буфер содержится в количестве приблизительно от 15 мМ приблизительно до 35 мМ. В некоторых вариантах осуществления буфер представляет собой гистидин или фосфат натрия.

[0010] В другом аспекте изобретение относится к стабильным водным

- 15 фармацевтическим составам, содержащим (а) моноклональное антитело в количестве приблизительно от 25 мг/мл приблизительно до 100 мг/мл; (б) трегалозу в количестве приблизительно от 40 мМ приблизительно до 120 мМ и (с) фосфат натрия в количестве приблизительно от 15 мМ приблизительно до 35 мМ, где pH указанного состава составляет pH приблизительно от 5,5 приблизительно до 7,0, и необязательное
- 20 поверхностно-активное вещество. В некоторых вариантах осуществления массовое отношение моноклонального антитела к трегалозе в составе составляет приблизительно от 1,65 приблизительно до 3,30. В некоторых вариантах осуществления массовое отношение моноклонального антитела к трегалозе составляет приблизительно от 1,70 приблизительно до 2,91. В некоторых вариантах осуществления массовое отношение
- 25 моноклонального антитела к трегалозе составляет приблизительно от 2,00 приблизительно до 3,30. В некоторых вариантах осуществления массовое отношение моноклонального антитела к трегалозе составляет приблизительно любую величину из 1,65, 1,70, 1,80, 1,90, 2,00, 2,08, 2,10, 2,20, 2,30, 2,31, 2,38, 2,40, 2,48, 2,50, 2,60, 2,70, 2,80, 2,90, 2,91, 3,00, 3,10, 3,20, 3,30, 3,40, 3,50, 3,70, 3,80, 3,90, 4,00, 4,10, 4,20, 4,30, 4,40, 4,50,
- 30 4,60, 4,70, 4,80, 4,90 и 4,95, включая каждое значение в диапазоне этих чисел.

[0011] В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело в составе, описанное в настоящем описании, содержится в количестве приблизительно от 30 мг/мл приблизительно до 90 мг/мл, приблизительно от 35 мг/мл приблизительно до 85 мг/мл, приблизительно 35 мг/мл до 75 мг/мл, приблизительно от 40 мг/мл приблизительно

- 35 до 80 мг/мл, приблизительно от 45 мг/мл приблизительно до 70 мг/мл или приблизительно от 45 мг/мл приблизительно до 55 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело в составе составляет приблизительно 25 мг/мл, приблизительно 30 мг/мл, приблизительно 35 мг/мл, приблизительно 40 мг/мл, приблизительно 45 мг/мл, приблизительно 50 мг/мл, приблизительно 55 мг/мл,
- 40 приблизительно 60 мг/мл, приблизительно 65 мг/мл, приблизительно 70 мг/мл, приблизительно 75 мг/мл, приблизительно 80 мг/мл, приблизительно 85 мг/мл, приблизительно 90 мг/мл, приблизительно 95 мг/мл или приблизительно 100 мг/мл, включая каждое значение в диапазоне этих чисел. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело в составе составляет приблизительно 45 мг/мл,
- 45 приблизительно 50 мг/мл или приблизительно 55 мг/мл.

[0012] В некоторых вариантах осуществления состав, описываемый в настоящем описании, содержит трегалозу приблизительно от 40 мМ приблизительно до 110 мМ, приблизительно от 45 мМ приблизительно до 110 мМ, приблизительно от 50 мМ

приблизительно до 100 мМ, приблизительно от 50 мМ приблизительно до 90 мМ, приблизительно от 50 мМ приблизительно до 70 мМ или приблизительно от 40 мМ приблизительно до 80 мМ. В некоторых вариантах осуществления трегалоза в составе составляет приблизительно 40 мМ, приблизительно 45 мМ, приблизительно 50 мМ,

5 приблизительно 55 мМ, приблизительно 65 мМ, приблизительно 70 мМ, приблизительно 75 мМ, приблизительно 80 мМ, приблизительно 85 мМ, приблизительно 90 мМ, приблизительно 95 мМ, приблизительно 100 мМ, приблизительно 105 мМ, приблизительно 110 мМ, приблизительно 115 мМ, или приблизительно 120 мМ, включая каждое значение в диапазоне этих чисел. В некоторых вариантах осуществления

10 трегалоза в составе составляет приблизительно 50 мМ, приблизительно 55 мМ, приблизительно 60 мМ или приблизительно 65 мМ. В некоторых вариантах осуществления состав содержит фосфат натрия в качестве буфера. В некоторых вариантах осуществления фосфат натрия в составе составляет приблизительно от 15 мМ приблизительно до 30 мМ, приблизительно 20 мМ до 30 мМ, приблизительно от

15 22 мМ приблизительно до 28 мМ. В некоторых вариантах осуществления фосфат натрия в составе составляет приблизительно 15 мМ, приблизительно 20 мМ, приблизительно 22 мМ, приблизительно 25 мМ, приблизительно 28 мМ, приблизительно 30 мМ, или приблизительно 35 мМ, включая каждое значение в диапазоне этих чисел. В некоторых вариантах осуществления состав содержит моноклональное антитело в количестве

20 приблизительно от 45 мг/мл приблизительно до 55 мг/мл, трегалозу в количестве приблизительно от 50 мМ приблизительно до 70 мМ и фосфат натрия в количестве от 22 мМ приблизительно до 28 мМ. В некоторых вариантах осуществления состав содержит моноклональное антитело в количестве приблизительно от 45 мг/мл приблизительно до 55 мг/мл, трегалозу в количестве приблизительно от 50 мМ

25 приблизительно до 70 мМ и фосфат натрия в количестве от 22 мМ приблизительно до 28 мМ, где массовое отношение антитела к трегалозе составляет приблизительно от 1,70 приблизительно до 2,91. В некоторых вариантах осуществления состав содержит моноклональное антитело в количестве приблизительно 50 мг/мл, трегалозу в количестве приблизительно 60 мМ и фосфат натрия в количестве приблизительно 25 мМ. В

30 некоторых вариантах осуществления состав содержит гистидин (такой как L-гистидин) в качестве буфера. В некоторых вариантах осуществления гистидин в составе составляет приблизительно от 15 мМ приблизительно до 30 мМ, приблизительно 20 мМ до 30 мМ, приблизительно от 22 мМ приблизительно до 28 мМ. В некоторых вариантах осуществления гистидин в составе составляет приблизительно 15 мМ, приблизительно

35 20 мМ, приблизительно 22 мМ, приблизительно 25 мМ, приблизительно 28 мМ, приблизительно 30 мМ или приблизительно 35 мМ, включая каждое значение в диапазоне этих чисел. В некоторых вариантах осуществления состав содержит моноклональное антитело в количестве приблизительно 50 мг/мл, трегалозу в количестве приблизительно 40 мМ и гистидин в количестве приблизительно 20 мМ.

40 [0013] В некоторых вариантах осуществления состав, описываемый в настоящем описании, дополнительно содержит поверхностно-активное вещество. В некоторых вариантах осуществления поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат (такой как полисорбат 20) или полоксамер (такой как полоксамер 188). В некоторых вариантах осуществления концентрация поверхностно-активного вещества

45 составляет приблизительно от 0,01% приблизительно до 0,1%, приблизительно от 0,01% приблизительно до 0,05% или приблизительно от 0,02% приблизительно до 0,04%. В некоторых вариантах осуществления концентрация поверхностно-активного вещества составляет приблизительно 0,01%, приблизительно 0,02%, приблизительно 0,03%,

приблизительно 0,04%, приблизительно 0,05% или приблизительно 0,1%, включая каждое значение в диапазоне этих чисел.

[0014] В некоторых вариантах осуществления pH состава, описываемого в настоящем описании, составляет приблизительно от 5,5 приблизительно до 6,5, приблизительно от 5,8 приблизительно до 6,8, приблизительно от 5,9 приблизительно до 6,5, приблизительно от 6,0 приблизительно до 6,5, приблизительно от 6,0 приблизительно до 6,4 или приблизительно от 6,0 приблизительно до 6,2. В некоторых вариантах осуществления pH состава составляет приблизительно 5,6, приблизительно 5,8, приблизительно 5,9, приблизительно 6,0, приблизительно 6,2, приблизительно 6,4, приблизительно 6,5, приблизительно 6,8 или приблизительно 7,0, включая каждое значение в диапазоне этих чисел.

[0015] В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело в составе, описанном в настоящем описании, не подвергают предварительной лиофилизации. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело представляет собой полноразмерное антитело. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело представляет собой IgG1, IgG2 или IgG4. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело представляет собой гуманизированное антитело, химерное антитело или антитело человека. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело представляет собой фрагмент антитела, содержащий антигенсвязывающую область. В некоторых вариантах осуществления фрагмент антитела представляет собой фрагмент Fab или F(ab')₂. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело связывается с VEGF. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой бевацизумаб. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело подвергается агрегации. В некоторых вариантах осуществления состав содержит бевацизумаб в количестве приблизительно от 45 мг/мл приблизительно до 55 мг/мл, трегалозу в количестве приблизительно от 50 mM приблизительно до 70 mM и фосфат натрия в количестве от 22 mM приблизительно до 28 mM, и полисорбат 20 в количестве 0,04%, и pH состава составляет приблизительно от 5,9 приблизительно до 6,5. В некоторых вариантах осуществления состав содержит бевацизумаб в количестве приблизительно от 45 мг/мл приблизительно до 55 мг/мл, трегалозу в количестве приблизительно от 50 mM приблизительно до 70 mM и фосфат натрия в количестве от 22 mM приблизительно до 28 mM, и полисорбат 20 в количестве 0,04%, и pH состава составляет приблизительно от 5,9 приблизительно до 6,5, где массовое отношение антитела к трегалозе составляет приблизительно от 1,70 приблизительно до 2,91. В некоторых вариантах осуществления состав содержит бевацизумаб в количестве приблизительно 50 мг/мл, трегалозу в количестве приблизительно 60 mM, фосфат натрия в количестве приблизительно 25 mM и полисорбат 20 в количестве 0,04%, и pH состава составляет приблизительно 6,2.

[0016] В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело не подвергают предварительной лиофилизации. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело представляет собой полноразмерное антитело. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело представляет собой антитело IgG1, IgG2 или IgG4. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело представляет собой гуманизированное антитело, химерное антитело или антитело человека. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело представляет собой фрагмент антитела, содержащий антигенсвязывающую область. В некоторых вариантах осуществления фрагмент антитела представляет собой фрагмент Fab или F(ab')₂. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело

связывается с CD20. В некоторых вариантах осуществления антитело, которое связывается с CD20, представляет собой гуманизированное антитело B-Ly1, описываемое в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления антитело, которое связывается с CD20, представляет собой антитело, содержащее аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи, выбранной из SEQ ID NO:3-SEQ ID NO:19, и аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO:20. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой обинутузумаб. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело подвергается агрегации. В некоторых вариантах осуществления состав содержит обинутузумаб в количестве приблизительно от 45 мг/мл приблизительно до 55 мг/мл, трегалозу в количестве приблизительно от 50 мМ приблизительно до 70 мМ и фосфат натрия в количестве от 22 мМ приблизительно до 28 мМ, и полисорбат 20 в количестве 0,04%, и pH состава составляет приблизительно от 5,9 приблизительно до 6,5. В некоторых вариантах осуществления состав содержит обинутузумаб в количестве приблизительно 50 мг/мл, трегалозу в количестве приблизительно 60 мМ, фосфат натрия в количестве приблизительно 25 мМ, и полисорбат 20 в количестве 0,04%, и pH состава составляет приблизительно 6,2. В некоторых вариантах осуществления состав содержит обинутузумаб в количестве приблизительно 50 мг/мл, трегалозу в количестве приблизительно 40 мМ, гистидин в количестве приблизительно 20 мМ, и полоксамер 188 в количестве 0,02%, и pH указанного состава составляет pH приблизительно 6,0.

[0017] В некоторых вариантах осуществления состав, описываемый в настоящем описании, является стабильным при -20°C в течение по меньшей мере приблизительно 6 месяцев, по меньшей мере приблизительно 12 месяцев, по меньшей мере приблизительно 15 месяцев, по меньшей мере приблизительно 18 месяцев, по меньшей мере приблизительно 19 месяцев, по меньшей мере приблизительно 20 месяцев или по меньшей мере приблизительно 2 лет. В некоторых вариантах осуществления состав является стерильным. В некоторых вариантах осуществления состав предназначен для введения индивидууму. В некоторых вариантах осуществления состав предназначен для внутривенного (в/в), подкожного (п/к) или внутримышечного (в/м) введения.

[0018] В другом аспекте изобретение относится к промышленным изделиям, содержащим контейнер, содержащий стабильный водный фармацевтический состав, описываемый в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления состав содержит моноклональное антитело, трегалозу и буфер, где массовое отношение указанного моноклонального антитела к указанной трегалозе в составе составляет приблизительно от 1,65 приблизительно до 4,95, и где pH состава составляет приблизительно от 5,5 приблизительно до 7,0. В некоторых вариантах осуществления состав содержит (а) моноклональное антитело в количестве приблизительно от 25 приблизительно до 100 мг/мл; (б) трегалозу в количестве приблизительно от 40 приблизительно до 120 мМ и (с) фосфат натрия в количестве приблизительно от 15 приблизительно до 35 мМ, где pH указанного состава составляет pH приблизительно от 5,5 приблизительно до 7,0, и необязательное поверхностно-активное вещество. В некоторых вариантах осуществления массовое отношение моноклонального антитела к трегалозе в составе составляет приблизительно от 1,65 приблизительно до 3,30. В некоторых вариантах осуществления массовое отношение моноклонального антитела к трегалозе составляет приблизительно от 1,70 приблизительно до 2,91. В некоторых вариантах осуществления массовое отношение моноклонального антитела к трегалозе составляет приблизительно от 2,00 приблизительно до 3,30. В некоторых вариантах осуществления массовое отношение моноклонального антитела к трегалозе в составе

составляет приблизительно любую величину из 1,65, 1,70, 1,80, 1,90, 2,00, 2,08, 2,10, 2,20, 2,30, 2,31, 2,38, 2,40, 2,48, 2,50, 2,60, 2,70, 2,80, 2,90, 2,91, 3,00, 3,10, 3,20, 3,30, 3,40, 3,50, 3,70, 3,80, 3,90, 4,00, 4,10, 4,20, 4,30, 4,40, 4,50, 4,60, 4,70, 4,80, 4,90 и 4,95, включая каждое значение в диапазоне этих чисел.

- 5 [0019] В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело в составе содержится в количестве приблизительно от 30 мг/мл приблизительно до 90 мг/мл, приблизительно от 35 мг/мл приблизительно до 85 мг/мл, приблизительно от 35 мг/мл приблизительно до 75 мг/мл, приблизительно от 40 мг/мл приблизительно до 80 мг/мл, приблизительно от 45 мг/мл приблизительно до 70 мг/мл или приблизительно от 45 мг/мл приблизительно до 55 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело в составе составляет приблизительно 25 мг/мл, приблизительно 30 мг/мл, приблизительно 35 мг/мл, приблизительно 40 мг/мл, приблизительно 45 мг/мл, приблизительно 50 мг/мл, приблизительно 55 мг/мл, приблизительно 60 мг/мл, приблизительно 65 мг/мл, приблизительно 70 мг/мл, приблизительно 75 мг/мл,
- 10 15 приблизительно 80 мг/мл, приблизительно 85 мг/мл, приблизительно 90 мг/мл, приблизительно 95 мг/мл или приблизительно 100 мг/мл, включая каждое значение в диапазоне этих чисел. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело в составе составляет приблизительно 45 мг/мл, приблизительно 50 мг/мл или приблизительно 55 мг/мл.

- 20 [0020] В некоторых вариантах осуществления состав содержит трегалозу приблизительно от 40 мМ приблизительно до 110 мМ, приблизительно от 50 мМ приблизительно до 100 мМ, приблизительно от 50 мМ приблизительно до 90 мМ, приблизительно от 50 мМ приблизительно до 70 мМ, или приблизительно от 40 мМ приблизительно до 80 мМ. В некоторых вариантах осуществления трегалоза в составе составляет приблизительно 40 мМ, приблизительно 45 мМ, приблизительно 50 мМ, приблизительно 55 мМ, приблизительно 65 мМ, приблизительно 70 мМ, приблизительно 75 мМ, приблизительно 80 мМ, приблизительно 85 мМ, приблизительно 90 мМ, приблизительно 95 мМ, приблизительно 100 мМ, приблизительно 105 мМ, приблизительно 110 мМ, приблизительно 115 мМ или приблизительно 120 мМ, включая каждое значение в диапазоне этих чисел. В некоторых вариантах осуществления трегалоза в составе составляет приблизительно 40 мМ, 50 мМ, приблизительно 55 мМ, приблизительно 60 мМ, или приблизительно 65 мМ. В некоторых вариантах осуществления состав содержит фосфат натрия в качестве буфера. В некоторых вариантах осуществления фосфат натрия в составе составляет приблизительно от 15 мМ приблизительно до 30 мМ, приблизительно от 20 мМ до 30 мМ, приблизительно от 22 мМ приблизительно до 28 мМ. В некоторых вариантах осуществления фосфат натрия в составе составляет приблизительно 15 мМ, приблизительно 20 мМ, приблизительно 22 мМ, приблизительно 25 мМ, приблизительно 28 мМ, приблизительно 30 мМ или приблизительно 35 мМ, включая каждое значение в диапазоне этих чисел.
- 25 30 35 40 45 40 45 В некоторых вариантах осуществления состав содержит моноклональное антитело в количестве приблизительно от 45 мг/мл приблизительно до 55 мг/мл, трегалозу в количестве приблизительно от 50 мМ приблизительно до 70 мМ и фосфат натрия в количестве от 22 мМ приблизительно до 28 мМ. В некоторых вариантах осуществления состав содержит моноклональное антитело в количестве приблизительно от 45 мг/мл приблизительно до 55 мг/мл, трегалозу в количестве приблизительно от 50 мМ приблизительно до 70 мМ, и фосфат натрия в количестве от 22 мМ приблизительно до 28 мМ, где массовое отношение антитела к трегалозе составляет приблизительно от 1,70 приблизительно до 2,91. В некоторых вариантах осуществления состав содержит

моноклональное антитело в количестве приблизительно 50 мг/мл, трегалозу в количестве приблизительно 60 мМ и фосфат натрия в количестве приблизительно 25 мМ. В некоторых вариантах осуществления состав содержит гистидин (такой как L-гистидин) в качестве буфера. В некоторых вариантах осуществления гистидин в составе составляет 5 приблизительно от 15 мМ приблизительно до 30 мМ, приблизительно от 20 мМ до 30 мМ, приблизительно от 22 мМ приблизительно до 28 мМ. В некоторых вариантах осуществления гистидин в составе составляет приблизительно 15 мМ, приблизительно 20 мМ, приблизительно 22 мМ, приблизительно 25 мМ, приблизительно 28 мМ, приблизительно 30 мМ, или приблизительно 35 мМ, включая каждое значение в 10 диапазоне этих чисел. В некоторых вариантах осуществления состав содержит моноклональное антитело в количестве приблизительно 50 мг/мл, трегалозу в количестве приблизительно 40 мМ и гистидин в количестве приблизительно 20 мМ.

[0021] В некоторых вариантах осуществления состав дополнительно содержит 15 поверхностно-активное вещество. В некоторых вариантах осуществления поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат (такой как полисорбат 20) или 20 полоксамер (такой как полоксамер 188). В некоторых вариантах осуществления концентрация поверхностно-активного вещества составляет приблизительно от 0,01% приблизительно до 0,1%, приблизительно от 0,01% приблизительно до 0,05% или приблизительно от 0,02% приблизительно до 0,04%. В некоторых вариантах 25 осуществления концентрация поверхностно-активного вещества составляет приблизительно 0,01%, приблизительно 0,02%, приблизительно 0,03%, приблизительно 0,04%, приблизительно 0,05% или приблизительно 0,1%, включая каждое значение в диапазоне этих чисел.

[0022] В некоторых вариантах осуществления pH состава составляет приблизительно 25 от 5,5 приблизительно до 6,5, приблизительно от 5,8 приблизительно до 6,8, приблизительно от 5,9 приблизительно до 6,5, приблизительно от 6,0 приблизительно до 6,5, приблизительно от 6,0 приблизительно до 6,4, или приблизительно от 6,0 приблизительно до 6,2. В некоторых вариантах осуществления pH состава составляет приблизительно 5,6, приблизительно 5,8, приблизительно 5,9, приблизительно 6,0, 30 приблизительно 6,2, приблизительно 6,4, приблизительно 6,5, приблизительно 6,8 или приблизительно 7,0, включая каждое значение в диапазоне этих чисел.

[0023] В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело не подвергают предварительной лиофилизации. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело представляет собой полноразмерное антитело. В некоторых 35 вариантах осуществления моноклональное антитело представляет собой антитело IgG1, IgG2 или IgG4. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело представляет собой гуманизированное антитело, химерное антитело или антитело человека. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело представляет собой фрагмент антитела, содержащий антигенсвязывающую область. 40 В некоторых вариантах осуществления фрагмент антитела представляет собой фрагмент Fab или F(ab')₂. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело связывается с VEGF. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело подвергается агрегации. В некоторых вариантах осуществления состав содержит бевацизумаб в количестве приблизительно от 45 мг/мл приблизительно до 55 мг/мл, трегалозу в количестве приблизительно от 50 мМ приблизительно до 70 мМ, и фосфат 45 натрия в количестве от 22 мМ приблизительно до 28 мМ, и полисорбат 20 в количестве 0,04%, и pH состава составляет приблизительно от 5,9 приблизительно до 6,5. В некоторых вариантах осуществления состав содержит бевацизумаб в количестве

приблизительно от 45 мг/мл приблизительно до 55 мг/мл, трегалозу в количестве приблизительно от 50 мМ приблизительно до 70 мМ, и фосфат натрия в количестве от 22 мМ приблизительно до 28 мМ, и полисорбат 20 в количестве 0,04%, и pH состава составляет приблизительно от 5,9 приблизительно до 6,5, где массовое отношение 5 антитела к трегалозе составляет приблизительно от 1,70 приблизительно до 2,91. В некоторых вариантах осуществления состав содержит бевацизумаб в количестве приблизительно 50 мг/мл, трегалозу в количестве приблизительно 60 мМ, фосфат натрия в количестве приблизительно 25 мМ и полисорбат 20 в количестве 0,04%, и pH состава составляет приблизительно 6,2.

- 10 [0024] В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело не подвергают предварительной лиофилизации. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело представляет собой полноразмерное антитело. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело представляет собой антитело IgG1, IgG2 или IgG4. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело 15 представляет собой гуманизированное антитело, химерное антитело или антитело человека. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело представляет собой фрагмент антитела, содержащий антигенсвязывающую область. В некоторых вариантах осуществления фрагмент антитела представляет собой фрагмент Fab или F(ab')₂. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело 20 связывается с CD20. В некоторых вариантах осуществления антитело, которое связывается с CD20, представляет собой гуманизированное антитело B-Ly1, описываемое в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления антитело, которое связывается с CD20, представляет собой антитело, содержащее аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID NO:3 25 - SEQ ID NO:19, и аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO:20. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой обинутузумаб. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело подвергается агрегации. В некоторых вариантах осуществления состав содержит обинутузумаб в количестве приблизительно от 45 мг/мл приблизительно до 55 мг/мл, трегалозу в количестве приблизительно от 50 мМ приблизительно до 70 мМ, и фосфат 30 натрия в количестве 22 мМ приблизительно до 28 мМ, и полисорбат 20 в количестве 0,04%, и pH состава составляет приблизительно от 5,9 приблизительно до 6,5. В некоторых вариантах осуществления состав содержит обинутузумаб в количестве приблизительно 50 мг/мл, трегалозу в количестве приблизительно 60 мМ, фосфат натрия 35 в количестве приблизительно 25 мМ, и полисорбат 20 в количестве 0,04%, и pH состава составляет приблизительно 6,2. В некоторых вариантах осуществления состав содержит обинутузумаб в количестве приблизительно 50 мг/мл, трегалозу в количестве приблизительно 40 мМ, гистидин в количестве приблизительно 20 мМ, и полоксамер 188 содержится в количестве 0,02%, и pH состава составляет приблизительно 6,0. 40 [0025] В некоторых вариантах осуществления состав является стабильным -20°C в течение по меньшей мере приблизительно 6 месяцев, по меньшей мере приблизительно 12 месяцев, по меньшей мере приблизительно 15 месяцев, по меньшей мере приблизительно 18 месяцев, по меньшей мере приблизительно 19 месяцев, по меньшей мере приблизительно 20 месяцев или по меньшей мере приблизительно 2 лет. В 45 некоторых вариантах осуществления состав является стерильным. В некоторых вариантах осуществления состав предназначен для введения индивидууму. В некоторых вариантах осуществления состав предназначен для внутривенного (в/в), подкожного (п/к) или внутримышечного (в/м) введения.

[0026] В некоторых вариантах осуществления контейнер представляет собой флакон с пробкой, поддающейся прокалыванию шприцом, где флакон содержит любой из составов, описываемых в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления флакон хранят приблизительно при 2-8°C. В некоторых вариантах осуществления 5 флакон хранят приблизительно при -20°C. В некоторых вариантах осуществления флакон представляет собой 3 куб./см, 20 куб./см или 50 куб./см флакон.

[0027] В другом аспекте изобретение относится к емкостям из нержавеющей стали, содержащим любой из составов, описываемых в настоящем описании, внутри емкости. В некоторых вариантах осуществления состав замораживают.

10 [0028] В другом аспекте изобретение относится к способам снижения агрегации терапевтического моноклонального антитела. В одном из вариантов осуществления способ включает формулирование моноклонального антитела в составе, содержащем трегалозу и буфер, где массовое отношение моноклонального антитела к трегалозе в составе составляет приблизительно от 1,65 приблизительно до 4,95, и где pH состава 15 составляет приблизительно от 5,5 приблизительно до 7,0. В некоторых вариантах осуществления способ включает формулирование антитела в составе, содержащем трегалозу в количестве приблизительно от 40 mM приблизительно до 120 mM и фосфат натрия в количестве приблизительно от 15 mM приблизительно до 35 mM, и где pH указанного состава составляет приблизительно от 5,5 приблизительно до 7,0, где 20 указанное моноклональное антитело формулируют в количестве приблизительно от 25 mg/ml приблизительно до 100 mg/ml в составе.

[0029] В некоторых вариантах осуществления способа, описанного в настоящем описании, массовое отношение указанного моноклонального антитела к указанной трегалозе в составе составляет приблизительно от 1,65 приблизительно до 3,30. В 25 некоторых вариантах осуществления способов, описываемых в настоящем описании, массовое отношение моноклонального антитела к трегалозе составляет приблизительно от 1,70 приблизительно до 2,91. В некоторых вариантах осуществления массовое отношение моноклонального антитела к трегалозе составляет приблизительно от 2,00 приблизительно до 3,30. В некоторых вариантах осуществления массовое отношение 30 моноклонального антитела к трегалозе составляет приблизительно любую величину из 1,65, 1,70, 1,80, 1,90, 2,00, 2,08, 2,10, 2,20, 2,30, 2,31, 2,38, 2,40, 2,48, 2,50, 2,60, 2,70, 2,80, 2,90, 2,91, 3,00, 3,10, 3,20, 3,30, 3,40, 3,50, 3,70, 3,80, 3,90, 4,00, 4,10, 4,20, 4,30, 4,40, 4,50, 4,60, 4,70, 4,80, 4,90 и 4,95, включая каждое значение в диапазоне этих чисел.

[0030] В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело в составе 35 содержится в количестве приблизительно от 30 mg/ml приблизительно до 90 mg/ml, приблизительно от 35 mg/ml приблизительно до 85 mg/ml, приблизительно от 35 mg/ml приблизительно до 75 mg/ml, приблизительно от 40 mg/ml приблизительно до 80 mg/ml, приблизительно от 45 mg/ml приблизительно до 70 mg/ml или приблизительно от 45 mg/ml приблизительно до 55 mg/ml. В некоторых вариантах осуществления моноклональное 40 антитело в составе составляет приблизительно 25 mg/ml, приблизительно 30 mg/ml, приблизительно 40 mg/ml, приблизительно 45 mg/ml, приблизительно 50 mg/ml, приблизительно 55 mg/ml, приблизительно 60 mg/ml, приблизительно 65 mg/ml, приблизительно 70 mg/ml, приблизительно 75 mg/ml, приблизительно 80 mg/ml, приблизительно 85 mg/ml, приблизительно 90 mg/ml, приблизительно 95 mg/ml, или 45 приблизительно 100 mg/ml, включая каждое значение в диапазоне этих чисел. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело в составе составляет приблизительно 45 mg/ml, приблизительно 50 mg/ml или приблизительно 55 mg/ml.

[0031] В некоторых вариантах осуществления состав содержит трегалозу

приблизительно от 40 мМ приблизительно до 110 мМ, приблизительно от 50 мМ приблизительно до 100 мМ, приблизительно от 50 мМ приблизительно до 90 мМ, приблизительно от 50 мМ приблизительно до 70 мМ, или приблизительно от 40 приблизительно до 80 мМ. В некоторых вариантах осуществления трегалоза в составе

5 составляет приблизительно 40 мМ, приблизительно 45 мМ, приблизительно 50 мМ, приблизительно 55 мМ, приблизительно 65 мМ, приблизительно 70 мМ, приблизительно 75 мМ, приблизительно 80 мМ, приблизительно 85 мМ, приблизительно 90 мМ, приблизительно 95 мМ, приблизительно 100 мМ, приблизительно 105 мМ, приблизительно 110 мМ, приблизительно 115 мМ, или приблизительно 120 мМ. В

10 некоторых вариантах осуществления трегалоза в составе составляет приблизительно 40 мМ, приблизительно 50 мМ, приблизительно 55 мМ, приблизительно 60 мМ или приблизительно 65 мМ, включая каждое значение в диапазоне этих чисел. В некоторых вариантах осуществления состав содержит фосфат натрия в качестве буфера. В некоторых вариантах осуществления фосфат натрия в составе составляет

15 приблизительно от 15 мМ приблизительно до 30 мМ, приблизительно 20 мМ до 30 мМ, приблизительно от 22 мМ приблизительно до 28 мМ. В некоторых вариантах осуществления фосфат натрия в составе составляет приблизительно 15 мМ, приблизительно 20 мМ, приблизительно 22 мМ, приблизительно 25 мМ, приблизительно 28 мМ, приблизительно 30 мМ или приблизительно 35 мМ, включая каждое значение

20 в диапазоне этих чисел. В некоторых вариантах осуществления состав содержит моноклональное антитело в количестве приблизительно от 45 мг/мл приблизительно до 55 мг/мл, трегалозу в количестве приблизительно от 50 мМ приблизительно до 70 мМ, и фосфат натрия в количестве 22 мМ приблизительно до 28 мМ. В некоторых вариантах осуществления состав содержит моноклональное антитело в количестве

25 приблизительно от 45 мг/мл приблизительно до 55 мг/мл, трегалозу в количестве приблизительно от 50 мМ приблизительно до 70 мМ, и фосфат натрия в количестве 22 мМ приблизительно до 28 мМ, где массовое отношение антитела к трегалозе составляет приблизительно от 1,70 приблизительно до 2,91. В некоторых вариантах осуществления состав содержит моноклональное антитело в количестве приблизительно 50 мг/мл,

30 трегалозу в количестве приблизительно 60 мМ и фосфат натрия в количестве приблизительно 25 мМ. В некоторых вариантах осуществления состав содержит гистидин (такой как L-гистидин) в качестве буфера. В некоторых вариантах осуществления гистидин в составе составляет приблизительно от 15 мМ приблизительно до 30 мМ, приблизительно 20 мМ до 30 мМ, приблизительно от 22 мМ приблизительно

35 до 28 мМ. В некоторых вариантах осуществления гистидин в составе составляет приблизительно 15 мМ, приблизительно 20 мМ, приблизительно 22 мМ, приблизительно 25 мМ, приблизительно 28 мМ, приблизительно 30 мМ или приблизительно 35 мМ, включая каждое значение в диапазоне этих чисел. В некоторых вариантах осуществления состав содержит моноклональное антитело в количестве приблизительно 50 мг/мл,

40 трегалозу в количестве приблизительно 40 мМ и гистидин в количестве приблизительно 20 мМ.

[0032] В некоторых вариантах осуществления состав дополнительно содержит поверхностно-активное вещество. В некоторых вариантах осуществления поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат (такой как полисорбат 20) или

45 полоксамер (такой как полоксамер 188). В некоторых вариантах осуществления концентрация поверхностно-активного вещества составляет приблизительно от 0,01% приблизительно до 0,1%, приблизительно от 0,01% приблизительно до 0,05% или приблизительно от 0,02% приблизительно до 0,04%. В некоторых вариантах

осуществления концентрация поверхностно-активного вещества составляет приблизительно 0,01%, приблизительно 0,02%, приблизительно 0,03%, приблизительно 0,04%, приблизительно 0,05% или приблизительно 0,1%, включая каждое значение в диапазоне этих чисел.

- 5 [0033] В некоторых вариантах осуществления pH состава составляет приблизительно от 5,5 приблизительно до 6,5, приблизительно от 5,8 приблизительно до 6,8, приблизительно от 5,9 приблизительно до 6,5, приблизительно от 6,0 приблизительно до 6,5, приблизительно от 6,0 приблизительно до 6,4 или приблизительно от 6,0 приблизительно до 6,2. В некоторых вариантах осуществления pH состава составляет
- 10 приблизительно 5,6, приблизительно 5,8, приблизительно 5,9, приблизительно 6,0, приблизительно 6,2, приблизительно 6,4, приблизительно 6,5, приблизительно 6,8 или приблизительно 7,0, включая каждое значение в диапазоне этих чисел.

- [0034] В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело не подвергают предварительной лиофилизации. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело представляет собой полноразмерное антитело. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело представляет собой антитело IgG1, IgG2 или IgG4. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело представляет собой гуманизированное антитело, химерное антитело или антитело человека. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело
- 20 представляет собой фрагмент антитела, содержащий антигенсвязывающую область. В некоторых вариантах осуществления фрагмент антитела представляет собой фрагмент Fab или F(ab')₂. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело связывается с VEGF. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело подвергается агрегации. В некоторых вариантах осуществления состав содержит бевацизумаб в количестве приблизительно от 45 мг/мл приблизительно до 55 мг/мл, трегалозу в количестве приблизительно от 50 mM приблизительно до 70 mM и фосфат натрия в количестве от 22 mM приблизительно до 28 mM, и полисорбат 20 в количестве 0,04%, и pH состава составляет приблизительно от 5,9 приблизительно до 6,5. В некоторых вариантах осуществления состав содержит бевацизумаб в количестве
- 25 приблизительно от 45 мг/мл приблизительно до 55 мг/мл, трегалозу в количестве приблизительно от 50 mM приблизительно до 70 mM и фосфат натрия в количестве от 22 mM приблизительно до 28 mM, и полисорбат 20 в количестве 0,04%, и pH состава составляет приблизительно от 5,9 приблизительно до 6,5, где массовое отношение антитела к трегалозе составляет приблизительно от 1,70 приблизительно до 2,91. В
- 30 некоторых вариантах осуществления состав содержит бевацизумаб в количестве приблизительно 50 мг/мл, трегалозу в количестве приблизительно 60 mM, фосфат натрия в количестве приблизительно 25 mM, и полисорбат 20 в количестве 0,04%, и pH состава составляет приблизительно 6,2.
- 35

- [0035] В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело не подвергают предварительной лиофилизации. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело представляет собой полноразмерное антитело. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело представляет собой антитело IgG1, IgG2 или IgG4. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело представляет собой гуманизированное антитело, химерное антитело или антитело человека. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело
- 40 представляет собой фрагмент антитела, содержащий антигенсвязывающую область. В некоторых вариантах осуществления фрагмент антитела представляет собой фрагмент Fab или F(ab')₂. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело
- 45

связывается с CD20. В некоторых вариантах осуществления антитело, которое связывается с CD20, представляет собой гуманизированное антитело B-Ly1, описываемое в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления антитело, которое связывается с CD20, представляет собой антитело, содержащее аминокислотную

- 5 последовательность вариабельной области тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID NO:3 - SEQ ID NO:19, и аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO:20. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой обинутузумаб. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело подвергается агрегации. В некоторых вариантах осуществления состав содержит
- 10 обинутузумаб в количестве приблизительно от 45 мг/мл приблизительно до 55 мг/мл, трегалозу в количестве приблизительно от 50 мМ приблизительно до 70 мМ, и фосфат натрия в количестве от 22 мМ приблизительно до 28 мМ, и полисорбат 20 в количестве 0,04%, и pH состава составляет приблизительно от 5,9 приблизительно до 6,5. В некоторых вариантах осуществления состав содержит обинутузумаб в количестве
- 15 приблизительно 50 мг/мл, трегалозу в количестве приблизительно 60 мМ, фосфат натрия в количестве приблизительно 25 мМ, и полисорбат 20 в количестве 0,04%, и pH состава составляет приблизительно 6,2. В некоторых вариантах осуществления состав содержит обинутузумаб в количестве приблизительно 50 мг/мл, трегалозу в количестве приблизительно 40 мМ, гистидин в количестве приблизительно 20 мМ, и полоксамер
- 20 188 содержится в количестве 0,02%, и pH состава составляет приблизительно 6,0.

[0036] В некоторых вариантах осуществления состав является стабильным -20°C в течение по меньшей мере приблизительно 6 месяцев, по меньшей мере приблизительно 12 месяцев, по меньшей мере приблизительно 15 месяцев, по меньшей мере приблизительно 18 месяцев, по меньшей мере приблизительно 19 месяцев, по меньшей мере приблизительно 20 месяцев или по меньшей мере приблизительно 2 лет. В некоторых вариантах осуществления состав является стерильным. В некоторых вариантах осуществления состав предназначен для введения индивидууму. В некоторых вариантах осуществления состав предназначен для внутривенного (в/в), подкожного (п/к) или внутримышечного(в/м) введения.

- 30 [0037] В другом аспекте изобретение относится к способам получения фармацевтического состава, включающим: (а) получение любого из составов, описываемых в настоящем описании, и (б) проведение оценки физической стабильности, химической стабильности или биологической активности антитела в составе. В некоторых вариантах осуществления физическую стабильность, химическую
- 35 стабильность или биологическую активность антитела в составе оценивают в течение приблизительно 6 месяцев, приблизительно 12 месяцев, приблизительно 18 месяцев или приблизительно 24 месяцев после хранения состава (например, при -20°C или -40°C).

[0038] В другом аспекте изобретение относится к способам лечения заболевания или нарушение у индивидуума, включающим введение любой из составов, описываемых в настоящем описании, индивидууму в количестве, эффективном для лечения заболевания или нарушения. В некоторых вариантах осуществления состав содержит антитело, которое связывается с VEGF. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой бевацизумаб. В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой злокачественную опухоль. В некоторых вариантах осуществления 45 злокачественная опухоль выбрана из колоректального рака, рака легкого, рака молочной железы, злокачественной опухоли почки и глиобластомы.

[0039] В другом аспекте изобретение относится к способам лечения заболевания или нарушения у индивидуума, включающим введение любого из составов, описываемых

в настоящем описании, индивидууму в количестве, эффективном для лечения заболевания или нарушения. В некоторых вариантах осуществления состав содержит антитело, которое связывается с CD20. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой обинутузумаб. В некоторых вариантах осуществления заболевания 5 представляет собой злокачественную опухоль. В некоторых вариантах осуществления злокачественная опухоль представляет собой злокачественную опухоль, экспрессирующую CD20, например, лимфому, лимфоцитарный лейкоз и множественную миелому.

[0040] Следует понимать, что одно, несколько или все свойства различных вариантов

10 осуществления, описываемых в настоящем описании, можно комбинировать с получением других вариантов осуществления настоящего изобретения. Эти и другие аспекты изобретения станут понятны специалисту в данной области. Эти и другие варианты осуществления изобретения дополнительны описаны посредством подробного описания, которое следует ниже.

15 КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0041] На Фиг. 1 представлен график, демонстрирующий наличие высокомолекулярных соединений в различных составах бевацизумаба при хранении в течение 24 месяцев при температуре -40°C или -20°C.

[0042] На Фиг. 2 представлен график, иллюстрирующий надежные составы 20 бевацизумаба, которые являются устойчивыми к образованию высокомолекулярных соединений несмотря на проводимые условия ускоренной агрегации.

[0043] На Фиг. 3 представлен график, демонстрирующий снижение образования 25 высокомолекулярных соединений в составах бевацизумаба при хранении в течение 24 месяцев. (A) Состав В бевацизумаб (F_B), представленный на фиг. 3A, является устойчивым к образованию агрегатов даже в условиях ускоренной агрегации по сравнению с составом А (F_A) при хранении при -20°C. (B) Хранение составов бевацизумаба при -40°C предотвращало любое увеличение общего образования агрегатов.

[0044] На Фиг. 4 представлена эксклюзионная хроматограмма на колонке, 30 демонстрирующая отсутствие образования хвостового димера (TED) в составе бевацизумаба В (F_B) при хранении в течение 24 месяцев по сравнению с составом А (F_A), который содержит пик, указывающий на образование TED (стрелка).

[0045] На Фиг. 5 представлен график, демонстрирующий образование 35 высокомолекулярных соединений (HM_WS) в составах обинутузумаба, содержащих различные отношения антитело/трегалоза при хранении ниже 0°C в условиях ускоренной агрегации. А) Составы обинутузумаба, которые хранили при -20°C в течение 52 недель. В) Составы обинутузумаба, которые хранили при -40°C в течение 52 недель.

[0046] На Фиг. 6 представлены примеры эксклюзионных хроматограмм выбранных 40 составов обинутузумаба, которые хранили при температуре ниже 0°C в течение 52 недель. F2: 35 мг/мл обинутузумаба, 160 mM трегалозы; F5: 35 мг/мл обинутузумаба, 40 mM трегалозы.

[0047] На Фиг. 7 представлены результаты анализа множественной линейной регрессии (MLR) группы данных по обинутузумабу при хранении -20°C. А) График коэффициентов с масштабированными и центрированными коэффициентами для 45 образования высокомолекулярных соединений (HM_WS) при -20°C. В) График взаимодействий для сMAb*cTreh. С) График контура откликов для HM_WS с сMAb и сTreh в качестве осей и временем, фиксированным на высоком уровне.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

I. Определения

[0048] Перед тем как подробно описывать изобретение, следует понимать, что это изобретение не ограничено конкретными композициями или биологическими системами, которые, как известно, могут изменяться. Также следует понимать, что терминология,

5 используемая в настоящем описании, предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления, и не подразумевают, что она является ограничивающей. Как используют в этом описании и прилагаемой формуле изобретения, формы единственного числа включают ссылки во множественном числе, если из контекста явно не следует иное. Таким образом, например, ссылка на "молекулу" необязательно 10 включает комбинацию двух или более таких молекул и т.п.

[0049] Как используют в настоящем описании, термин "приблизительно" относится к обычному интервалу погрешности соответствующей величины, явно известной специалисту в этой области техники. Ссылка на "приблизительное" значение или параметр в настоящем описании включает (и описывает) варианты осуществления, 15 которые направлены на такое значение или параметр сам по себе.

[0050] Следует понимать, что аспекты и варианты осуществления изобретения, описываемые в настоящем описании, включают "содержащие", "состоящие" и "по существу состоящие" из аспектов и вариантов осуществления.

[0051] Термин "фармацевтический состав" относится к препарату, который находится 20 в такой форме, которая обеспечивает то, что биологическая активность активного ингредиента является эффективной, и который не содержит дополнительных компонентов, которые являются неприемлемо токсичными для индивидуума, которому вводят состав. Такие составы являются стерильными. "Фармацевтически приемлемые" 25 эксципиенты (носители, добавки) представляют собой эксципиенты, которые можно обоснованно вводить являющемуся млекопитающим индивидууму с обеспечением эффективной дозы применяемого активного ингредиента.

[0052] "Стерильный" состав является асептическим или не содержит или по существу не содержит любые живые микроорганизмы и их споры.

[0053] "Замороженный" состав представляет собой состав при температуре ниже 30 0°C. Как правило, замороженный состав не является лиофилизированным, а также его не подвергают предварительной или последующей, лиофилизации. В определенных вариантах осуществления замороженный состав содержит замороженное лекарственное вещество для хранения (в емкости из нержавеющей стали) или замороженной лекарственный продукт (в конфигурации конечного флакона).

[0054] "Стабильный" состав представляет собой состав, в котором белок по существу сохраняет свою физическую стабильность и/или химическую стабильность, и/или биологическую активность при хранении. Предпочтительно состав по существу сохраняет свою физическую и химическую стабильность, а также свою биологическую активность при хранении. Период хранения, как правило, выбирают на основании 35 предполагаемого срока годности состава. Различные аналитические способы измерения стабильности белка доступны в данной области, и их обзор приведен, например в Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991) и Jones A., Adv. Drug Delivery Rev., 10: 29-90 (1993). Стабильность можно измерять при выбранной температуре в течение выбранного периода времени. В 40 определенных вариантах осуществления состав является стабильным приблизительно при 40°C в течение по меньшей мере приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 21, 28 или более суток. В определенных вариантах осуществления состав является стабильным приблизительно при 40°C в течение по меньшей мере приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7,

8 или более недель. В определенных вариантах осуществления состав является стабильным приблизительно при 25°C в течение по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или более месяцев. В определенных вариантах осуществления состав является стабильным приблизительно при 5°C в течение по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или более месяцев. В определенных вариантах осуществления состав является стабильным приблизительно при -20°C в течение по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 или более месяцев. В определенных вариантах осуществления состав является стабильным при 5°C или -20°C в течение по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 или более месяцев. Кроме того, состав предпочтительно является стабильным после замораживания (например, до -20°C, -40°C или -70°C) и оттаивания состава, например, после 1, 2 3, 4 или 5 циклов замораживания и оттаивания. Стабильность можно оценивать количественно и/или качественно рядом различных способов, включая оценку образования агрегатов (например, с использованием эксклюзионной хроматографии, путем измерения мутности и/или путем визуального наблюдения); путем оценки неоднородности заряда с использованием катионообменной хроматографии, капиллярного изоэлектрофокусирования (icIEF) с визуализацией или капиллярного зонного электрофореза; анализ амино-концевых или карбокси-концевых последовательностей; масс-спектроскопический анализ; анализ SDS-PAGE для сравнения восстановленного и интактного антитела; анализ пептидной карты (например, триптической или LYS-C); оценку биологической активности или функции связывания с антигеном антитела и т.д. Нестабильность может включать любое одно или более проявлений из: агрегации, дезамидирования (например, дезамидирования Asn), окисления (например, окисления Met), изомеризации (например, изомеризации Asp), усечения/гидролиза/фрагментации (например, фрагментации шарнирной области), образования сукцинимида, неспаренного цистеина(ов), N-концевого удлинения, C-концевого процессинга, различий гликозилирования и т.д.

[0055] Белок "сохраняет свою физическую стабильность" в фармацевтическом составе, если не выявляют признаков агрегации или выявляют очень незначительную агрегацию, осаждение и/или денатурацию при визуальном исследовании цвета и/или прозрачности, или как измеряют посредством светорассеяния в УФ-области или посредством эксклюзионной хроматографии.

[0056] Белок "сохраняет свою химическую стабильность" в фармацевтическом составе, если химическая стабильность в данный момент времени является такой, что считают, что белок все еще сохраняет свою биологическую активность, как определено выше. Химическую стабильность можно оценивать путем детекции и количественной оценкой химически измененных форм белка. Химическое изменение может включать модификацию размера (например, усечение), которую можно оценивать, например, с использованием эксклюзионной хроматографии, SDS-PAGE и/или времяпролетной масс-спектрометрии с лазерной десорбцией/ионизацией с помощью матрицы (MALDI/TOF MS). Другие типы химического изменения включают изменение заряда (например, возникающее в результате дезамидирования), которое можно оценивать, например, посредством ионообменной хроматографии или icIEF.

[0057] Антитело "сохраняет свою биологическую активность" в фармацевтическом составе, если биологическая активность антитела в данный момент времени находится

в пределах приблизительно 10% (в пределах ошибок анализа) биологической активности, демонстрируемой в тот момент времени, когда получали фармацевтический состав, как определяют, например, в анализе связывания антигенов. Другие анализы "биологической активности" антител подробно описаны ниже в настоящем описании.

⁵ [0058] Как используют в настоящем описании, "биологическая активность" моноклонального антитела относится к способности антитела связываться с антигеном. Она может дополнительно включать связывание антитела с антигеном и обеспечение измеряемого биологического ответа, который можно измерять *in vitro* или *in vivo*. Такая активность может являться антагонистической или агонистической.

¹⁰ [0059] "Дезаминированное" моноклональное антитело в настоящем описании представляет собой антитело, в котором один или более его остатков аспарагина подвергали дериватизации, например, на аспарагиновую кислоту или изоаспарагиновую кислоту.

¹⁵ [0060] Антитело, которое "подвергается дезамидированию" представляет собой антитело, которое содержит один или более остатков, для которых было выявлено, что они могут подвергаться дезаминированию.

[0061] Антитело, которое "подвергается агрегации" представляет собой антитело, для которого было выявлено, что оно агрегирует с другой молекулой(ами) антител, в частности при замораживании и/или перемешивании.

²⁰ [0062] Антитело, которое "подвергается фрагментации" представляет собой антитело, для которого выявляют, что оно расщепляется на два или более фрагментов, например, в его шарнирной области.

[0063] Под "снижением дезамидирования, агрегации или фрагментации" подразумевают предотвращение или снижение количества дезамидирования, агрегации или фрагментации относительно моноклонального антитела, формулируемого в другом составе.

[0064] Антитело, которое формулируют предпочтительно является по существу чистым и желательно по существу гомогенным (например, не содержит загрязняющих белков и т.д.). "По существу чистое" антитело означает композицию, содержащую по меньшей мере приблизительно 90% по массе антитела в пересчете на общую массу композиции, предпочтительно по меньшей мере приблизительно 95% по массе. "По существу гомогенное" антитело означает композицию, содержащую по меньшей мере приблизительно 99% по массе антитела в пересчете на общую массу композиции.

[0065] Под "изотоническим" подразумевают, что осмотическое давление представляющего интерес состава является по существу таким же как в крови человека. Осмотическое давление изотонических составов, как правило, составляет приблизительно от 250 до 350 мОсм. Изотоничность можно измерять с использованием осмометра, например, типа давления пара или точки замерзания.

[0066] Как используют в настоящем описании, "буфер" относится к буферному раствору, который препятствует изменениям pH посредством действия своих кислотно-основных компонентов конъюгата. pH буфера по настоящему изобретению предпочтительно находится в диапазоне приблизительно от 4,5 приблизительно до 7,0, предпочтительно приблизительно от 5,6 приблизительно до 7,0, например, от 5,6 до 6,9, от 5,7 до 6,8, от 5,8 до 6,7, от 5,9 до 6,6, от 5,9 до 6,5, от 6,0 до 6,4 или от 6,1 до 6,3. ⁴⁵ В одном из вариантов осуществления pH буфера составляет 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 или 7,0. Например, фосфат натрия представляет собой пример буферов, которые регулируют pH в этом диапазоне.

[0067] Как используют в настоящем описании, "поверхностно-активное вещество"

относится к поверхность-активному средству, предпочтительно неионному поверхности-активному веществу. Примеры поверхности-активных веществ в настоящем описании включают полисорбат (например, полисорбат 20 и полисорбат 80); полоксамер (например, полоксамер 188); Triton; додецилсульфат натрия (SDS);

- 5 лаурелсульфат натрия; октилгликозид натрия; лаурил-, миристил-, линолеил- или стеарилсульфобетаин; лаурил-, миристил-, линолеил- или стеарилсарказин; линолеил-, миристил-, или цетилбетаин; лауроамидолпропил-, кокамидопропил-, линолеамидолпропил-, миристамидопропил-, пальмидопропил- или изостеарамидопропилбетаин (например, лауроамидолпропил); миристамидопропил-,
- 10 пальмидопропил- или изостеарамидопропилдиметиламин; метилкокоилтаурат натрия или метилолеилтаурат динатрия и серию MONAQUAT™ (Mona Industries, Inc., Paterson, N.J.); полиэтилгликоль, полипропилгликоль и сополимеры этиленгликоля и пропиленгликоля (например, плюроники, PF68 и т.д.) и т.д. В одном из вариантов осуществления поверхности-активное вещество в настоящем описании представляет собой полисорбат 20.
- 15

[0068] В фармакологическом смысле в контексте изобретения "терапевтически эффективное количество" антитела относится к количеству, эффективному при профилактике или лечении нарушения, для лечения которого антитело является эффективным. "Нарушение" представляет собой любое состояние, для которого лечение

- 20 антителом будет являться эффективным. Оно включает хронические и острые нарушения или заболевания, включая такие патологические состояния, которые предрасполагают млекопитающее к рассматриваемому нарушению.

[0069] "Консервант" представляет собой соединение, которое можно необязательно вводить в состав по существу для снижения бактериального действия в нем, таким образом, облегчая получение, например, многократно используемого состава. Примеры потенциальных консервантов включают хлорид октадецилдиметилбензиламмония, хлорид гексаметония, хлоридベンзалкония (смесь хлоридов алкилбензилдиметиламмония, в которых алкильные группы являются длинноцепочечными соединениями) и хлоридベンзетония. Другие типы консервантов включают ароматические спирты, такие как фенол, бутил и бензиловый спирт, алкилпараabenы, такие как метилпараaben или пропилпараaben, катехол, резорцинол, циклогексанол, 3-пентанол и мета-крезол. В одном из вариантов осуществления консервант в настоящем описании представляет собой бензиловый спирт.

- 30
 - 35
 - 40
 - 45
- [0070] Как используют в настоящем описании, термин "VEGF" или "VEGF-A" относится к фактору роста клеток эндотелия сосудов человека длиной 165 аминокислот и относится к факторам роста клеток эндотелия сосудов человека длиной 121, 189 и 206 аминокислот, как описано Leung et al., (1989) *Science*, 246:1306, и Houck et al., (1991) *Mol. Endocrin.*, 5:1806, наряду с их природными аллельными и процессированными формами. Термин "VEGF" также относится к VEGF от не являющихся человеком видов, таких как мышь, крыса или примат. В некоторых случаях VEGF от конкретного вида обозначают терминами, такими как hVEGF для человека VEGF, mVEGF для мыши VEGF, и т.д. Термин "VEGF" также используют для обозначения усеченных форм полипептида, содержащего аминокислоты от 8 до 109 или от 1 до 109 фактора роста клеток эндотелия сосудов человека длиной 165 аминокислот. Ссылка на любые такие формы VEGF можно найти в настоящей заявке, например, как "VEGF (8-109)", "VEGF (1-109)" или "VEGF₁₆₅". Положения аминокислот для "усеченного" нативного VEGF нумеруют так, как указано в нативной последовательности VEGF. Например, положение аминокислоты 17 (метионин) в усеченном нативном VEGF также представляет собой

положение 17 (метионин) в нативном VEGF. Усеченный нативный VEGF имеет аффинность связывания с рецепторами KDR и Flt-1, сравнимую с нативным VEGF.

[0071] "Биологическая активность VEGF" включает связывание с любым рецептором VEGF или любую сигнальную активность VEGF, такую как регуляция нормального и 5 аномального ангиогенеза и васкулогенеза (Ferrara and Davis-Smyth (1997) Endocrine Rev., 18:4-25; Ferrara (1999) J. Mol. Med., 77:527-543); поддержание эмбриогенного васкулогенеза и ангиогенеза (Carmeliet et al., (1996) Nature, 380:435-439; Ferrara et al., (1996) Nature, 380: 439-442) и модулирование циклической пролиферации кровеносных сосудов в женских половых путях и в отношении роста костей и формирования хряща (Ferrara et al., (1998) 10 Nature Med., 4:336-340; Gerber et al., (1999) Nature Med., 5:623-628). В дополнение к тому, что он является ангиогенным фактором при ангиогенезе и васкулогенезе, VEGF в качестве плейотропного фактора роста проявляет многие биологические эффекты в отношении других физиологических процессов, таких как выживание эндотелиальных клеток, проницаемость и расширение сосудов, хемотаксис моноцитов и приток кальция 15 (Ferrara and Davis-Smyth (1997), выше и Cebe-Suarez et al. Cell. Mol. Life Sci., 63:601-615 (2006)). Кроме того, в последних исследованиях описывали митогенные эффекты VEGF на несколько не относящихся к эндотелию типов клеток, таких как эпителиальные клетки сетчатки, клетки протока поджелудочной железы и шванновские клетки. Guerrin et al., (1995) J. Cell Physiol., 164:385-394; Oberg-Welsh et al., (1997) Mol. Cell. Endocrinol., 20 126:125-132; Sondell et al., (1999) J. Neurosci., 19:5731-5740.

[0072] "Антагонист VEGF" или "специфический антагонист VEGF" относится к молекуле, способной связываться с VEGF, снижать уровень экспрессии VEGF или нейтрализовать, блокировать, ингибировать, подавлять, снижать или нарушать виды биологической активности VEGF, включая, но, не ограничиваясь ими, связывание VEGF 25 с одним или более рецепторами VEGF и опосредованный VEGF ангиогенез и выживание или пролиферацию эндотелиальных клеток. В число специфических антагонистов VEGF, пригодных в способах по изобретению, входят полипептиды, которые специфически связываются с VEGF, антитела против VEGF и их антигены связывающие фрагменты, молекулы и производные рецепторов, которые специфически связываются с VEGF, таким образом, блокируя его связывание с одним или более рецепторами, слитые белки (например, VEGF-Trap (Regeneron)), и VEGF₁₂₁-гелонин (Peregrine). Специфические 30 антагонисты VEGF также включают варианты антагонистов полипептидов VEGF, антисмыловые олигомеры нуклеиновых оснований, направленные на VEGF, малые молекулы РНК, направленные на VEGF, аптамеры РНК, пептидные антитела и 35 рибозимы против VEGF. Специфические антагонисты VEGF также включают непептидные низкомолекулярные соединения, которые связываются с VEGF и способны блокировать, ингибировать, подавлять, снижать или нарушать виды биологической активности VEGF. Таким образом, термин "виды активности VEGF" конкретно включает опосредованные VEGF виды биологической активности VEGF. В определенных 40 вариантах осуществления антагонист VEGF снижает или ингибирует по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более уровень экспрессии или биологическую активность VEGF.

[0073] "Антитело против VEGF" представляет собой антитело, которое связывается с VEGF с достаточной аффинностью и специфичностью. В определенных вариантах 45 осуществления выбранное антитело, как правило, обладает достаточной аффинностью связывания с VEGF, например, антитело может связываться с hVEGF с величиной K_d в диапазоне от 100 нМ⁻¹ до пМ. Аффинности антител можно определять, например,

анализом на основе поверхностного плазмонного резонанса (такого как анализ BIACore, как описано в публикации заявки РСТ № WO2005/012359); твердофазным иммуноферментным анализом (ELISA) и конкурентными анализами (например, RIA).

[0074] В определенном варианте осуществления антитело против VEGF можно

- 5 использовать в качестве терапевтического средства для направленного воздействия и препятствию заболеванием или состояниям, в которые вовлечена активность VEGF. Также, антитело можно подвергать другим анализам биологической активности, например, для оценки его эффективности в качестве терапевтического средства. Такие анализы известны в данной области и зависят от антигена-мишени и назначаемого
- 10 применения антитела. Примеры включают анализ ингибиравания HUVEC; анализы ингибиравания роста опухолевых клеток (например, как описано в WO 89/06692); анализы антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) и обусловленной комплементом цитотоксичности (CDC) (патент США № 5500362); и анализы агонистической активности или гемопоэза (см. WO 95/27062). Антитело против VEGF,
- 15 как правило, не связывается с другими гомологами VEGF, такими как VEGF-B или VEGF-C, также как и другими факторами роста, такими как P1GF, PDGF или bFGF. В одном из вариантов осуществления антитело против VEGF представляет собой моноклональное антитело, которое связывается с тем же эпитопом, что и моноклональное антитело против VEGF A4.6.1, продуцируемые гибридомой ATCC
- 20 HB10709. В другом варианте осуществления антитело против VEGF представляет собой рекомбинантное гуманизированное моноклональное антитело против VEGF, получаемое согласно Presta et al., (1997) Cancer Res., 57:4593-4599, включая, но, не ограничиваясь ими, антитело, известное как бевацизумаб (BV, AVASTIN®).

[0075] Антитело против VEGF "бевацизумаб (BV)", также известное как "rhuMAb

- 25 VEGF" или "AVASTIN®" представляет собой рекомбинантное гуманизированное моноклональное антитело против VEGF, получаемое согласно Presta et al., (1997) Cancer Res. 57:4593-4599. Оно содержит мутантные каркасные области IgG1 человека и антигенсвязывающие определяющие комплементарность области из моноклонального антитела против hVEGF мыши A.4.6.1, которое блокирует связывание VEGF человека
- 30 с его рецепторами. Приблизительно 93% аминокислотной последовательности бевацизумаба, включая большую часть каркасных областей, получают из IgG1 человека и приблизительно 7% последовательности получают из антитела мыши A4.6.1. Молекулярная масса бевацизумаба составляет приблизительно 149000 Дальтон, и он является гликозилированным. Бевацизумаб и другие гуманизированные антитела против
- 35 VEGF дополнительно описаны в патенте США № 6884879, опубликованном 26 февраля 2005 года, полное описание которого явным образом включено в настоящее описание посредством ссылки.

[0076] Как используют в настоящем описании термин "полипептид серии B20"

- 37 относится к полипептиду, включая антитело, которое связывается с VEGF. Полипептиды
- 40 серии B20 включают, но не ограничиваются ими, антитела, получаемые из последовательности антитела B20 или получаемого из B20 антитела, описанного в публикации US № 20060280747, публикация US № 20070141065 и/или публикации US № 20070020267, содержание этих патентных заявок явным образом включено в настоящее описание посредством ссылки. В одном из вариантов осуществления полипептид серий
- 45 B20 представляет собой B20-4.1 как описано в публикации US № 20060280747, публикации US № 20070141065 и/или публикации US № 20070020267. В другом варианте осуществления полипептид серий B20 представляет собой B20-4.1.1, описанный в патент США № 7910098, полное описание которого явным образом включено в настоящее

описание посредством ссылки.

[0077] Как используют в настоящем описании термин "полипептид серии G6" относится к полипептиду, включая антитело, которое связывается с VEGF. Полипептиды серии G6 включают, но не ограничены ими, антитела, получаемые из последовательности 5 антитела G6 или получаемого из G6 антитела, описанного в публикации US № 20060280747, публикации US № 20070141065 и/или публикации US № 20070020267.

Полипептиды серии G6, как описано в публикации US № 20060280747, публикации US № 20070141065 и/или публикации US № 20070020267, включают, но не ограничиваются ими, G6-8, G6-23 и G6-31.

[0078] Касательно дополнительных антител см. патенты США № 7060269, 6582959, 6703020, 6054297, WO98/45332, WO 96/30046, WO94/10202, EP 0666868B1, публикацию патентной заявки США № 2006009360, 20050186208, 20030206899, 20030190317, 20030203409 и 20050112126, и Popkov et al., Journal of Immunological Methods, 288:149-164 (2004). В определенных вариантах осуществления другие антитела включают антитела, 10 которые связываются с функциональным эпитопом на VEGF человека, состоящем из остатков F17, M18, D19, Y21, Y25, Q89, I91, K101, E103 и C104 или, альтернативно, содержащим остатки F17, Y21, Q22, Y25, D63, I83 и Q89.

[0079] Также известны другие антитела против VEGF и описаны, например, у Liang et al., J. Biol. Chem., 281, 951-961 (2006).

[0080] Как используют в настоящем описании, "CD20" относится к В-лимфоцитарному антигену CD20 человека (также известному как CD20, поверхностный антиген В-лимфоцитов B1, Leu-16, Bp35, BM5 и LF5; последовательность охарактеризована записью P11836 в базе данных SwissProt), который представляет собой гидрофобный трансмембранный белок с молекулярной массой приблизительно 35 кДа,

25 локализованный на предшественниках В-лимфоцитов и зрелых В-лимфоцитах. (Valentine M.A. et al., J. Biol. Chem., 264(19) (1989) 11282-11287; Tedder T.F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85 (1988) 208-12; Stamenkovic I. et al., J. Exp. Med., 167 (1988) 1975-80; Einfeld D.A. et al., EMBO J., 7 (1988) 711-7; Tedder T.F. et al., J. Immunol., 142 (1989) 2560-8).

Соответствующий ген человека представляет собой трансмембранные 4-домены,

30 подсемейство A, представитель 1, также известный как MS4A1. Этот ген кодирует представителя семейства трансмембранных генов 4A. Представители этого семейства белков с несформированной конформацией характеризуются общими структурными признаками и сходными границами сплайсинга инtron/экзон и обладают уникальными профилями экспрессии в гематopoэтических клетках и нелимфоидных тканях. Этот ген

35 кодирует молекулу поверхности В-лимфоцитов, которая играет роль в развитии и дифференцировке В-клеток в плазматические клетки. Этот представитель семейства локализован на 11q12, наряду с кластером представителей семейства. Альтернативный сплайсинг этого гена приводит к двум вариантам транскриптов, которые кодируют один и тот белок.

40 [0081] Термины "CD20" и "антigen CD20" используются взаимозаменяющими в настоящем описании и включают любые варианты, изоформы и виды гомологов CD20 человека, которые экспрессируются естественным образом клетками или экспрессируются на клетках, трансфицированных геном CD20. Связывание антитела по изобретению с антигеном CD20 опосредует уничтожение клеток, экспрессирующих CD20 (например, опухолевой клетки) путем инактивации CD20. Уничтожение клеток, экспрессирующих CD20 может происходить по одному или более следующих механизмов: индукция гибели клеток/апоптоз, ADCC и CDC.

[0082] Синонимы CD20, как понимают в данной области, включают В-лимфоцитарный

антиген CD20, поверхностный антиген В-лимфоцитов B1, Leu-16, Bp35, BM5 и LF5.

[0083] Термин "антитело против CD20" по изобретению представляет собой антитело, которое специфически связывается с антигеном CD20. В зависимости от свойств связывания и видов биологической активности антител против CD20 в отношении антигена CD20, можно выделять два типа антител против CD20 (антитела против CD20 I типа и II типа) согласно Cragg M.S. et al., Blood, 103 (2004) 2738-2743, и Cragg M.S. et al., Blood, 101 (2003) 1045-1052, см. таблицу 1.

Таблица 1 Свойства антител против CD20 I типа и II типа	
Антитела против CD20 I типа	Антитела против CD20 II типа
Эпитоп CD20 I типа	Эпитоп CD20 II типа
Локализуют CD20 в липидных рафтах	Не локализуют CD20 в липидных рафтах
Повышенная CDC (в случае изотипа IgG1)	Повышенная CDC (в случае изотипа IgG1)
Антитела против CD20 I типа	Антитела против CD20 II типа
Активность ADCC (в случае изотипа IgG1)	Активность ADCC (в случае изотипа IgG1)
Полная связывающая способность	Сниженная связывающая способность
Гомотипическая агрегация	Более сильная гомотипическая агрегация
Индукция апоптоз при перекрестном сшивании	Значительная индукция гибели клеток без перекрестного сшивания

[0084] Примеры антител против CD20 II типа включают, например, гуманизированное антитело IgG1 B-Ly1 (химерное гуманизированное антитело IgG1, как описано в WO 2005/044859), IgG1 11B8 (как описано в WO 2004/035607), и IgG1 AT80. Как правило, для антител против CD20 II типа изотипа IgG1 демонстрируют характерные свойства CDC. Антитела против CD20 II типа обладают сниженной CDC (в случае изотипа IgG1) по сравнению с антителами I типа изотипа IgG1.

[0085] Примеры антител против CD20 I типа включают, например, ритуксимаб, IgG3 HI47 (ECACC, гибридому), IgG1 2C6 (как описано в WO 2005/103081), IgG12F2 (как описано в WO 2004/035607 и WO 2005/103081) и IgG1 2H7 (как описано в WO 2004/056312).

[0086] Афукозилированные антитела против CD20 по изобретению предпочтительно представляют собой антитела против CD20 II типа, более предпочтительно афукозилированное гуманизированное антитело B-Ly1, как описано в WO 2005/044859 и WO 2007/031875.

[0087] Антитело "ритуксимаб" (эталонное антитело; пример антитела против CD20 I типа) представляет собой получаемый генной инженерией химерный человек константный домен гамма 1 мыши, содержащий моноклональное антитело, направленное против антигена CD20 человека. Однако это антитело не является гликоинженерным и не является афукозилированным и, таким образом, содержит количество фукозы по меньшей мере 85%. Такое химерное антитело содержит константные домены гамма 1 человека, и его идентифицируют по названию "C2B8" в US 5736137 (Andersen et. al.), опубликованном на 17 апреля 1998 года, принадлежащем IDEC Pharmaceuticals Corporation. Ритуксимаб одобрен для лечения пациентов с рецидивирующими или рефрактерной низкой степени злокачественности или фолликулярной, CD20-положительной В-клеточной неходжкинской лимфомы. Исследования механизма действия *in vitro* показали, что ритуксимаб обладает обусловленной комплементом человека цитотоксичностью (CDC) (Reff M.E. et al., Blood, 83(2) (1994) 435-445). Кроме того, он обладает активностью в анализах, в которых измеряют антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC).

[0088] Термин "гуманизированное антитело B-Ly1" относится к гуманизированному

антителу B-Ly1, как описано в WO 2005/044859 и WO 2007/031875, которое получали из мыши моноклонального антитела мыши против CD20 B-Ly1 (вариабельной области тяжелой цепи (VH) мыши: SEQ ID NO:1; вариабельной области легкой цепи мыши (VL): SEQ ID NO:2, см. Poppema S. and Visser L., Biotest Bulletin, 3 (1987) 131-139) химеризацией с константным доменом человека из IgG1 и последующей гуманизацией (см. WO 2005/044859 и WO 2007/031875). Такие "гуманизированные антитела B-Ly1" подробно описаны в WO 2005/044859 и WO 2007/031875.

[0089] В одном из вариантов осуществления "гуманизированное антитело B-Ly1" содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), выбранную из группы SEQ ID NO:3 - SEQ ID NO:19 (B-HH2 - B-HH9 и B-HL8 - B-HL17 WO 2005/044859 и WO 2007/031875). В одном из конкретных вариантом осуществления такой вариабельный домен выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO:3, 4, 7, 9, 11, 13 и 15 (B-HH2, BHH-3, B-HH6, B-HH8, B-HL8, B-HL11 и B-HL13 WO 2005/044859 и WO 2007/031875). В одном из конкретных вариантом осуществления "гуманизированное антитело B-Ly1" содержит вариабельную область легкой цепи (VL) SEQ ID NO:20 (B-KV1 WO 2005/044859 и WO 2007/031875). В одном из конкретных вариантом осуществления "гуманизированное антитело B-Ly1" содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH) SEQ ID NO:7 (B-HH6 WO 2005/044859 и WO 2007/031875) и вариабельную область легкой цепи (VL) SEQ ID NO:20 (B-KV1 WO 2005/044859 и WO 2007/031875). Кроме того в одном из вариантов осуществления гуманизированное антитело B-Ly1 представляет собой антитело IgG1. По изобретению такие афукозилированные гуманизированные антитела B-Ly1 получают гликоинженерией (GE) в Fc-области в соответствии со способами, описанными в WO 2005/044859, WO 2004/065540, WO 2007/031875, Umana P. et al., Nature Biotechnol., 17 (1999) 176-180 и WO 99/154342. В одном из вариантов осуществления афукозилированное глико-инженерное гуманизированное B-Ly1 представляет собой GE B-HH6-B-KV1. В одном из вариантов осуществления антитело против CD20 представляет собой обинутузумаб (рекомендованный INN, WHO Drug Information, Vol. 26, No. 4, 2012, p. 453). Как используют в настоящем описании, обинутузумаб является синонимом GA101 или RO5072759. Он заменяет все предшествующие варианты (например, Vol. 25, No. 1, 2011, p.75-76) и является ранее известным как афутузумаб (рекомендованный INN, WHO Drug Information, Vol. 23, No. 2, 2009, p. 176; Vol. 22, No. 2, 2008, p. 124). В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело B-Ly1 представляет собой антитело, содержащее тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:21, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:22 или ее антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело B-Ly1 содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую три CDR тяжелой цепи SEQ ID NO:21, и вариабельную область легкой цепи, содержащую три CDR легкой цепи SEQ ID NO:22.

Тяжелая цепь (SEQ ID NO:21)

40	QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYAFS YSWINWVRQA PGQGLEWMGR 50
	IFPGDGDTDY NGFKGRVTI TADKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARNV 100
	FDGYWLVYWG QGTLTVSSA STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD 150
	YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFPAVLQSSG LYSLSSVVTV PSSSLGTQTY 200
	ICNVNHKPSN TKVDKKVEPK SCDKTHTCPP CPAPELLGGP SVFLFPPKPK 250
45	DTLMISRTP E VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS 300
	TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV 350
	YTLPPSRDEL TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESENQPE NNYKTPPPVL 400
	DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPGK 449

Легкая цепь (SEQ ID NO:22)

DIVMTQTPLS LPVTPGEPAS ISCRSSKSLL HSNGITYLYW YLQKPGQSPQ 50
 LLIYQMSNLV SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCAQMLELP 100
 YTFGGGTKE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK 150
 5 VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL SSTLTLSKAD YEHKVYACE 200
 VTHQGLSSPV TKSFnRGEC 219

[0090] В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело B-Ly1 представляет собой афукозилированное глико-инженерное гуманизированное B-Ly1. Такие глико-инженерные гуманизированные антитела B-Ly1 содержат измененный профиль гликозилирования в Fc-области предпочтительно со сниженным уровнем остатков фукозы. Предпочтительно количество фукозы составляет 60% или менее от общего количества олигосахаридов при Asn297 (в одном из вариантов осуществления количество фукозы находится в диапазоне от 40% до 60%, в другом варианте осуществления количество фукозы составляет 50% или менее, и в еще одном другом варианте осуществления количество фукозы составляет 30% или менее). Кроме того, предпочтительно олигосахариды Fc-области имеют симметричное разветвление. Такие глико-инженерные гуманизированные антитела B-Ly1 обладают повышенной ADCC.

[0091] Олигосахаридный компонент может существенно влиять на свойства, относящиеся к эффективности терапевтического гликопротеина, включая физическую стабильность, устойчивость к действию протеаз, взаимодействия с иммунной системой, фармакокинетику и специфическую биологическую активность. Такие свойства могут зависеть не только от наличия или отсутствия олигосахаридов, а также от их конкретных структур. Можно сделать некоторые обобщения между структурой олигосахаридов и функцией гликопротеинов. Например, определенные структуры олигосахаридов опосредуют быстрое выведение гликопротеина из кровотока посредством взаимодействий со специфическими углеводсвязывающими белками, тогда как другие могут связываться антителами и инициировать нежелательные иммунные ответы. (Jenkins N. et al., *Nature Biotechnol.*, 14 (1996) 975-81).

[0092] Клетки млекопитающих являются предпочтительными хозяевами для получения терапевтических гликопротеинов, вследствие их способности гликозилировать белки в наиболее совместимой форме для применения у человека. (Cumming D.A. et al., *Glycobiology* 1 (1991) 115-30; Jenkins N. et al., *Nature Biotechnol.*, 14 (1996) 975-81). Бактерии очень редко гликозилируют белки, как и другие типы общепринятых хозяев, таких как дрожжи, нитевидные грибы, клетки насекомых и растений, обеспечивают профили гликозилирования, ассоциированные с быстрым выведением из кровотока, нежелательными иммунными взаимодействиями и в некоторых конкретных случаях со сниженной биологической активностью. В течение последних двух десятилетий среди клеток млекопитающих наиболее широко использовали клетки яичника китайского хомяка (CHO). В дополнение к данным подходящим профилям гликозилирования эти клетки позволяют получать постоянное потомство генетически стабильных, высокопродуктивных клональных линий клеток. Их можно культивировать до высокой плотности в простых биореакторах с использованием не содержащей сыворотки среды, и они обеспечивают возможность разработки безопасных и воспроизводимых биологических способов. Другие широко используемые клетки животных включают клетки почек детенышней хомяка (BHK), миеломные клетки NSO и SP2/0 мыши. В последнее время также тестировали получение с использованием трансгенных животных. (Jenkins N. et al., *Nature Biotechnol.*, 14 (1996) 975-981).

[0093] Все антитела содержат углеводные структуры в консервативных положениях

в константных областях тяжелой цепи, где каждый изотип обладает отличным набором N-связанных углеводных структур, которые различным образом влияют на сборку белка, секрецию или функциональную активность. (Wright A. and Morrison S.L., Trends Biotech., 15 (1997) 26-32). Структура присоединенного N-связанного углевода

- 5 значительно варьирует в зависимости от степени процессинга и может содержать сложные олигосахариды с высоким содержанием маннозы, с множественным разветвлением, а также с двумя ветвями. (Wright A. and Morrison S.L., Trends Biotech., 15 (1997) 26-32). Как правило, существует гетерогенный процессинг сердцевидных олигосахаридных структур, присоединенных на конкретном участке гликозилирования,
- 10 таким образом, что даже моноклональные антитела существуют в виде многих гликоформ. Аналогично, было показано, что основные различия гликозилирования антител возникают между линиями клеток, и даже незначительные различия можно наблюдать для данной линии клеток, выращиваемой в отличных условиях культивирования. (Lifely M.R. et al., Glycobiology, 5(8) (1995) 813-22).

- 15 [0094] Одним из путей получения значительного повышения активности, при сохранении простого способа получения и потенциально устранении значительных, нежелательных побочных эффектов, является усиление природных клеточноопосредованных эффекторных функций моноклональных антител путем конструирования их олигосахаридного компонента, как описано у Umana P. et al., Nature Biotechnol., 17 (1999) 176-180 и в US 6602684. Антитела типа IgG1, наиболее широко используемые антитела в иммунотерапии злокачественной опухоли, представляют собой гликопротеины, которые содержат консервативный N-связанный участок гликозилирования при Asn297 в каждом домене CH2. Два сложных олигосахарида с двумя ветвями, присоединенные к Asn297, скрыты между доменами CH2, образуя
- 25 обширные контакты с полипептидным остовом, и их наличие имеет важное значение для опосредования эффекторных функций антитела, таких как антителозависимая клеточная цитотоксичность (ADCC) (Lifely M.R. et al., Glycobiology, 5 (1995) 813-822; Jefferis R. et al., Immunol. Rev., 163 (1998) 59-76; Wright A. and Morrison S.L., Trends Biotechnol., 15 (1997) 26-32).

- 30 [0095] Ранее было продемонстрировано, что сверхэкспрессия в клетках яичника китайского хомяка (CHO) β (1,4)-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы I11 ("GnTIIIy"), гликозилтрансферазы, катализирующей образование симметрично разветвленных олигосахаридов значительно повышает активность ADCC *in vitro* химерного моноклонального антитела (chCE7) против нейробластомы, продуцируемого
- 35 конструированными клетками CHO. (См. Umana P. et al., Nature Biotechnol., 17 (1999) 176-180, и WO 99/154342, полное содержание которых, таким образом, включено посредством ссылки). Антитело chCE7 принадлежит к большому классу неконъюгированных моноклональных антител, которые обладают высокой аффинностью и специфичностью к опухоли, но обладают слишком низкой активностью,
- 40 чтобы являться клинически пригодными при продукции в стандартных промышленных линиях клеток, не содержащих фермент GnTIII (Umana P. et al., Nature Biotechnol., 17 (1999) 176-180). Исследование впервые продемонстрировало, что значительное повышение активности ADCC можно получать конструированием продуцирующих антитела клеток для экспрессии GnTIII, что также приводило к увеличению
- 45 относительному содержанию ассоциированных с константной областью (Fc), симметрично разветвленных олигосахаридов, включая симметрично разветвленные нефукозилированные олигосахариды, выше уровней, обнаруженных в природных антителах.

[0096] "Лечение" относится к терапевтическому и профилактическому лечению или профилактическим мерам. Нуждающиеся в лечение индивидуумы включают индивидуумов, уже страдающих нарушением, а также индивидуумов, в отношении нарушения у которых необходимо проводить профилактику.

- 5 [0097] "Нарушение" представляет собой любое состояние, для которого лечение будет эффективным, включая, но, не ограничиваясь ими, хронические и острые нарушения или заболевания, включая такие патологические состояния, которые предрасполагают млекопитающее к рассматриваемому нарушению. Нарушения включают ангиогенные нарушения. Как используют в настоящем описании,
- 10 "ангиогенное нарушение" относится к любому состоянию, включающему аномальный ангиогенез или аномальную проницаемость или экссудацию сосудов. Неограничивающие примеры ангиогенных нарушений, подлежащих лечению в настоящем описании, включают злокачественные и доброкачественные опухоли; не являющиеся лейкозами и лимфоидные злокачественные новообразования, и в частности метастазы опухоли
- 15 (злокачественной опухоли).

- [0098] "Аномальный ангиогенез" возникает, когда новые кровеносные сосуды растут избыточно или иным несоответствующим образом (например, где локализация, время, степень или начало ангиогенеза является нежелательным с медицинской точки зрения) при болезненном состоянии или таким, что это вызывает болезненное состояние. В
- 20 некоторых случаях избыточный, неконтролируемый или иным образом несоответствующий ангиогенез возникает, когда происходит рост новых кровеносных сосудов, который способствует усугублению болезненного состояния или вызывает болезненное состояние. Новые кровеносные сосуды могут питать пораженные ткани, разрушать нормальные ткани, и в случае злокачественной опухоли новые сосуды могут
- 25 обеспечивать просачивание опухолевых клеток в кровяное русло и депонирование в других органах (метастазы опухоли). Примеры нарушений, включая аномальный ангиогенез включают, но не ограничиваются ими, злокачественную опухоль, в частности васкуляризованные солидные опухоли и метастатические опухоли (включая рак толстой кишки, рак легкого (в частности мелкоклеточный рак легкого) или рак
- 30 простатальной железы), заболевания, вызываемые неоваскуляризацией глаза, в частности диабетическую слепоту, ретинопатии, преимущественно диабетическую ретинопатию или связанную с возрастом дегенерацию желтого пятна, хориоидальную неоваскуляризацию (CNV), диабетический отек желтого пятна, патологическую миопатию, болезнь Гиппеля-Линдау, гистоплазмоз глаза, окклюзию центральной вены
- 35 сетчатки (CRVO), неоваскуляризацией роговицы, неоваскуляризацией сетчатки глаза и покраснение радужки; псориаз, псориатический артрит, гемангиобластому, такую как гемангиома; воспалительные заболевания почек, такие как гломерулонефрит, в частности мезангимальный пролиферативный гломерулонефрит, гемолитико-уремический синдром, диабетическая нефропатия или гипертонический нефросклероз; различные
- 40 воспалительные заболевания, такие как артрит, в частности ревматоидный артрит, воспалительное заболевание кишечника, псориаз, саркоидоз, атеросклероз артерий и заболевания, возникающие после трансплантатов, эндометриоз или хроническую астму и другие состояния.

- [0099] "Аномальная проницаемость сосудов" возникает, когда ток жидкостей, молекул
- 45 (например, ионов и питательных веществ) и клеток (например, лимфоцитов) между сосудом и внесосудистыми компартментами является избыточным или иным образом несоответствующим (например, где локализация, время, степень или начало ангиогенеза является нежелательным с медицинской точки зрения) при болезненном состоянии или

таким, что это вызывает болезненное состояние. Аномальная проницаемость сосудов может приводить к избыточной или иным образом несоответствующей "утечке" ионов, воды, питательных веществ или клеток через сосудистую систему. В некоторых случаях избыточная, неконтролируемая или иным образом несоответствующая проницаемость сосудов или экссудация сосудов усугубляет или индуцирует состояния болезни, включая, например, отек, ассоциированный с опухолями, включая, например, опухоли головного мозга; асцит, ассоциированный со злокачественными новообразованиями; синдром Мейгса; воспаление легких; нефротический синдром; перикардиальный выпот; плевральный выпот; проницаемость, ассоциированную с сердечно-сосудистыми заболеваниями, такими как состояние после инфарктов миокарда и инсультов, и т.п. Настоящее изобретение предусматривает лечение таких пациентов, у которых развились, или которые подвергаются риску развития заболеваний и нарушений, ассоциированных с аномальной проницаемостью или экссудацией сосудов.

[0100] Термины "клеточное пролиферативное нарушение" и "пролиферативное

нарушение" относятся к нарушениям, которые ассоциированы с некоторой степенью аномальной клеточной пролиферации. В одном из вариантов осуществления клеточное пролиферативное нарушение представляет собой злокачественную опухоль. В одном из вариантов осуществления клеточное пролиферативное нарушение представляет собой опухоль.

[0101] Как используют в настоящем описании, "опухоль" относится к любому росту и пролиферации неопластических клеток, независимо от того, являются ли они злокачественными или доброкачественными, и к любым преканцерозным и злокачественным клеткам и тканям. Как указано в настоящем описании термины "злокачественная опухоль", "злокачественный", "клеточное пролиферативное нарушение", "пролиферативное нарушение" и "опухоль" не являются взаимоисключающими.

[0102] Термины "злокачественная опухоль" и "злокачественный" относятся или описывают физиологическое состояние у млекопитающего, которое, как правило, характеризуется нерегулируемым ростом клеток. Примеры злокачественной опухоли включают, но не ограничиваются ими, карциному, лимфому, бластому, саркому и лейкоз или лимфоидные злокачественные новообразования. Более конкретные примеры таких злокачественных опухолей включают, но не ограничиваются ими, плоскоклеточный рак (например, рак из плоскоклеточного эпителия), рак легкого, включая мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легких, аденоракиному легкого и сквамозную карциному легкого, злокачественную опухоль брюшной полости, гепатоцеллюлярный рак, желудочный рак или рак желудка включая злокачественную опухоль желудочно-кишечного тракта и злокачественную опухоль стромы желудочно-кишечного тракта, рак поджелудочной железы, глиобластому, рак шейки матки, рак яичника, рак печени, рак мочевого пузыря, злокачественную опухоль мочевыводящих путей, гепатому, рак молочной железы, рак толстого кишечника, рак прямой кишки, колоректальный рак, карциному эндометрия или матки, карциному слюнной железы, рак почки или почечный рак, рак предстательной железы, рак женских наружных половых органов, рак щитовидной железы, печеночную карциному, карциному анального канала, карциному полового члена, меланому, поверхностную распространяющуюся меланому, лентиго-меланому, акральные лентигинозные меланомы, узловые меланомы, множественную миелому и В-клеточную лимфому (включая низкой степени злокачественности/фолликулярную неходжкинскую лимфому (NHL); мелкоклеточную лимфоцитарную (SL) NHL; средней степени злокачественности/

фолликулярную NHL; средней степени злокачественности диффузную NHL; высокой степени злокачественности иммунобластную NHL; высокой степени злокачественности лимфобластную NHL; высокой степени злокачественности мелкоклеточная NHL с нерассеченными ядрами; NHL при генерализованной лимфаденопатии; лимфому мантийных клеток; СПИД-ассоциированную лимфому и макроглобулинемию Вальденстрема; хронический лиммоцитарный лейкоз (CLL); острый лимфобластный лейкоз (ALL); волосатоклеточный лейкоз; хронический миелобластный лейкоз и посттрансплантационное лимфопролиферативное нарушение (PTLD), а также аномальную пролиферацию сосудов, ассоциированную с факоматозами, отек (такой как ассоциированный с опухолями головного мозга), синдром Мейгса, рак головного мозга, а также головы и шеи и ассоциированные метастазы. В определенных вариантах осуществления злокачественные опухоли, которые подлежат лечению антителами по изобретению, включают рак молочной железы, колоректальный рак, рак прямой кишки, немелкоклеточный рак легких, глиобластому, неходжкинскую лимфому (NHL), почечно-клеточный рак, рак предстательной железы, рак печени, рак поджелудочной железы, саркому мягких тканей, саркому Капоши, карциноидную карциному, рак головы и шеи, рак яичника, мезотелиома и множественную миелому. В некоторых вариантах осуществления злокачественная опухоль выбрана из: мелкоклеточного рака легких, глиобластомы, нейробластом, меланомы, карциномы молочной железы, рака желудка, колоректального рака (CRC) и печеночноклеточной карциномы. Также в некоторых вариантах осуществления злокачественная опухоль выбрана из: немелкоклеточного рака легких, колоректального рака, глиобластомы и карциномы молочной железы, включая метастатические формы этих злокачественных опухолей.

[0103] Термин "терапия против злокачественной опухоли" относится к терапии, пригодной для лечения злокачественной опухоли. Примеры терапевтических средств против злокачественных опухолей включают, но не ограничиваются ими, например, химиотерапевтические средства, ингибирующие рост средства, цитотоксические средства, средства, используемые при лучевой терапии, антиангиогенные средства, индуцирующие апоптоз средства, антитубулиновые средства и другие средства для лечения злокачественной опухоли, такие как антитела против HER-2, антитела против CD20, антагонист рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) (например, ингибитор тирозинкиназы), ингибитор HER1/EGFR (например, эрлотиниб (TarsevaTM), ингибиторы фактора роста тромбоцитов (например, GleevecTM (иматиниба мезилат)), ингибитор COX-2 (например, целеоксиб), интерфероны, цитокины, антагонисты (например, нейтрализующие антитела), которые связываются с одной или более следующих мишней: ErbB2, ErbB3, ErbB4, PDGFR-бета, BlyS, APRIL, BCMA или receptor(ы) VEGF, TRAIL/Apo2, и другие биологически активные и органические химические средства и т.д. Их сочетания также входят в изобретение.

[0104] "Ангиогенный фактор или средство" представляет собой фактор роста или его receptor, который участвует в стимуляции развития кровеносных сосудов, например, способствуют ангиогенезу, росту эндотелиальных клеток, стабильности кровеносных сосудов и/или васкулогенезу, и т.д. Например, ангиогенные факторы включают, но не ограничиваются ими, например, VEGF и представителей семейства VEGF и их receptorы (VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGFR1, VEGFR2 и VEGFR3), P1GF, семейство PDGF, семейство факторов роста фибробластов (FGF), лиганды TIE (ангиопоэтины, ANGPT1, ANGPT2), TIE1, TIE2, эфирины, Bv8, дельта-подобный лиганд 4 (DLL4), Del-1, факторы роста фибробластов: кислотные (aFGF) и основные (bFGF), FGF4, FGF9, BMP9, BMP10, фоллистатин, гранулоцит колониестимулирующий фактор (G-CSF), GM-CSF, фактор

роста гепатоцитов (HGF)/рассеивающий фактор (SF), интерлейкин-8 (IL-8), CXCL12, лептин, мидкин, нейропилины, NRP1, NRP2, плацентарный фактор роста, тромбоцитарный фактор роста эндотелиальных клеток (PD-ECGF), тромбоцитарный фактор роста, в частности PDGF-BB, PDGFR-альфа или PDGFR-бета, плеотрофин (PTN),
 5 програнулин, пролиферин, трансформирующий фактор роста-альфа (TGF-альфа), трансформирующий фактор роста-бета (TGF-бета), фактор некроза опухоли-альфа (TNF-альфа), Alk1, CXCR4, Notch1, Notch4, Sema3A, Sema3C, Sema3F, Robo4 и т.д. Они дополнительно включают факторы, которые способствуют ангиогенезу, такие как ESM1 и перлекан. Они также включают факторы, которые ускоряют заживление ран,
 10 такие как гормон роста, инсулиноподобный фактор роста-I (IGF-I), VIGF, эпидермальный фактор роста (EGF), множественный EGF-подобный домен 7 (EGFL7), CTGF и представителей его семейства, и TGF-альфа и TGF-бета. См., например, Klagsbrun and D'Amore, (1991) Annu. Rev. Physiol., 53:217-39; Streit and Detmar, (2003) Oncogene 22:3172-3179; Ferrara and Alitalo, (1999) Nature Medicine 5(12):1359-1364; Tonini et al., (2003)
 15 Oncogene, 22:6549-6556 (например, таблицу 1, в которой перечислены известные ангиогенные факторы) и Sato, (2003) Int. J. Clin. Oncol., 8:200-206.

[0105] "Антиангиогенное средство" или "ангиогенный ингибитор" относится к низкомолекулярному веществу, полинуклеотиду (включая, например, ингибирующую РНК (РНКи или миРНК)), полипептиду, выделенному белку, рекомбинантному белку,
 20 антителу или его коньюгатам или слитым белкам, которые ингибируют ангиогенез, васкулогенез или нежелательную проницаемость сосудов непосредственно или последовательно. Следует понимать, что антиангиогенное средство включает такие средства, которые связываются и блокируют ангиогенную активность ангиогенного фактора или его рецептора. Например, антиангиогенное средство представляет собой
 25 антитело или другой антагонист к ангиогенному средству, как определено выше, например, антитела против VEGF-A или против рецептора VEGF-A (например, рецептора KDR или рецептора Flt-1), ингибиторы анти-PDGFR, низкомолекулярные соединения, которые блокируют передачу сигналов рецептора VEGF (например, PTK787/ZK2284, SU6668, SUTENT®/SU11248 (сунитиниба малат), AMG706, или такие как, описанные,
 30 например, в международной патентной заявке WO 2004/113304). Антиангиогенные средства включают, но не ограничиваются ими, следующие средства: ингибиторы VEGF, такие как специфический к VEGF антагонист, ингибитор EGF, ингибиторы EGFR, Erbitux® (цетуксимаб, ImClone Systems, Inc., Branchburg, N.J.), Vectibix® (панитумумаб, Amgen, Thousand Oaks, Calif.), ингибиторы TIE2, ингибиторы IGF1R, ингибиторы COX-II (циклооксигеназы II), ингибиторы MMP-2 (матриксной металлопротеиназы 2) и MMP-9 ингибиторы (матриксной металлопротеиназы 9), CP-547.632 (Pfizer Inc., NY, USA), акситиниб (Pfizer Inc.; AG-013736), ZD-6474 (AstraZeneca), AEE788 (Novartis), AZD-2171), ловушка VEGF (Regeneron/Aventis), ваталаниб (также известный как PTK-787, ZK-222584: Novartis and Schering A G), макуген (пегаптаниб октанатрия, NX-1838, EYE-001, Pfizer Inc./Gilead/Eyetech), IM862 (Cytran Inc. Kirkland, Wash., USA) и ангиозим, синтетический рибозим от Ribozyme (Boulder, Colo.) и Chiron (Emeryville, Calif.) и их сочетания. Другие ингибиторы ангиогенеза включают тромbosпондин 1, тромbosпондин 2, коллаген IV и коллаген XVIII. Ингибиторы VEGF описаны в патентах США № 6534524 и 6235764, которые полностью включены для всех целей. Антиангиогенные средства также
 40 включают нативные ингибиторы ангиогенеза, например, ангиостатин, эндостатин и т.д. См., например, Klagsbrun and D'Amore, (1991) Annu. Rev. Physiol., 53:217-39; Streit and Detmar, (2003) Oncogene, 22:3172-3179 (например, таблицу 3, в которой приведена антиангиогенная терапия при злокачественной меланоме); Ferrara and Alitalo, (1999)

Nature Medicine, 5(12):1359-1364; Tonini et al., (2003) Oncogene, 22:6549-6556 (например, таблицу 2, в которой перечислены известные антиангиогенные факторы) и Sato, (2003) Int. J. Clin. Oncol., 8:200-206 (например, таблицу 1, в которой перечислены, антиангиогенные средства, применяемые в клинических испытаниях).

⁵ [0106] Термин "антиангиогенная терапия" относится к терапии, пригодной для ингибирования ангиогенеза, которая предусматривает введение антиангиогенного средства.

[0107] Как используют в настоящем описании, термин "экспрессирующая CD20 злокачественная опухоль" относится ко всем злокачественным опухолям, в которых ¹⁰ злокачественные клетки экспрессируют антиген CD20. Как используют в настоящем описании, предпочтительно экспрессирующая CD20 злокачественная опухоль относится к лимфомам (предпочтительно В-клеточным неходжкинским лимфомам (NHL)) и лимфоцитарным лейкозам. Такие лимфомы и лимфоцитарные лейкозы включают, например, а) фолликулярные лимфомы, б) мелкоклеточные лимфомы с нерассеченными ¹⁵ ядрами/лимфому Беркитта (включая эндемичную лимфому Беркитта, спорадическую лимфому Беркитта и лимфому, не являющуюся лимфомой Беркитта) с) лимфомы из клеток маргинальной зоны (включая экстранодальную В-клеточную лимфому из клеток маргинальной зоны (лимфомы мукозо-ассоциированной лимфоидной ткани, MALT), нодальную В-клеточную лимфому из клеток маргинальной зоны и лимфому из клеток ²⁰ маргинальной зоны селезенки), д) лимфому мантийных клеток (MCL), е) крупноклеточную лимфому (включая диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLCL), диффузную смешанно-клеточную лимфому, иммунобластную лимфому, первичную медиастинальную В-клеточную лимфому, ангиоцентрическую лимфому-В-клеточную лимфому легких) ф) волосатоклеточный лейкоз, г) ²⁵ лимфоцитарную лимфому, макроглобулинемию Вальденстрема, х) острый лимфоцитарный лейкоз (ALL), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL)/ мелкоклеточную лимфому (SLL), В-клеточный пролимфоцитарный лейкоз, и) неоплазии плазматических клеток, миелому из плазматических клеток, множественную миелому, плазмоцитому), ж) болезнь Ходжкина.

[0108] Более предпочтительно экспрессирующая CD20 злокачественная опухоль представляет собой В-клеточную неходжкинскую лимфому (NHL). В частности, экспрессирующая CD20 злокачественная опухоль представляет собой лимфому мантийных клеток (MCL), острый лимфоцитарный лейкоз (ALL), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому ³⁰ (DLCL), лимфому Беркитта, волосатоклеточный лейкоз, фолликулярную лимфому, множественную миелому, лимфому из клеток маргинальной зоны, посттрансплантационное лимфопролиферативное нарушение (PTLD), ВИЧ-ассоцииированную лимфому, макроглобулинемию Вальденстрема или первичную лимфому ЦНС.

[0109] Как используют в настоящем описании, термин "цитотокическое средство" относится к веществу, которое ингибирует или препятствует функции клеток и/или вызывает гибель или разрушение клеток. Термин предназначен включать радиоактивные изотопы (например, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² и ⁴⁰ радиоактивные изотопы Lu), химиотерапевтические средства (например, метотрексат, адриамицин, алкалоиды барвинка (винクリстин, винбластин, этопозид), доксорубицин, мелфалан, митомицин С, хлорамбуцил, даунорубицин или другие интеркаляторы, ферменты и их фрагменты, такие как нуклеолитические ферменты, антибиотики и токсины, такие как низкомолекулярные токсины или ферментативно активные токсины ⁴⁵

бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения, включая фрагменты и/или их варианты, и различные противоопухолевые средства или средства против злокачественных опухолей, описываемые ниже. Другие цитотоксические средства описаны ниже. Туморицидное средство вызывает разрушение опухолевых клеток.

5 [0110] "Токсин" представляет собой любое вещество, способное оказывать отрицательное действие на рост или пролиферацию клетки.

[0111] "Химиотерапевтическое средство" представляет собой химическое соединение, пригодное для лечения злокачественной опухоли. Примеры химиотерапевтических средств включают алкилирующие средства, такие как тиотепа и циклофосфамид

10 (CYTOXAN®); алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импрусульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбоксон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, включая алтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилентиофосфорамид и триметилмеламин; ацетогенины (в частности буллатацин и буллатацинол); дельта-9-тетрагидроканнабинол (дронабинол, MARINOL®); бета-

15 лапахон; лапахол; колхицины; бетулиновую кислоту; камптотецин (включая синтетический аналог топотекан (HYCAMTIN®), CPT-11 (иринотекан, CAMPTOSAR®), ацетилкамптотецин, скополектин и 9-аминокамптотецин); бриостатин; каллистатин; CC-1065 (включая его синтетические аналоги на основе адозелезина, каразелезина и бизелезина); подофиллотоксин; подофильтиновую кислоту; тенипозид; криптофицины

20 (в частности криптофицин 1 и криптофицин 8); доластатин; дуокарминиц (включая синтетические аналоги, KW-2189 и CB1-TM1); элеутеробин; панкратистатин; саркодиктиин; спонгистатин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, хлорфосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлоретамин, гидрохлорид оксида мехлорэтамина, мелфалан, новэмбихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид,

25 урамустин; нитрозомочевины, такие как кармустин, хлопротоцин, фотемустин, ломустин, нимустин, и ранимустин; антибиотики, такие как ендииновые антибиотики (например, калихимицин, в частности калихимицин гамма II и калихимицин омега II (см., например, Nicolaou et al., Angew. Chem Int'l. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)); CDP323, пероральный ингибитор альфа-4-интегрина; динемицин, включая динемицин А; эсперамицин; а также

30 хромофор неокарциностатина и родственные хромофоры на основе хромопротеинов ендииновых антибиотиков), аклациномицины, актиномицины, аутрамицины, азасерин, блеомицины, кактиномицины, карабицины, карминомицины, карцинофилин, хромомицины, дактиномицины, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин (включая ADRIAMYCIN®, морфолинодоксорубицин, цианоморфолинодоксорубицин,

35 2-пирролинодоксорубицин, инъекции липосом доксорубицина HCl (DOXIL®), дипосомальный доксорубицин TLC D-99 (MYOCET®), пегилированный липосомальный доксорубицин (CAELYX®) и дезоксидоксорубицин), эпирубицин, эзорубицин, идарубицин, марцелломицины, митомицины, такие как митомицин С, миофеноловую кислоту, ногаламицины, оливомицины, пепломицины, порфиромицины, пуромицины,

40 квеламицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат, гемцитабин (GEMZAR®), тегафур (UFTORAL®), капецитабин (XELODA®), эпотилон и 5-фторурацил (5-FU); комбретастатин; аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметрексат; аналоги пуринов, такие как флуадарабин, 6-меркаптопурин,

45 тиамиптирин, тиогуанин; аналоги пиримидинов, такие как анцитабин, азаситидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин; андрогены, такие как калустерон, дромостанолона пропионат, эпитетостанол, мепитиостан, тестолактон; антиадренергические вещества, такие как

- аминоглютетимид, митотан, трилостан; компенсаторы фолиевой кислоты, такие как фролиновая кислота; ацеглатон; фльдофосфамидгликозид; аминолевулиновую кислоту; енилурацил; амсакрин; бестрабуцил; бизантрен; эдатраксат; дефофамин; демеколцин; диазихон; элформитин; ацетат эллиптиния; эпитилон; этоглуцид; нитрат галлия;
- 5 гидроксимочевина; лентинан; лонидайнин; майтанзиноиды, такие как майтанзин и ансамитоцины; митогуазон; митоксанtron; мопиданмол; нитраерин; пентостатин; фенамет; пиарубицин; лозоксанtron; 2-этилгидразид; прокарбазин; полисахаридный комплекс PSK® (JHS Natural Products, Eugene, Oreg.); разоксан; ризоксин; сизофuran; спирогерманий; тенуазоновую кислоту; триазиквон; 2,2',2'-трихлортриэтиламин;
- 10 трихотецины (в частности Т-2 токсин, верракурин А, роридни А и ангуидин); уретан; винdezин (ELDISINE®, FILDESIN®); дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид ("Ara-C"); тиотепа; таксоид, например, паклитаксел (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), состав наночастиц паклитаксила сконструированных на основе альбумина (ABRAXANE™) и доцетаксел
- 15 (TAXOTERE®, Rhome-Poulene Rorer, Antony, France); хлоранбуцил; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; средства на основе платины, такие как цисплатин, оксалиплатин (например, ELOXATIN®) и карбоплатин; алкалоиды барвинка, которые предотвращают образования микротрубочек при полимеризации тубулина, включая винбластин (VELBAN®), винкристин (ONCOVIN®), винdezин (ELDISINE®, FILDESIN®)
- 20 и винорелбин (NAVELBINE®); этопозид (VP-16); ифосфамид; митоксанtron; лейковорин; новантрон; эдатрексат; дауномицин; аминоптерин; ибандронат; ингибитор топоизомеразы RFS 2000; дифторметилорнитин (DMFO); ретиноиды, такие как ретиноевая кислота, включая бексаротен (ТАРГРЕТИН®); бисфосфонаты, такие как клодронат (например, BONEFOS® или OSTAC®), этидронат (DIDROCAL®), NE-58095,
- 25 золедроновую кислоту/золедронат (ZOMETA®), аледронат (FOSAMAX®), памидронат (AREDIA®), тилудронат (SKELID®) или ризедронат (ACTONEL®); троксацитабин (нуклеозидный цитозиновый аналог 1,3-диоксолана); антисмыслов олигонуклеотиды, в частности такие, которые ингибируют экспрессию генов в пути передачи сигнала, вовлеченных в aberrантную клеточную пролиферацию, такую как, например, РКС-
- 30 альфа, Raf, H-Ras, и рецептор эпидермального фактора роста (EGF-R) (например, эрлотиниб (Tarseva™)), и VEGF-A, которые индуцируют клеточную пролиферацию; вакцины, такие как вакцина THERATOPE®, и генотерапевтические вакцины, например, вакцина ALLOVECTIN®, вакцина LEUVECTIN® и вакцина VAXID®; ингибитор топоизомеразы 1 (например, LURTOTECAN®); rmRH (например, ABARELIX®);
- 35 BAY439006 (сорафениб; Bayer); SU-11248 (сунитиниб, SUTENT®, Pfizer); перифосин, ингибитор COX-2 (например, целекоксиб или эторикоксиб), ингибитор протеосом (например, PS341); бортезомиб (VELCADE®); CCI-779; типифарниб (R11577); орафениб, ABT510; ингибитор Bcl-2, такой как облимерсен натрия (GENASENSE®); пиксанtron; ингибиторы EGFR; ингибиторы тирозинкиназ; ингибиторы серин- треониновой киназы,
- 40 такие как рапамицин (сиrolimus, RAPAMUNE®); ингибиторы фарнезилтрансферазы, такие как лонафарниб (SCH 6636, SARASAR™), и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любых соединений указанных выше, а также комбинации двух или более указанных выше соединений, такие как СНОР, сокращенное обозначение комбинированной терапии циклофосфамида, доксорубицина, винкристина и
- 45 преднизолона, и FOLFOX, сокращенное обозначение для схемы лечения оксалиплатином (ELOXATIN™) в сочетании с 5-FU и лейковорином, и фармацевтически приемлем соли, кислоты или производные любого из указанных выше соединений; а также комбинации двух или более указанных выше соединений.

[0112] Как определено в настоящем описании, химиотерапевтические средства включают "противогормональные средства" или "гормональные терапевтические средства", которые действуют, регулируя, снижая, блокируя или ингибируя эффекты гормонов, которые способствуют росту злокачественной опухоли. Они могут

- 5 представлять собой гормоны сами по себе, включая, но, не ограничиваясь ими, антиэстрогены и селективные модуляторы эстрогеновых рецепторов (SERM), включая, например, тамоксилен (включая тамоксилен NOLVADEX®), ралоксилен, дролоксилен, 4-гидрокситамоксилен, триоксилен, кеоксилен, LY117018, онапристон и торемилен FARESTON®; ингибиторы ароматазы, которые ингибируют фермент ароматазу, которая
- 10 регулирует продукцию эстрогена в надпочечниках, такие как, например, 4(5)-имидазолы, аминоглютетимид, мегестрола ацетат MEGASE®, AROMASIN® экземестан, форместан, фадрозол, ворозол RIVISOR®, летрозол FEMARA® и анастrozол ARIMIDEX®, и антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид, бикалутамид, лейпролид и гозерелин, а также троксаситабин (нуклеозидный цитозиновый аналог 1,3-диоксолана);
- 15 антисмыловые олигонуклеотиды, в частности такие, которые ингибируют экспрессию генов в пути передачи сигнала, вовлеченные в aberrантную клеточную пролиферацию, такие как, например, PKC-альфа, Raf и H-Ras; рибозимы, такие как ингибитор экспрессии VEGF (например, рибозим ANGIOZYME®) и ингибитор экспрессии HER2; вакцины, такие как генотерапевтические вакцины, например, вакцина ALLOVECTIN®, вакцина
- 20 LEUVECTIN® и вакцина VAXID®; PROLEUKIN® rIL-2; ингибитор топоизомеразы 1 LURTOTECAN® и; ABARELIX® rmRH; винорелбин и эсперамицины (см. патент США № 4675187), и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из указанных выше соединений, а также комбинации двух или более из указанных выше.

[0113] "Ингибирующее рост средство", при использовании в настоящем описании,

- 25 относится к соединению или композиции, которая ингибирует рост клеток *in vitro* или *in vivo*. В одном из вариантов осуществления ингибирующее рост средство представляет собой ингибирующее рост антитело, которое предотвращает или снижает пролиферацию клеток, экспрессирующих антиген, с которым связывается антитело. В другом варианте осуществления ингибирующее рост средство может представлять собой средство,
- 30 которое значительно снижает процент клеток в S-фазе. Примеры ингибирующих рост средств включают средства, которые блокируют прохождение клеточного цикла (в точке, отличной от S-фазы), такие как средства, которые индуцируют арест G1 и арест M-фазы. Классические блокаторы M-фазы включают алкалоиды барвинка (винクリстин и винбластин), таксаны и ингибиторы топоизомеразы II, такие как доксорубицин,
- 35 эпирюбицин, даунорубицин, этопозид и блеомицин. Такие средства, которые вызывают арест G1 также вызывают арест S-фазы, например, ДНК-алкилирующие средства, такие как тамоксилен, преднизон, дакарбазин, мехлоретамин, цисплатин, метотрексат, 5-фторурацил и ara-C. Дополнительную информацию можно найти в Mendelsohn and Israel, eds., *The Molecular Basis of Cancer*, главе 1, озаглавленной "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" Murakami et al. (W.B. Saunders, Philadelphia, 1995), например, р. 13. Таксаны (паклитаксел и доцетаксел) представляют собой лекарственные средства против злокачественных опухолей, получаемые из тисового дерева. Доцетаксел (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), получаемый из тиса европейского, представляет собой полусинтетический аналог паклитаксела (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb).
- 40 45 Паклитаксел и доцетаксел активируют сборку микротрубочек из димера тубулина и стабилизируют микротрубочки, предотвращая деполимеризацию, что приводит к ингибированию митоза в клетках.

[0114] Под "лучевой терапией" подразумевают использование направленных гамма-

лучей или бета-лучей для индукции достаточного повреждения клетки, таким образом, чтобы ограничивать ее способность нормально функционировать или полностью разрушать клетку. Следует понимать, что существует много известных в данной области способов определения дозы и продолжительности лечения. Характерные виды лечения 5 приведены как однократное введение и характерный диапазон доз составляет от 10 до 200 единиц (грей) в сутки.

[0115] "Объект" или "индивидуум" для целей лечения относится к любому животному, классифицированному как млекопитающее, включая людей, домашних и сельскохозяйственных животных и животных из зоопарка, животных для занятия 10 спортом или домашних животных, таких как собаки, лошади, кошки, коровы и т.д. Предпочтительно, млекопитающее представляет собой человека.

[0116] Термин "антитело" в настоящем описании используется в самом широком смысле и, в частности, включает моноклональные антитела (включая полноразмерные моноклональные антитела), поликлональные антитела, полиспецифические антитела 15 (например, биспецифические антитела) и фрагменты антител при условии, что они проявляют желаемую биологическую активность.

[0117] "Выделенное" антитело представляет собой антитело, которое было идентифицировано и отделено и/или выделено из компонента его природного окружения. Загрязняющие компоненты его природного окружения представляют собой вещества, 20 которые препятствуют исследовательским, диагностическим или терапевтическим использованием антитела, и могут включать ферменты, гормоны и другие белки или небелковые растворенные вещества. В некоторых вариантах осуществления антитело очищают (1) до более 95% по массе антитела, как определяют, например, способом Лоури, и в некоторых вариантах осуществления до более 99% по массе; (2) до степени 25 достаточной для получения по меньшей мере 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности с использованием, например, секвенатора с вращающимся стаканом, или (3) до однородности SDS-PAGE в восстановительных или невосстановительных условиях с использованием, например, кумасси синего или серебряного красителя. Выделенное антитело включает антитело *in situ* в 30 рекомбинантных клетках, т.к. по меньшей мере один компонент природного окружения антитела не присутствует. Однако, как правило, выделенное антитело получают посредством по меньшей мере одного этапа очистки.

[0118] "Нативные антитела", как правило, представляют собой гетеротетрамерные гликопротеины приблизительно 150000 Дальтон, состоящие из двух идентичных легких 35 (L) цепей и двух идентичных тяжелых (H) цепей. Каждая легкая цепь является связанный с тяжелой цепью одной ковалентной дисульфидной связью, при этом в тяжелых цепях различных изотипов иммуноглобулина число дисульфидных связей изменяется. Каждая тяжелая и легкая цепь также содержит расположенные на равном расстоянии друг от друга внутрицепочные дисульфидные мостики. Каждая тяжелая цепь содержит один 40 концевой вариабельный домен (V_H), за которым следует ряд константных доменов.

Каждая легкая цепь содержит вариабельный домен на одном конце (V_L) и константный домен на своем другом конце; константный домен легкой цепи присоединен к первому константному домену тяжелой цепи, и вариабельный домен легкой цепи присоединен к вариабельному домену тяжелой цепи. Полагают, что конкретные аминокислотные 45 остатки образуют область контакта между легкой цепью и вариабельными доменами тяжелых цепей.

[0119] Термин "константный домен" относится к участку молекулы иммуноглобулина, содержащей более консервативную аминокислотную последовательность относительно

другого участка иммуноглобулина, вариабельный домен, которого содержит антигенсвязывающий участок. Константный домен содержит домены С_H1, С_H2 и С_H3 (под общим названием СН) тяжелой цепи и СНЛ (или CL) домен легкой цепи.

[0120] "Вариабельная область" или "вариабельный домен" антитела относится к амино-концевым доменам тяжелой или легкой цепи антитела. Вариабельный домен тяжелой цепи может быть обозначен как "V_H". Вариабельный домен легкой цепи может быть обозначен как "V_L". Эти домены, как правило, являются наиболее вариабельными частями антитела и содержат антигенсвязывающие участки.

[0121] Термин "вариабельный" относится к тому факту, что последовательность определенных участков вариабельных доменов значительно отличается в антителах, и эти участки задействованы в связывании и специфичности каждого конкретного антитела в отношении его конкретного антигена. Однако вариабельность не является равномерной на всем протяжении вариабельных доменов антител. Она сосредоточена в трех сегментах, называемых гипервариабельными областями (HVR), в вариабельных доменах легкой цепи и тяжелой цепи. Наиболее высококонсервативные участки вариабельных доменов называются каркасными областями (FR). Вариабельные домены нативных тяжелых и легких цепей содержат четыре FR области, главным образом принимающих конформацию бета-слоя, соединенных тремя HVR, которые образуют петли, соединяющие структуру бета-слоя и в некоторых случаях образующие ее часть. HVR в каждой цепи удерживаются в непосредственной близости относительно друг друга FR областями и совместно с HVR из другой цепи вносят вклад в образование антигенсвязывающего участка антител (см. Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, Md. (1991)). Константные домены не участвуют непосредственно в связывании антитела с антигеном, но обладают различными эффекторными функциями, таким как участие антитела в антителозависимой клеточной токсичности.

[0122] "Легкие цепи" антител (иммуноглобулинов) от любого вида млекопитающих можно отнести к одному из двух четко отличающихся типов, называемых каппа ("κ") и лямбда ("λ") на основании аминокислотных последовательностей их константных доменов.

[0123] Как используют в настоящем описании, термин "изотип" IgG или "подкласс" означает любой из подклассов иммуноглобулинов в соответствии с химическими и антигенными характеристиками их константных областей.

[0124] В зависимости от аминокислотных последовательностей константных доменов своих тяжелых цепей антитела (иммуноглобулины) можно отнести к различным классам. Существует пять основных классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них можно дополнительно разделять на подклассы (изотипы), например, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂. Константные домены тяжелой цепи, которые соответствуют различным классам иммуноглобулинов называются α, γ, ε, γ и μ, соответственно. Субъединичные структуры и трехмерные конформации различных классов иммуноглобулинов хорошо известны и описаны в общем смысле, например, у Abbas et al. Cellular and Molecular Immunology, 4th ed. (W.B. Saunders, Co., 2000). Антитело может представлять собой часть более крупной слитой молекулы, образуемой ковалентной или нековалентной ассоциацией антитела с одним или более другими белками или пептидами.

[0125] Термины "полноразмерное антитело", "интактное антитело" и "целое антитело" используют в настоящем описании взаимозаменямо для обозначения антитела в его

по существу интактной форме, а не фрагментов антител, как определено ниже. В частности, термины относятся к антителу с тяжелыми цепями, которые содержат Fc-область.

[0126] "Голое антитело" для целей настоящего документа представляет собой 5 антитело, которое не является конъюгированным с цитотоксической молекулой или радиоактивной меткой.

[0127] "Фрагменты антител" содержат участок интактного антитела, предпочтительно содержащий его антигенсвязывающую область. Примеры фрагментов антител включают фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv; диатела; линейные антитела; молекулы одноцепочечных 10 антител и полиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

[0128] Расщепление папаином антител приводит к образованию двух идентичных антигенсвязывающих фрагментов, называемых фрагментами "Fab", каждый с одним антигенсвязывающим участком, и остаточного фрагмента "Fc", название которого отражает его способность легко кристаллизоваться. Обработка пепсином приводит к 15 образованию фрагмента F(ab')₂, который содержит два антигенсвязывающих участка и является все еще способным перекрестно связываться с антигеном.

[0129] "Fv" представляет собой минимальный фрагмент антитела, который содержит 20 полный антигенсвязывающий участок. В одном из вариантов осуществления двухцепочечная молекула Fv состоит из димера одного вариабельного домена тяжелой цепи и одного вариабельного домена легкой цепи в тесной нековалентной ассоциации. В одноцепочечной молекуле Fv (scFv) один вариабельный домен тяжелой цепи и один 25 вариабельный домен легкой цепи может являться ковалентно связанным гибким пептидным линкером, таким образом, что легкая и тяжелая цепи могут связываться с образованием "димерной" структуры, аналогичной структуре в двухцепочечной молекуле Fv. Именно в этой конфигурации три HVR каждого вариабельного домена 30 взаимодействуют с определенным антигенсвязывающим участком на поверхности димера VH-VL. В совокупности шесть HVR обеспечивают антигенсвязывающую специфичность антителу. Однако даже один вариабельный домен (или половина Fv, содержащего только три HVR, специфичные к антигену) может распознавать и связываться с антигеном, хотя с низкой аффинностью по сравнению с полным участком связывания.

[0130] Фрагмент Fab содержит вариабельные домены тяжелой и легкой цепей, а также 35 содержит константный домен легкой цепи и первый константный домен (CH1) тяжелой цепи. Фрагменты Fab' отличаются от фрагментов Fab добавлением нескольких остатков на С-конце домена CH1 тяжелой цепи, содержащего один или более цистеинов из шарнирной области антитела. Fab'-SH является обозначением в настоящем описании для Fab', в котором остаток(и) цистеина константных доменов несет свободную тиольную группу. Фрагменты F(ab')₂ антител первоначально получали в вид пары 40 фрагментов Fab', которые содержат цистеины шарнирной области между ними. Также известны другие типы химического связывания фрагментов антител.

[0131] "Одноцепочечные фрагменты Fv" или фрагменты "scFv" антител содержат 45 домены VH и VL антитела, где эти домены содержатся в одноцепочечной полипептидной цепи. Как правило, полипептид scFv дополнитель но содержит полипептидный линкер между доменами VH и VL, которые обеспечивают scFv образовывать желаемую структуру для связывания антигена. Для обзора scFv, см., например, Pluckthün, в The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York, 1994), pp. 269-315.

[0132] Термин "диатела" относится к фрагментам антител с двумя антигенсвязывающими участками, где фрагменты содержат вариабельный домен (VH) тяжелой цепи, соединенный с вариабельным доменом (VL) легкой цепи в одной и той же полипептидной цепи (VH-VL). С использованием линкера, который является слишком коротким, чтобы обеспечивать спаривание двух доменов на одной и той же цепи, обеспечивают спаривание доменов с комплементарными доменами другой цепи и создавать два антигенсвязывающих участка. Диатела могут являться двухвалентными или биспецифическими. Диатела более подробно описаны, например, в EP 404097, WO 1993/01161, Hudson et al., Nat. Med., 9:129-134 (2003), и Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993). Триотела и тетратела также описаны у Hudson et al., Nat. Med., 9:129-134 (2003).

[0133] Как используют в настоящем описании, термин "моноклональное антитело" относится к антителу, получаемому из популяции по существу гомогенных антител, например, индивидуальные антитела, содержащие популяцию, являющиеся идентичными за исключением возможных мутаций, например, природных мутаций, которые могут содержаться в незначительных количествах. Таким образом, определение "моноклональный" означает признак антитела, как не являющееся смесью отдельных антител. В определенных вариантах осуществления такое моноклональное антитело, как правило, включает антитело, содержащее полипептидную последовательность, которая связывается с мишенью, где связывающаяся с мишенью полипептидную последовательность получали способом, который включает отбор связывающейся с одной мишенью полипептидной последовательностью из ряда полипептидных последовательностей. Например, способ отбора может представлять собой отбор уникального клона из ряда клонов, таких как совокупность гибридомных клонов, фаговых клонов или клонов рекомбинантной ДНК. Следует понимать, что отобранныю связывающуюся с мишенью последовательность можно дополнительно изменять, например, для улучшения аффинности к мишени, для гуманизации связывающейся с мишенью последовательности, для улучшения ее продуцирования в культуре клеток, для снижения ее иммуногенности *in vivo*, для получения полиспецифического антитела и т.д., и что антитело, содержащее измененную связывающуюся с мишенью последовательность, представляет собой также моноклональное антитело по настоящему изобретению. В отличие от препаратов поликлональных антител, которые, как правило, содержат различные антитела, направленные против различных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело препарата моноклонального антитела направлено против одной детерминанты на антигене. В дополнение к своей специфичности препараты моноклональных антител являются предпочтительными тем, что они, как правило, не являются загрязненными другими иммуноглобулинами.

[0134] Определение "моноклональное" указывает на признак антитела, как получаемого по существу из гомогенной популяции антител, и не следует его интерпретировать как необходимость получения антитела каким-либо конкретным способом. Например, моноклональные антитела, используемые по изобретению, можно получать различными техниками, включая, например, способом гибридом (например, Kohler and Milstein, Nature, 256:495-97 (1975); Hongo et al., Hybridoma, 14 (3): 253-260 (1995), Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling et al., в Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)), способами рекомбинантной ДНК (см., например, патент США № 4816567), технологиями фагового дисплея (см., например, Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1992); Sidhu et al., J. Mol. Biol., 338(2): 299-

310 (2004); Lee et al., J. Mol. Biol., 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101(34): 12467-12472 (2004) и Lee et al., J. Immunol. Methods, 284(1-2): 119-132 (2004), и технологиями получения антитела человека или подобных антителам человека у животных, которые содержат части или все локусы иммуноглобулина человека или 5 гены, кодирующие последовательности иммуноглобулина человека (см., например, WO 1998/24893, WO 1996/34096, WO 1996/33735, WO 1991/10741, Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 2551 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362: 255-258 (1993); Bruggemann et al., Year in Immunol., 7:33 (1993); патенты США № 5545807, 5545806, 5569825, 5625126, 10 5633425 и 5661016, Marks et al., Bio/Technology, 10: 779-783 (1992); Lonberg et al., Nature, 368: 856-859 (1994); Morrison, Nature, 368: 812-813 (1994); Fishwild et al., Nature Biotechnol., 14: 845-851 (1996); Neuberger, Nature Biotechnol., 14: 826 (1996) и Lonberg and Huszar, Intern. Rev. Immunol., 13: 65-93 (1995).

[0135] Моноклональные антитела в настоящем описании конкретно включают "химерные" антитела, в которых участок тяжелой и/или легкой цепи является идентичным 15 или гомологичным соответствующим последовательностям в антителах, получаемых из конкретной молекулы или принадлежащих конкретному классу или подклассу антител, при этом оставшаяся цепь(и) является идентичной или гомологичной соответствующим последовательностям в антителе, получаемом из другой молекулы или принадлежащего другому классу или подклассу антител, а также фрагменты таких 20 антител при условии, что они проявляют желаемую биологическую активность (см., например, патент США № 4816567 и Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)). Химерные антитела включают антитела PRIMATTZED®, где антигенсвязывающую область антитела получают из антитела, получаемого, например, иммунизацией обезьян макак представляющим интерес антигеном.

[0136] "Гуманизированные" формы не принадлежащих человеку антител (например, мыши) представляют собой химерные антитела, которые содержат минимальную последовательность, получаемую из не принадлежащего человеку иммуноглобулина. В одном из вариантов осуществления гуманизированное антитело представляет собой иммуноглобулин человека (реципиентное антитело), в котором остатки из HVR

30 реципиента заменяют остатками из HVR не являющихся человеком видов (донорного антитела), таких как мышь, крыса, кролик или не являющий человеком примат, обладающей желаемыми специфичностью, аффинностью и/или емкостью. В некоторых случаях остатки FR иммуноглобулина человека заменяют соответствующими не принадлежащими человеку остатками. Кроме того, гуманизированные антитела могут 35 содержать остатки, которые не встречаются в реципиентном антителе или в донорном антителе. Эти модификации можно проводить для дополнительного улучшения характеристик антитела. В основном, гуманизированное антитело содержит по существу все из по меньшей мере одного, и как правило, двух вариабельных доменов, в которых все или по существу все гипервариабельные петли соответствуют петлям не

40 принадлежащего человеку иммуноглобулина, и все или по существу все FR представляют собой FR последовательности иммуноглобулина человека. Гуманизированное антитело необязательно также содержит по меньшей мере участок константной области иммуноглобулина (Fc), как правило, участок константной области иммуноглобулина человека. Более подробно, см., например, Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann

45 et al., Nature, 332:323-329 (1988) и Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596 (1992). Также см., например, Vaswani and Hamilton, Ann. Allergy, Asthma & Immunol., 1:105-115 (1998); Harris, Biochem. Soc. Transactions 23:1035-1038 (1995); Hurle and Gross, Curr. Op. Biotech., 5:428-433 (1994), и патенты США № 6982321 и 7087409.

[0137] "Антитело человека" представляет собой антитело, которое содержит аминокислотную последовательность, которая соответствует, аминокислотной последовательности антител, образующихся у человека, и/или которые получали любым из способов получения антител человека как, описано в настоящем описании. Это

⁵ определение антитела человека конкретно исключает гуманизированное антитело, содержащее не принадлежащие человеку антигенсвязывающие остатки. Антитела человека можно получать различными известными в данной области способами, включая библиотеки фагового дисплея. Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581 (1991). Также доступными для получения

¹⁰ моноклональных антител человека являются способы, описанные у Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner et al., J. Immunol., 147(1): 86-95 (1991). Также см. van Dijk and van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol., 5: 368-74 (2001). Антитела человека можно получать введением антигена трансгенному животному, которое модифицировали для образования таких антител в ответ на введение антигена,

¹⁵ но эндогенные локусы которых были инактивированы, например, иммунизированные ксеномышь (касательно технологии XENOMOUSE™ см., например, патенты США № 6075181 и 6150584). Также см., например, Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562 (2006) касательно антител человека, получаемых технологией В-клеточной гибридомы человека.

²⁰ [0138] "Видозависимое антитело" представляет собой антитело, которое обладает большей аффинностью связывания к антиген первому виду млекопитающего по сравнению с аффинностью, которой оно обладает к гомологу этого антигена от второго вида млекопитающего. Как правило, видозависимое антитело "спефически связывается" с антигеном человека (например, величина аффинности связывания (K_d)

²⁵ составляет не более приблизительно 1×10^{-7} М, предпочтительно не более приблизительно 1×10^{-8} М и предпочтительно не более приблизительно 1×10^{-9} М), но обладает аффинностью связывания с гомологом антигена от второго не являющегося человеком вида млекопитающего, которая является по меньшей мере приблизительно в 50 раз

³⁰ или по меньшей мере приблизительно в 500 раз, или по меньшей мере приблизительно в 1000 раз слабее, чем его аффинность связывания с антигеном человека. Видозависимое антитело может относиться к любому из различных типов антител, как определено выше, но предпочтительно представляет собой гуманизированное антитело или антитело человека.

³⁵ [0139] Термин "гипервариабельная область", "HVR" или "HV" при использовании в настоящем описании относится к областям вариабельного домена антитела, последовательность которых является гипервариабельной, и/или которые образуют петли с определенной структурой. Как правило, антитела содержат шесть HVR; три в VH (H1, H2, H3) и три в VL (L1, L2, L3). В нативных антителах для H3 и L3 выявляют наибольшее разнообразие шести HVR, и в частности полагают, что H3 играет

⁴⁰ уникальную роль в придании высокой специфичности антителам. См., например, Xu et al., Immunity, 13:37-45 (2000); Johnson and Wu, в Methods in Molecular Biology, 248:1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, N.J., 2003). Фактически, природные антитела верблюда, состоящие только из тяжелой цепи, являются функциональными и стабильными при отсутствии легкой цепи. См., например, Hamers-Casterman et al., Nature, 363:446-448 (1993); Sheriff et al., Nature Struct. Biol., 3:733-736 (1996).

⁴⁵ [0140] Используют несколько способов установления границ HVR, и они включены в настоящем описании. Определяющие комплементарность области (CDR) по Kabat основаны на вариабельности последовательности и являются наиболее широко

используемыми (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). В противоположность этому по Chothia определяют локализацию структурных петель (Chothia and Lesk, J. Mol. Biol., 196:901-917 (1987)). HVR AbM представляют собой компромисс между HVR по

5 Kabat и структурными петлями по Chothia, и их используют в программном обеспечении для моделирования антител Oxford Molecular's AbM. "Контактные" HVR основаны на анализе доступных сложных кристаллических структур. Остатки из каждой из этих HVR приведены ниже.

	Петля	по Kabat	AbM	по Chothia	Контактные
10	L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
	L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
	L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
15	H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B (нумерация по Kabat)
	H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35 (нумерация по Chothia)
	H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
	H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

[0141] HVR могут включать "удлиненные HVR", как указано ниже: 24-36 или 24-34 (L1), 46-56 или 50-56 (L2) и 89-97 или 89-96 (L3) в VL и 26-35 (H1), 50-65 или 49-65 (H2) 20 и 93-102, 94-102, или 95-102 (H3) в VH. Остатки вариабельного домена для каждого из этих определений пронумерованы по Kabat et al., выше.

[0142] "Каркасные" или "FR" остатки представляют собой такие остатки вариабельного домена, которые отличаются от остатков HVR, таких как определяют в настоящем описании.

[0143] Термин "нумерация остатков вариабельного домена по Kabat" или "нумерация положения аминокислот по Kabat" и его варианты относятся к системе нумерации, используемой для вариабельных доменов тяжелых цепей или вариабельных доменов легких цепей компиляции антител у Kabat et al., выше. При использовании этой системы нумерации фактическая линейная аминокислотная последовательность может содержать

30 меньшее количество аминокислот или дополнительные аминокислоты, соответствующие укорочению или вставке в FR или HVR вариабельного домена. Например, вариабельный домен тяжелой цепи может включать одну вставку аминокислоты (остаток 52а по Kabat) после остатка 52 Н2 и введенные остатки (например, остатки 82а, 82б и 82с и т.д. по Kabat) после остатка 82 FR тяжелой цепи. Нумерацию по Kabat остатков можно

35 определять для данного антитела выравниванием в областях гомологии последовательности антитела со "стандартной" последовательностью, пронумерованной по Kabat.

[0144] Систему нумерации по Kabat, как правило, используют при обозначении остатка в вариабельном домене (приблизительно остатков 1-107 легкой цепи и остатков

40 1-113 тяжелой цепи) (например, Kabat et al., Sequences of Immunological Interest. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). "Систему нумерации EU" или "индекс EU", как правило, используют при обозначении остатка в тяжелой цепи константной области иммуноглобулина (например, индекс EU, опубликованный в Kabat et al., выше). "Индекс EU по Kabat" относится к нумерации остатков EU антитела 45 IgG1 человека.

[0145] Выражение "линейные антитела" относится к антителам, описанным у Zapata et al. (1995 Protein Eng., 8(10):1057-1062). В кратком изложении, эти антитела содержат пару tandemных сегментов Fd (VH-CH1-VH-CH1), которые совместно с

комплémentарными полипептидами легкой цепи образуют пару антигенсвязывающих областей. Линейные антитела могут быть биспецифическими или моноспецифическими.

II. Составы и получение антител

[0146] Изобретение в настоящем описании относится к стабильным водным составам,

- 5 содержащим антитело. В некоторых вариантах осуществления состав содержит моноклональное антитело, трегалозу и буфер, где массовое отношение моноклонального антитела к трегалозе в составе составляет приблизительно от 1,65 приблизительно до 4,95, и где pH состава составляет приблизительно от 5,5 приблизительно до 7,0. В некоторых вариантах осуществления состав дополнительно содержит буфер (такой 10 как фосфат натрия или гистидин). В некоторых вариантах осуществления состав содержит (а) моноклональное антитело в количестве приблизительно от 25 мг/мл приблизительно до 100 мг/мл; (б) трегалозу в количестве приблизительно от 40 mM приблизительно до 120 mM и (с) фосфат натрия в количестве приблизительно от 15 mM приблизительно до 35 mM, где pH указанного состава составляет приблизительно от 15 5,5 приблизительно до 7,0. В некоторых вариантах осуществления антитело в составе является стабильным при -20°C в течение по меньшей мере приблизительно 6 месяцев, по меньшей мере приблизительно 12 месяцев или по меньшей мере приблизительно 18 месяцев.

A. Получение антител

- 20 [0147] Антитело в составе получают с использованием доступных в данной области техник получения антител, иллюстративные способы которых более подробно описаны в следующих ниже разделах.

[0148] Антитело является направленным против представляющего интерес антигена. Предпочтительно антиген представляет собой биологически важный полипептид, и 25 введение антитела млекопитающему, страдающему нарушением, может приводить к терапевтической пользе у такого млекопитающего. Однако также предусматривают антитела, направленные против не являющихся полипептидами антигенов.

- [0149] В случае, если антиген представляет собой полипептид, он может представлять собой трансмембранный молекулу (например, рецептор) или лиганд, такой как фактор роста. Иллюстративные антигены включают молекулы, такие как фактор роста эндотелия сосудов (VEGF); CD20; ox-LDL; ox-ApoB100; ренин; гормон роста, включая гормон роста человека и бычий гормон роста; фактор, стимулирующий выделение гормона роста; паратиреоидный гормон; тиреотропный гормон; липопротеины; альфа-1-антитрипсин; А-цепь инсулина; В-цепь инсулина; проинсулин; 30 фолликулостимулирующий гормон; кальцитонин; лютеинизирующий гормон; глюкагон; факторы свертывания крови, такие как factor VIIIIC, фактор IX, тканевой фактор и фактор фон Виллебранда; препятствующие свертыванию крови факторы, такие как белок C; атриальный натрийуретический пептид; легочный сурфактант; активатор плазминогена, такой как урокиназа или мочевой активатор плазминогена человека 35 или тканевый активатор плазминогена (t-PA); бомбезин; тромбин; гемопоэтический фактор роста; фактор некроза опухоли-альфа и -бета; энкефалиназу; RANTES (регулируемые, как правило, экспрессируемые и секрециируемые Т-клетками при активации); макрофагальный воспалительный белок человека (MIP-1-альфа); сывороточный альбумин, такой как сывороточный альбумин человека; мюллерова 40 ингибитирующая субстанция; А-цепь релаксина; В-цепь релаксина; прорелаксин; ассоциированный с гонадотропином пептид мыши; белок микроорганизмов, такой как бета-лактамаза; ДНКаза; IgE; цитотоксический ассоциированный с Т-лимфоцитами антиген (CTLA), такой как CTLA-4; ингибин; активин; рецепторы гормонов или факторов 45

роста; белок A или D; ревматоидные факторы; нейротрофический фактор, такой как нейротрофический фактор костей (BDNF), нейротрофин-3, -4, -5 или -6 (NT-3, NT4, NT-5 или NT-6), или фактор роста нервов, такой как NGF- β ; тромбоцитарный фактор роста (PDGF); фактор роста фибробластов, такой как aFGF и bFGF; эпидермальный фактор роста (EGF); трансформирующий фактор роста (TGF), такой как TGF-альфа и TGF-бета, включая TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4 или TGF- β 5; инсулиноподобный фактор роста-I и -II (IGF-I и IGF-II); дез(1-3)-IGF-I(IGF-I головного мозга), белки, связывающие инсулиноподобный фактор роста; белки CD, такие как CD3, CD4, CD8, CD19 и CD20; эритропоэтин; остеоиндуктивные факторы; иммунотоксины; морфогенетический белок кости (BMP); интерферон, такой как интерферон-альфа, -бета и -гамма; колониестимулирующие факторы (CSFs), например, M-CSF, GM-CSF и G-CSF; интерлейкины (IL), например, IL-1-IL-10; супероксиддисмутазу; Т-клеточные рецепторы; поверхностные мембранные белки; фактор ускорения распада; вирусный антиген, такой как, например, участок оболочки СПИД; транспортные белки; "хоминг"-рецепторы; адрессины; регуляторные белки; интегрины, такие как CD11a, CD11b, CD11c, CD18, ICAM, VLA-4 и VCAM; опухолеассоциированный антиген, такой как рецептор HER2, HER3 или HER4, и фрагменты любого из перечисленных выше полипептидов.

[0150] В определенных вариантах осуществления молекулярные мишени антител, входящие в изобретение, включают VEGF и CD20. В некоторых вариантах осуществления антитело в настоящем описании представляет собой антитело, которое связывается с VEGF человека. В некоторых вариантах осуществления антитело в настоящем описании представляет собой антитело, которое связывается с CD20 человека.

(i) Получение антигенов

[0151] Растворимые антигены или их фрагменты, необязательно конъюгированные

с другими молекулами, можно использовать в качестве иммуногенов для получения антител. Для трансмембранных молекул, таких как рецепторы, в качестве иммуногена можно использовать фрагменты этих соединений (например, внеклеточный домен рецептора). Альтернативно, в качестве иммуногена можно использовать клетки, экспрессирующие трансмембранные молекулы. Такие клетки можно выделять из природного источника (например, линий злокачественных клеток), или они могут представлять собой клетки, которые трансформировали рекомбинантными способами для экспрессии трансмембранных молекул. Другие антигены и их формы, пригодные для получения антител, будут понятны специалистам в данной области.

(ii) Определенные способы на основе антител

[0152] Поликлональные антитела предпочтительно индуцируют у животных посредством многократных подкожных (п/к) или внутрибрюшинных (в/б) инъекций релевантного антигена и адьюванта. Пригодной может являться конъюгация релевантного антигена с белком, который является иммуногенным у вида, подлежащего иммунизации, например, гемоцианином морского блюдца, сывороточным альбумином, бычьим тиреоглобулином или соевым ингибитором трипсина с использованием бифункционального или дериватизирующего средства, например, сложного эфира малеimidобензоилсульфосукцинимида (конъюгированного по остаткам цистеина), N-гидроксисукцинимида (по остаткам лизина), глутаральдегида, янтарного ангидрида, SOCl_2 или $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, где R и R^1 представляют собой различные алкильные группы.

[0153] Животных иммунизируют против антигена, иммуногенных конъюгатов или производных путем объединения, например, 100 мкг или 5 мкг белка или конъюгата (для кроликов или мышей, соответственно) с 3 объемами полного адьюванта Фрейнда и инъекции раствора внутркожно на многих участках. Через один месяц животных

повторно иммунизируют от 1/5 до 1/10 исходного количества пептида или конъюгата в полном адьюванте Фрейнда путем подкожной инъекции на многих участках. Через семь-14 суток у животных получают образцы крови и анализируют в сыворотке титр антител. Животных повторно иммунизируют до тех пор, пока титр не выход на плато.

5 Предпочтительно животное повторно иммунизируют конъюгатом того же антигена, но конъюгированным с отличным белком и/или посредством отличного сшивающего реагента. Конъюгаты также можно получать в культуре рекомбинантных клеток в виде слияний белков. Также, для усиления иммунного ответа можно использовать вызывающие агрегацию средства, такие как алюминий.

10 [0154] Моноклональные антитела по изобретению можно получать способом гибридомы, впервые описанным Kohler et al., Nature, 256:495 (1975), и дополнительно описанным, например, у Hongo et al., Hybridoma, 14 (3): 253-260 (1995), Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling et al., в Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981) и Ni, Xiandai Mianyixue, 26(4):265-268 (2006) касательно гибридом человек-человек. Дополнительные способы включают способы, описанные, например, в патенте США № 7189826, касательно получения моноклональных природных антител IgM человека из линий гибридомных клеток. Гибридомная технология на основе клеток человека (технология Trioma) описана у Vollmers and Brandlein, Histology and Histopathology, 20(3) :927-937 (2005) и Vollmers and Brandlein, Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, 27(3):185-91 (2005).

[0155] Для различных других гибридомных способов см., например, US 2006/258841, US 2006/183887 (полностью принадлежащие человеку антитела), US 2006/059575, US 2005/287149, US 2005/100546, US 2005/026229 и патенты США № 7078492 и 7153507.

25 Иллюстративный протокол получения моноклональных антител способом гибридом описан так, как следует ниже. В одном из вариантов осуществления мышь или другое подходящее животное-хозяин, такое как хомяк, иммунизируют для индукции лимфоцитов, которые продуцируют или способны продуцировать антитела, которые специфически связываются с белком, используемым для иммунизации. Антитела 30 индуцируют у животных многократными подкожными (п/к) или внутрибрюшинными (в/б) инъекциями полипептида по изобретению или его фрагмента и адьюванта, такого как монофосфорил липид А (MPL)/дикриномиколат трегалозы (TDM) (Ribi Immunochem. Research, Inc., Hamilton, Mont.). Полипептид по изобретению (например, антиген) или его фрагмент можно получать способами, хорошо известными в данной области, такими 35 как рекомбинантные способы, некоторые из которых дополнительно описаны в настоящем описании. Сыворотка от иммунизированных животных анализируют на антитела против антигена и необязательно проводят повторные иммунизации. Выделяют лимфоциты от животных, продуцирующие антитела против антигена. Альтернативно, лимфоциты можно стимулировать *in vitro*.

40 [0156] Затем лимфоциты сливают с миеломными клетками с использованием подходящего средства, вызывающего слияние клеток, такого как полиэтиленгликоль, с получением гибридомной клетки. См., например, Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986). Можно использовать миеломные клетки, которые эффективно сливаются, поддерживают стабильную продукцию антитела 45 на высоком уровне путем отбора продуцирующих антитело клеток, и которые являются чувствительными к среде, такой как среда НАТ. Иллюстративные миеломные клетки включают, но не ограничиваются ими, линии миеломных клеток мышей, такие как линии клеток, получаемые из опухолей мышей МОРС-21 и МРС-11, доступные от Salk

Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif. USA, и клетки SP-2 или X63-Ag8-653, доступные от American Type Culture Collection, Rockville, Md. USA. Для получения моноклональных антител человека также были описаны линии миеломных клеток человека и гетеромиеломных клеток мыши-человека (Kozbor, J. Immunol., 133:3001

5 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

[0157] Получаемые таким образом гибридомные клетки высевают и растят в подходящей среде для культивирования, например, среде, которая содержит одно или более веществ, которые ингибируют рост или выживаемость неслитых, исходных

10 миеломных клеток. Например, если исходные миеломные клетки не содержат фермент гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазу (HPRT или HGPRT), в среду для культивирования гибридов, как правило, включают гипоксантин, аминоптерин и тимидин (среда НАТ), вещества которой предотвращают рост клеток с недостатком HGPRT. Предпочтительно используют способы культивирования гибридомных клеток

15 без среды для уменьшения использования получаемой от животных сыворотки, такой как эмбриональная телячья сыворотка, как описано, например, у Even et al., Trends in Biotechnology, 24(3), 105-108 (2006).

[0158] Олигопептиды, как средства улучшения производительности культуры клеток гибридомы описаны у Franek, Trends in Monoclonal Antibody Research, 111-122 (2005). В 20 частности, стандартные среды для культивирования обогащают определенными аминокислотами (аланин, серин, аспарагин, пролин) или фракциями белковых гидролизатов, и можно значительно подавлять апоптоз синтетическими олигопептидами, состоящими из трех-шести аминокислотных остатков. Пептиды содержаться в миллимолярных или более высоких концентрациях.

25 [0159] Среду для культивирования, в которой выращивают гибридомные клетки, можно анализировать на продукцию моноклональных антител, которые связываются с антителом по изобретению. Специфичность связывания моноклональных антител, 30 продуцируемых гибридомными клетками, можно определять иммунопреципитацией или анализом связывания *in vitro*, таким как радиоиммунологический анализ (RIA) или твердофазным иммуноферментным анализом (ELISA). Аффинность связывания моноклонального антитела можно определять, например, анализом Скэтчарда. См., например, Munson et al., Anal. Biochem., 107:220 (1980).

[0160] После идентификации, что гибридомные клетки produцируют антитела с желаемой специфичностью, аффинностью и/или активностью, колонии можно 35 субклонировать серийными разведениями и выращивать стандартными способами. См., например, Goding, выше. Подходящие среды для культивирования для этой цели включают, например, среду D-MEM или RPMI-1640. Кроме того, гибридомные клетки можно выращивать *in vivo* в виде асцитных опухолей у животного. Моноклональные антитела, секреируемые субклонами, подходящим образом отделяют от среды для 40 культивирования, асцитной жидкости или сыворотки общепринятыми способами очистки иммуноглобулина, такими как, например, белок A-сефароза, хроматография на гидроксиапатите, электрофорез в геле, диализ или аффинная хроматография. Один из способов выделения белков из гибридомных клеток описан в US 2005/176122 и патенте США № 6919436. Способ включает использованием минимальных солей, таких 45 как лиотропные соли, в процессе связывания, а также и предпочтительно использование небольших количеств органических растворителей в процессе элюирования.

(iii) Определенные способы скрининга библиотек

[0161] Антитела по изобретению можно получать с использованием комбинаторных

библиотек для скрининга на антитела с желаемой активностью или видами активности. Например, в данной области известен ряд способов получения библиотек фагового дисплея и скрининга таких библиотек на антитела, обладающие желаемыми 5 характеристики связывания. Такие способы описаны в общем смысле у Hoogenboom et al. в Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, N.J., 2001). Например, один из способов получения представляющих интерес антител заключается в использовании антител фаговой библиотеки, как описано у Lee et al., J. Mol. Biol., (2004), 340(5):1073-93.

[0162] В принципе клоны синтетического антитела выбирают путем скрининга

10 фаговых библиотек, содержащих фаг, которые предоставляют различные фрагменты вариабельной области антитела (Fv), слитые с белком оболочки фага. Такие фаговые библиотеки разделять методом пэннинга посредством аффинной хроматографии против желаемого антигена. Клоны, экспрессирующие фрагменты Fv, способные связываться 15 с желаемым антигеном, адсорбируются на антигене, и, таким образом, их отделяют от несвязавшихся клонов в библиотеке. Затем элюируют связанные клоны с антигена, и можно их дополнительно обогащать дополнительными циклами адсорбции/элюирования антигена. Любое из антител по изобретению можно получать посредством 20 конструирования процедуры скрининга подходящего антигена для отбора представляющего интерес фагового клона после конструкции клона полноразмерного антитела с использованием последовательностей Fv из представляющего интерес клона фага и подходящих последовательностей константной области (Fc), описанных у Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda Md. (1991), vols. 1-3.

[0163] В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий домен

25 антитела образован двумя вариабельными (V) областями приблизительно 110 аминокислот, каждая из легкой (VL) и тяжелой (VH) цепей, которые предоставляют три гипервариабельные петли (HVR) или определяющие комплементарность области (CDR). Вариабельные домены можно функционально предоставлять на фаге в виде 30 одноцепочных фрагментов Fv (scFv), в которых VH и VL являются ковалентно связанными посредством короткого, гибкого пептида, или в виде фрагментов Fab, в которых каждый из них является слитым с константным доменом и взаимодействует нековалентно, как описано у Winter et al., Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455 (1994). Как используют в настоящем описании, кодирующие scFv фаговые клоны и кодирующие Fab фаговые клонсы обобщенно обозначают как "фаговые клонсы Fv" или "клонсы Fv".

35 [0164] Репертуары генов VH и VL можно раздельно клонировать полимеразной цепной реакцией (ПЦР) и в случайном порядке рекомбинировать в фаговые библиотеки, которые затем можно исследовать в отношении антигенсвязывающих клонов, как описано у Winter et al., Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455 (1994). Библиотеки от иммунизированных источников обеспечивают высокоаффинные антитела к иммуногену 40 без необходимости конструкции гибридом. Альтернативно, интактный репертуар можно клонировать для обеспечения единого источника антител человека к широкому диапазону антигенов, не являющихся аутоантigenами, а также к аутоантigenам без какой-либо иммунизации, как описано Griffiths et al., EMBO J., 12: 725-734 (1993). В заключении интактные библиотеки также можно получать синтетически клонированием 45 не подвергшихся реарранжировке сегментов V-гена из стволовых клеток и с использованием праймеров для ПЦР, содержащих случайную последовательность для кодирования высоко вариабельных областей CDR3 и для проведения реарранжировки *in vitro*, как описано Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992).

[0165] В определенных вариантах осуществления используют нитевидный фаг для предоставления фрагментов антител путем слияния с минорным белком оболочки pIII. Фрагменты антител можно предоставлять в виде одноцепочечных фрагментов Fv, в которых домены VH и VL являются соединенными в одной и той же полипептидной цепи гибким полипептидным спейсером, например, как описано Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991), или в виде фрагментов Fab, в которых одна цепь является слитой с pIII, а другая секретируется в перiplазме бактериальной клетке-хозяине, где происходит сборка структуры белка оболочки Fab, которая становится предоставленной на поверхности фага в результате замещения некоторых белков оболочки дикого типа, например, как описано у Hoogenboom et al., Nucl. Acids Res., 19: 4133-4137 (1991).

[0166] В основном нуклеиновые кислоты, кодирующие фрагменты гена антитела получают из иммунных клеток, собираемых от людей или животных. Если желательной является библиотека, направленная на получение клонов против антигена, индивидуума иммунизируют антигеном для образования антител и выделяют клетки селезенка и/или циркулирующие В-клетки, отличные от лимфоцитов периферической крови (PBL) для конструкции библиотеки. В одном из вариантов осуществления библиотеку фрагментов генов антител человека, направленную на получение клонов против антигена, получают посредством индукции образования антител против антигена у трансгенных мышей, несущих функциональный набор генов иммуноглобулина человека (и не содержащих систему, продуцирующую функциональные эндогенные антитела), таким образом, что иммунизация антигеном приводит к образованию В-клеток, продуцирующих антитела человека против антигена. Получение продуцирующих антитела человека трансгенных мышей описано ниже.

[0167] Дополнительное обогащение популяциями клеток, реактивных в отношении антигена, можно получать подходящим способом скрининга для выделения В-клеток, экспрессирующих специфичное к антигену антитело, связанное с мембраной, например, посредством разделения клеток с использованием аффинной хроматографии антигена или адсорбции клеток на меченный флуорохромом антиген с последующей сортировкой клеток с активированной флуоресценцией (FACS).

[0168] Альтернативно, использование клеток селезенка и/или В-клеток или других PBL от иммунизированного донора обеспечивает лучшее предоставление возможного репертуара антител, а также позволяет конструировать библиотеку антител с использованием любого вида животного (человека или не являющегося человеком), у которого антиген не является антигенным. Для библиотек, включающих конструкцию генов антител *in vitro*, от индивидуума собирают стволовые клетки для получения нуклеиновых кислот, кодирующих не подвергшиеся реаранжировке сегменты генов антитела. Представляющие интерес иммунные клетки можно получать от ряда видов животных, таких как человек, мышь, крыса, зайцеобразные, волки, псовые, кошачьи, свиньи, жвачные, лошади и виды птичьих, и т.д.

[0169] Нуклеиновую кислоту, кодирующую вариабельные сегменты генов антитела (включая сегменты VH и VL) выделяют из представляющих интерес клеток и амплифицируют. В случае библиотек с реаранжировкой генов VH и VL желаемую ДНК можно получать выделением геномной ДНК или мРНК из лимфоцитов с последующей полимеразной цепной реакцией (ПЦР) с праймерами, соответствующими 5'- и 3'-концами реаранжированных генов VH и VL, как описано у Orlandi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 3833-3837 (1989), таким образом получая различные репертуары гена V для экспрессии. Гены V можно амплифицировать из кДНК и геномной ДНК с использованием обратных праймеров на 5'-конце экзона, кодирующего зрелый V-домен,

и прямых праймеров, располагающихся в J-сегменте, как описано у Orlandi et al. (1989) и у Ward et al., Nature, 341: 544-546 (1989). Однако для амплификации из кДНК обратные праймеры также должны располагаться в лидерном аксоне, как описано к Jones et al., Biotechnol., 9: 88-89 (1991), и прямые праймеры - в константной области, как описано

- 5 у Sastry et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 5728-5732 (1989). Для повышения до максимума комплементарности праймеры можно делать вырожденными, как описано у Orlandi et al. (1989) или Sastry et al. (1989). В определенных вариантах осуществления разнообразие библиотеки повышают до максимума с использованием праймеров для ПЦР, направленных на каждое семейство V-генов для амплификации всех доступных
- 10 перестановок VH и VL, представленных в образце нукleinовой кислоты иммунных клеток, например, как описано в способе Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991) или как описано в способе Orum et al., Nucleic Acids Res., 21: 4491-4498 (1993). Для клонирования амплифицированной ДНК в экспрессирующие векторы, в праймеры для ПЦР можно вводить редкие участки рестрикции в качестве метки на одном конце, как
- 15 описано у Orlandi et al. (1989), или дополнительной амплификацией ПЦР с меченым праймером, как описано у Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991).

[0170] Репертуары синтетически реаранжированных генов V можно выделять *in vitro* из сегментов гена V. Большую часть сегментов VH-гена человека клонировали и секвенировали (опубликовано у Tomlinson et al., J. Mol. Biol., 227: 776-798 (1992)), и

- 20 картировали (опубликовано у Matsuda et al., Nature Genet., 3: 88-94 (1993); эти клонированные сегменты (включая все основные конформации петли H1 и H2) можно использовать для получения различных репертуаров генов VH с праймерами для ПЦР, кодирующими петли H3 другой последовательности и длины, как описано у Hoogenboom и Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992). Репертуары VH также можно получать со
- 25 всем разнообразием последовательностей, сконцентрированном в длинной петле H3 одной длины, как описано у Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4457-4461 (1992). Сегменты V κ и V λ человека были клонированы и секвенированы (опубликовано у Williams and Winter, Eur. J. Immunol., 23: 1456-1461 (1993)), и их можно использовать для получения синтетических репертуаров легкой цепи. Репертуары синтетических генов
- 30 V, основанные на диапазоне складок VH и VL и длин L3 и H3, кодируют антитела со значительным структурным разнообразием. После амплификации кодирующей V-ген ДНК, сегменты зародышевой линии V-гена можно подвергать реаранжировке способами *in vitro* Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992).

[0171] Репертуары фрагменты антител можно конструировать комбинацией друг с

- 35 другом репертуаров генов VH и VL несколькими путями. Каждый репертуар можно создавать в различных векторах и рекомбинировать векторы *in vitro*, например, как описано у Hogrefe et al., Gene, 128: 119-126 (1993), или *in vivo* посредством комбинаторной инфекции, например, системы loxP, описанной у Waterhouse et al., Nucl. Acids Res., 21: 2265-2266 (1993). В походе рекомбинации *in vivo* используют двухцепочечную природу
- 40 фрагментов Fab для преодоления предела размера библиотеки, ограничивающего эффективностью трансформации *E. coli*. Не подвергавшиеся воздействию репертуары VH и VL клонируют раздельно, один в фагмидный вектор и другой в фаговый вектор. Затем две библиотеки объединяют путем инфекции фагом содержащих фагмиды бактерий, таким образом, что каждая клетка содержит различную комбинацию, и
- 45 размер библиотеки является ограниченным только числом содержащихся клеток (приблизительно клонов 10¹²). Оба вектора содержат сигналы рекомбинации *in vivo*, таким образом, что гены VH и VL рекомбинируют в один репликон и совместно упаковывают в фаговые вирионы. Такие крупномасштабные библиотеки обеспечивают

большие количества различных антител с хорошей аффинностью (K_d^{-1} приблизительно $10^{-8} M$).

[0172] Альтернативно, репертуары можно последовательно клонировать в тот же вектор, например, как описано у Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 7978-7982 (1991), или собирать совместно посредством ПЦР, а затем клонировать, например, как описано у Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991). Сборку ПЦР также можно использовать для соединения ДНК VH и VL с ДНК, кодирующей гибкий пептидный спейсер с образованием репертуаров одноцепочечной Fv (scFv). В еще одном другом способе "сборки в клетке с использованием ПЦР" используют для объединения генов VH и VL внутри лимфоцитов посредством ПЦР, а затем репертуаров клонов связанных генов, как описано у Embleton et al., Nucl. Acids Res., 20: 3831-3837 (1992).

[0173] Антитела, продуцируемые не подвергавшимися воздействию библиотеками (природными или синтетическими) могут обладать умеренной аффинностью (K_d^{-1} приблизительно от 10^6 до $10^7 M^{-1}$), но созревание аффинности также можно имитировать *in vitro* конструированием и повторным отбором из вторичных библиотек, как описано у Winter et al. (1994), выше. Например, можно вводить мутацию случайным образом *in vitro* с использованием ошибочной полимеразы (опубликовано у Leung et al., Technique, 1: 11-15 (1989)) в способе Hawkins et al., J. Mol. Biol., 226: 889-896 (1992) или в способе Gram et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 89: 3576-3580 (1992). Кроме того, созревание аффинности можно проводить случайной мутацией одной или более CDR, например, с использованием ПЦР с праймерами, несущими случайную последовательность, перекрывающуюся с представляющей интерес CDR, в выбранных отдельных клонах Fv и скринингом клонов с более высокой аффинностью. В WO 9607754 (опубликованной 14 марта, 1996 года) описали способ индукции мутагенеза в определяющей комплементарность области легкой цепи иммуноглобулина для создания библиотеки генов легкой цепи. Другой эффективный подход заключается в рекомбинации доменов VH или VL, отобранных посредством фагового дисплея, с репертуарами природных вариантов V-домена, получаемых от иммунизированных доноров, и скрининга на более высокую аффинность несколькими этапами перестановки цепи, как описано у Marks et al., Biotechnol., 10: 779-783 (1992). Этот способ обеспечивает получение антител и фрагментов антител с аффинностями приблизительно $10^{-9} M$ или менее.

[0174] Скрининг библиотек можно проводить различными известными в данной области способами. Например, для покрытия стенок планшетов для адсорбции можно использовать антиген, экспрессируемый на клетках-хозяевах, прикрепленных к планшетам для адсорбции или используемых при сортировке клеток, или конъюгированных с биотином для захвата покрытых стрептавидином гранул или используемых в любом другом способе пэннинга библиотеки фагового дисплея.

[0175] Образцы фаговой библиотеки приводят в контакт с иммобилизованным антигеном в условиях, подходящих для связывания по меньшей мере части фаговых частиц с адсорбентом. Как правило, условия, включая pH, ионную силу, температуру и т.п., выбирают так, чтобы имитировать физиологические условия. Связавшиеся в твердой фазой фаги промывают, а затем элюируют кислотой, например, как описано у Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 88: 7978-7982 (1991), или щелочью, например, как описано у Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991), или посредством конкуренции антигенов, например, в способе, аналогичном способу конкуренции антигенов Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991). Фаги можно обогащать в 20-1000 раз за один этап

отбора. Кроме того, обогащенные фаги можно выращивать в бактериальной культуре и подвергать дополнительным этапам отбора.

[0176] Эффективность отбора зависит от многих факторов, включая кинетику диссоциации во время промывания, и могут ли многие фрагменты антител на одном фаге взаимодействовать с антигеном одновременно. Антитела с быстрой кинетикой диссоциации (и слабыми аффинностями связывания) можно сохранять посредством применения коротких промываний, поливалентного фагового дисплея и высокой плотности покрытия антигена на твердой фазе. Высокая плотность не только стабилизирует фаг посредством поливалентных взаимодействий, а также способствует повторному связыванию фага, который подвергался диссоциации. Отбор антител с низкой кинетикой диссоциации (и хорошими показателями аффинности связывания) можно обеспечивать применением длительных промываний и моновалентного фагового дисплея, как описано у Bass et al., Proteins, 8: 309-314 (1990) и в WO 92/09690, и низкой плотности покрытия антигена, как описано у Marks et al., Biotechnol., 10: 779-783 (1992).

[0177] Возможно проводить отбор между фаговыми антителами с различными аффинностями к антигену, даже с аффинностями, которые различаются незначительно. Однако случайная мутация отобранного антитела (например, как проводят в некоторых способах созревания аффинности) с большой вероятностью приводит к получению многих мутантов, большей частью связывающихся с антигеном, и несколько с большей аффинностью. При ограниченном антигене редкие высокоаффинные фаги могут конкурировать. Для сохранения всех мутантов с более высокой аффинностью фаги можно инкубировать с избытком биотинилированного антигена, но с биотинилированным антигеном в концентрации более низкой молярности, чем молярная константа аффинности мишени для антигена. Затем фаги с высокой аффинностью связывания можно захватывать парамагнитными гранулами, покрытыми стрептавидином. Такой "равновесный захват" позволяет проводить отбор антител в соответствии с их аффинностями связывания с чувствительностью, которая позволяет выделять мутантных клонов с небольшой, такой как в два раза более высокой аффинностью из большого избытка фагов с более низкой активностью. Условия, используемые при промывании фагов, связанных с твердой фазой, также можно изменять для выявления их различий на основании кинетики диссоциации.

[0178] Клоны антител против антигена можно выбирать на основании активности. В определенных вариантах осуществления изобретение относится к антителам против антигена, которые связываются с живыми клетками, которые естественным образом экспрессируют антиген, или связываются со свободным плавающим антигеном или антигеном, присоединенным к другим клеточным структурам. Клоны Fv, соответствующие таким антителам против антигена, можно выбирать путем (1) выделения клонов антител против антигена из фаговой библиотеки, как описано выше, и необязательно амплификации выделенной популяции фаговых клонов путем культивирования популяции в подходящем бактериальном хозяине; (2) отбора антигена и второго белка против которых желательной является блокирующая и неблокирующая активность, соответственно; (3) адсорбции клонов фаговых клонов антител против антигена на иммунизированном антигене; (4) использования избытка второго белка для элюирования любых нежелательных клонов, которые распознают антигенсвязывающие детерминанты, которые перекрываются со связывающими детерминантами второго белка или имеют общие с ним связывающие детерминанты, и (5) элюирования клонов, которые остаются адсорбированными после этапа (4). Необязательно клоны с желаемыми свойствами блокирования/отсутствия блокирования

можно обогащать повторением описываемых в настоящем описании процедур отбора один или более раз.

[0179] ДНК, кодирующую получаемые из гибридомы моноклональные антитела или

клоны Fv фагового дисплея по изобретению можно легко выделять и секвенировать общепринятыми способами (например, с использованием олигонуклеотидных

праймеров, предназначенных специфически амплифицировать представляющие интерес кодирующие области тяжелых и легких цепей из гибридомы или фаговой ДНК-матрицы).

После выделения ДНК можно помещать в экспрессирующие векторы, которые затем трансфицируют в клетки-хозяева, такие как клетки *E. coli*, клетки обезьяны COS, клетки

ичиника китайского хомяка (CHO) или миеломные клетки, которые иным образом не продуцируют белок иммуноглобулина, для получения синтеза желаемых

моноклональные антитела в рекомбинантных клетках-хозяевах. Обзорные статьи по рекомбинантной экспрессии в бактериях кодирующей антитело ДНК включают Skerra et al., *Curr. Opinion in Immunol.*, 5: 256 (1993) и Pluckthun, *Immunol. Revs*, 130: 151 (1992).

[0180] ДНК, кодирующую клоны Fv по изобретению можно комбинировать с

известными последовательностями ДНК, кодирующей константные области тяжелой цепи и/или легкой цепи (например, соответствующие последовательности ДНК можно получать из Kabat et al., выше), с получением клонов, кодирующих полноразмерные или неполные тяжелые и/или легкие цепи. Следует понимать, что для этой цели можно

использовать константные области любого изотипа, включая константные области IgG, IgM, IgA, IgD и IgE, и что такие константные области можно получать от человека или любого вида животного. Как используют в настоящем описании, клон Fv,

получаемый из ДНК вариабельного домена одного вида животного (такого как человек), а затем слитый с ДНК константной области другого вида животного с получением

кодирующей последовательности(ей) "гибридной" полноразмерной тяжелой цепи и/или легкой цепи, входит в определение "химерного" и "гибридного" антитела. В определенных вариантах осуществления клон Fv, получаемый из ДНК вариабельной области человека сливают с ДНК константной области человека с получением кодирующей последовательности(ей) для полноразмерных или неполных тяжелых и/

или легких цепей человека.

[0181] ДНК, кодирующую антитело против антигена, получаемую из гибридомы по изобретению, также можно модифицировать, например, заменой кодирующей последовательности константных доменов тяжелой и легкой цепи человека вместо гомологичных последовательностей мыши, получаемых из гибридомного клона

(например, как в способе Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851-6855 (1984)). ДНК, кодирующую получаемое из гибридомы или клона Fv антитело или фрагмент, можно дополнительно модифицировать ковалентным присоединением к полной кодирующей последовательности иммуноглобулина или к части кодирующей последовательности для не являющегося иммуноглобулином полипептида. Таким

образом, получают "химерные" или "гибридные" антитела, которые обладают специфичностью связывания получаемых из клона Fv или гибридомного клона антител по изобретению.

(iv) Гуманизированные антитела и антитела человека

[0182] В данной области известны различные способы гуманизации не принадлежащих

человеку антител. Например, гуманизированное антитело содержит один или более вводимых в него аминокислотных остатков из источника, который не принадлежит человеку. Эти не принадлежащие человеку аминокислотные остатки часто обозначают как "импортируемые" остатки, которые, как правило, выделяют из "импортируемого"

вариабельного домена. Гуманизацию можно по существу проводить способом Winter и коллег (Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeven et al., Science, 239:1534-1536 (1988)) заменой CDR грызуна или последовательностей CDR на соответствующие последовательности антитела человека.

- 5 Таким образом, такие "гуманизированные" антитела представляют собой химерные антитела (патент США № 4816567), где по существу менее чем один интактный вариабельный домен человека заменили соответствующей последовательностью от видов, не являющихся человеком. На практике гуманизированные антитела, как правило, представляют собой антитела человека, в которых некоторые остатки CDR и, возможно,
- 10 некоторые остатки FR заменили остатками из аналогичных участков в антителах грызунов.

[0183] Для снижения антигенности важно выбирать вариабельные домены человека, как тяжелой так и легкой цепи, которые следует использовать для получения гуманизированных антител,. В соответствии с так называемым способом "наилучшего

- 15 подбора" проводят скрининг последовательности вариабельного домена антитела грызуна против полной библиотеки известных последовательностей вариабельного домена человека. Затем последовательность человека, которая является наиболее близкой к последовательности грызуна, принимают в качестве каркасной области человека (FR) для гуманизированного антитела (Sims et al., J. Immunol., 151:2296 (1993);
- 20 Chothia et al., J. Mol. Biol., 196:901 (1987)). В другом способе используют конкретную каркасную область, выделяемую из консенсусной последовательности всех антител человека конкретной подгруппы легких или тяжелых цепей. Такую же каркасную область можно использовать для нескольких различных гуманизированных антител (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); Presta et al., J. Immunol., 151:2623 (1993)).

[0184] Также является важным, что антитела гуманизируют при сохранении высокой аффинности к антигену и других благоприятных биологических свойств. Для достижения этой цели по одному из вариантов осуществления способа гуманизированные антитела получают способом анализа исходных последовательностей и различных

- 30 концептуальных гуманизированных продуктов с использованием трехмерных моделей исходных и гуманизированных последовательностей. Трехмерные модели иммуноглобулина являются широко доступными и хорошо известны специалистам в данной области. Доступными являются компьютерные программы, которые иллюстрируют и отображают возможные трехмерные конформационные структуры
- 35 выбранных последовательностей-кандидатов иммуноглобулинов. Исследование этих отображений позволяет проводить анализ вероятной роли остатков в функционировании последовательности-кандидата иммуноглобулина, т.е. анализ остатков, которые влияют на способность иммуноглобулина-кандидата связываться со своим антигеном. Таким образом, остатки FR можно выбирать и комбинировать из реципиентных и
- 40 импортируемых последовательностей, таким образом, что получают желаемую характеристику антитела, такую как повышенная аффинность к целевому антигену(ам). В основном, остатки гипервариабельной области непосредственно и наиболее существенно влияют на связывание антигена.

- [0185] Антитела человека по изобретению можно конструировать путем объединения 45 последовательности(ей) вариабельного домена клона Fv, выбранной из библиотеки фагового дисплея человека, с известной последовательностью(ями) константного домена человека, как описано выше. Альтернативно, моноклональные антитела человека по изобретению можно получать способом гибридомы. Были описаны линии

миеломных клеток человека и гетеромиеломных клеток мыши-человека для продукции моноклональных антител человека, например, Kozbor J. Immunol., 133: 3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987) и Boerner et al., J. Immunol., 147: 86 (1991).

⁵ [0186] Можно получать трансгенных животных (например, мышей), которые способны после иммунизации продуцировать полных репертуар антител человека при отсутствии продукции эндогенного иммуноглобулина. Например, описано, что гомозиготная делеция гена области стыка тяжелой цепи (J_H) антитела у химерных и мутантных по зародышевой линии мышей приводит к полному ингибированию

¹⁰ продукции эндогенных антител. Перенос набора генов иммуноглобулина зародышевой линии человека у таких мутантных по зародышевой линии мышей приводит к продукции антител человека при стимуляции антигеном. См., например, Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993); Brugermann et al., Year in Immuno., 7:33 (1993) и Duchosal et al., Nature, 355:258 (1992).

¹⁵ [0187] Также можно использовать перестановку генов для получения антител человека из не принадлежащих человеку антител, например, антител грызунов, где антитело человека обладает аналогичными аффинностями и специфичностями по отношению к исходному не принадлежащему человеку антителу. В соответствии с этим способом, который также называют "импринтингом эпитопа", вариабельную область тяжелой

²⁰ или легкой цепи фрагмента не принадлежащего человеку антитела, получаемого техниками фагового дисплея, как описано в настоящем описании, заменяют репертуаром генов V-домена человека, получая популяцию химер scFv или Fab не принадлежащей человеку цепи/цепи человека. Отбор с использованием антигена приводит к выделению химерных scFv или Fab не принадлежащей человеку цепи/цепи человека, где цепь человека

²⁵ восстанавливает антигенсвязывающий участок, разрушенный при удалении соответствующей не принадлежащей человеку цепи в первом клоне фагового дисплея, т.е. эпитоп определяет (закрепляет) выбор партнера для цепи человека. Когда способ повторяют для замены оставшейся не принадлежащей человеку цепи, получают антитело человека (см. РСТ WO 93/06213, опубликованную 1 апреля 1993 года). В отличие от

³⁰ общепринятой гуманизации не принадлежащего человеку антитела пересадкой CDR, этот способ обеспечивает полностью принадлежащие человеку антитела, которые не содержат остатки FR или CDR, не принадлежащие человеку.

(v) Фрагменты антител

³⁵ [0188] Фрагменты антител можно получать общепринятыми средствами, такими как ферментативное расщепление или рекомбинантными способами. В определенных обстоятельствах предпочтительно использовать фрагменты антител, а не полные антитела. Меньший размер фрагментов обеспечивает быстрый клиренс и может приводить к улучшенному доступу к солидным опухолям. Для обзора определенных фрагментов антител, см. Hudson et al., (2003) Nat. Med., 9:129-134.

⁴⁰ [0189] Разработаны различные техники получения фрагментов антител. Общепринято эти фрагменты получали посредством протеолитического расщепления интактных антител (см., например, Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 24:107-117 (1992) и Brennan et al., Science, 229:81 (1985)). Однако в настоящее время эти фрагменты могут продуцировать непосредственно рекомбинантные клетки-хозяева.

⁴⁵ Фрагменты Fab, Fv и scFv антител также могут экспрессироваться и секретироваться E. coli, таким образом, обеспечивая простое получение больших количеств этих фрагментов. Фрагменты антител можно выделять из фаговых библиотек антител, описываемых выше. Альтернативно, фрагменты Fab'-SH можно непосредственно

выделять из *E. coli* и химически связывать с получением фрагментов F(ab')₂ (Carter et al., Bio/Technology, 10:163-167 (1992)). Согласно другому подходу фрагменты F(ab')₂ можно выделять непосредственно из культуры рекомбинантных клеток-хозяев. Фрагменты Fab и F(ab')₂ с повышенным временем полужизни *in vivo*, содержащим остатки эпитопа связывания рецептора спасения, описаны в патенте США № 5869046. Другие способы получения фрагментов антител будут очевидны практикующим специалистам. В определенных вариантах осуществления антитело представляет собой одноцепочечный фрагмент Fv (scFv). См. WO 93/16185; патенты США № 5571894 и 5587458. Fv и scFv являются единственными молекулами с интактными связывающими участками, которые не содержат константных областей; таким образом, они могут являться подходящими для снижения неспецифического связывания при использовании *in vivo*. Слитые белки scFv можно конструировать с получением слияния эффекторного белка на амино- или С-конце scFv. См. Antibody Engineering, ed. Borrebaeck, выше. Фрагмент антитела также может представлять собой "линейное антитело", например, как описано в патенте США № 5641870. Такие линейные антитела могут быть моноспецифическими или биспецифическими.

(vi) Полиспецифические антитела

[0190] Полиспецифические антитела обладают специфичностью связывания по меньшей мере к двум различным эпитопам, где эпитопы, как правило, происходят от различных антигенов. Несмотря на то, что такие молекулы обычно связываются только с двумя различными эпитопами (т.е. биспецифические антитела, BsAb), антитела с дополнительными видами специфичности, такие как триспецифические антитела, входят в это выражение при использовании в настоящем описании. Биспецифические антитела можно получать как полноразмерные антитела или фрагменты антител (например, биспецифические антитела F(ab')₂).

[0191] Способы получения биспецифических антитела известны в данной области. Общепринятое получение полноразмерных биспецифических антител основано на коэкспрессии двух пар тяжелой цепи-легкой цепи иммуноглобулина, где две цепи обладают различными видами специфичности (Millstein et al., Nature, 305:537-539 (1983)). Вследствие случайного распределения тяжелых и легких цепей иммуноглобулина, эти гибридомы (квадромы) produцируют потенциальную смесь 10 различных молекул антител, из которых только одно обладает правильной биспецифической структурой. Очистка правильной молекулы, которую, как правило, проводят несколькими этапами аффинной хроматографии, является довольно трудоемкой, а выходы продукта являются низкими. Аналогичные способы описаны в WO 93/08829 и в Traunecker et al., EMBO J., 10:3655-3659 (1991).

[0192] В соответствии с другим подходом вариабельные домены антитела с желаемой специфичностью связывания (связывающие участки антитело-антиген) сливают с последовательностями константного домена иммуноглобулина. Предпочтительно слияние проводят с константным доменом тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащим по меньшей мере часть шарнирной области, области CH2 и CH3. Как правило, по меньшей мере в одном из слияний присутствует первая константная область (CH1) тяжелой цепи, содержащая участок, необходимый для связывания легкой цепи. ДНК, кодирующую слияния тяжелой цепи иммуноглобулина и при желании легкой цепи иммуноглобулина, вводят в отдельные экспрессирующие векторы и совместно трансфицируют в подходящий организм-хозяин. Это обеспечивает большую гибкость при регуляции соответствующих пропорций трех полипептидных фрагментов в

вариантах осуществления, когда используемые в конструкции неравные отношения трех полипептидных цепей обеспечивают оптимальные выходы. Однако когда экспрессия по меньшей мере двух полипептидных цепей в равных отношениях приводит к высоким выходам, или когда отношения не имеют особого значения, кодирующие 5 последовательности двух или всех трех полипептидных цепей можно вводить в один экспрессирующий вектор.

[0193] В одном из вариантов осуществления этого подхода биспецифические антитела состоят из гибридной тяжелой цепи иммуноглобулина с первой специфичностью связывания на одном плече и гибридной пары тяжелая цепь-легкая цепь

- 10 иммуноглобулина (обеспечивающей вторую специфичность связывания) на другом плече. Выявлено, что такая асимметричная структура облегчает разделение желаемого биспецифического соединения от нежелательных комбинаций цепей иммуноглобулина, т.к. наличие легкой цепи иммуноглобулина только в одной половине биспецифической молекулы обеспечивает легкий способ разделения. Этот подход описан в WO 94/04690.
- 15 Более подробное описание получения биспецифических антитела см., например, Suresh et al., Methods in Enzymology, 121:210 (1986).

[0194] В соответствии с другим подходом, описанным в WO96/27011, область контакта между парой молекул антител можно конструировать так, чтобы доводить до максимума процент гетеродимеров, которые выделяют из культуры рекомбинантных клеток. Одна 20 область контакта содержит по меньшей мере пару доменов С_H3 константного домена антитела. В этом способе одну или более небольших аминокислотных боковых цепей в области контакта первой молекулы антитела заменяют большими боковыми цепями (например, тирозином или триптофаном). В области контакта второй молекулы антитела создают компенсаторные "полости" идентичного или сходного размера с большой 25 боковой цепью(ями) путем размены больших аминокислотных боковых цепей меньшими аминокислотными боковыми цепями (например, аланином или треонином). Это обеспечивает механизм повышения выхода гетеродимера по сравнению с другими нежелательными конечными продуктами, такими как гомодимеры.

- 30 [0195] Биспецифические антитела включают перекрестносшитые или "гетероконъюгатные" антитела. Например, одно из антител в гетероконъюгате может быть связано с avidином, другое - с биотином. Такие антитела, например, были предложены для направленной доставки клеток иммунной системы в нежелательные клетки (патент США № 4676980) и для лечения инфекции ВИЧ (WO 91/00360, WO 92/ 200373 и EP 03089). Гетероконъюгированные антитела можно получать общепринятыми 35 способами перекрестного сшивания. Подходящие сшивающие средства хорошо известны в данной области и описаны в патенте США № 4676980, наряду с другими техниками перекрестного сшивания.

- 40 [0196] Способы получения биспецифических антител из фрагментов антител также описаны в литературе. Например, биспецифические антитела можно получать с использованием химической связи. Brennan et al., Science, 229: 81 (1985) описывают способ, где интактные антитела подвергают протеолитическому расщеплению с получением фрагментов F(ab')₂. Эти фрагменты восстанавливают в присутствии средства, образующего дитиоловый комплекс, арсенит натрия, для стабилизации смежных дитиолов и предотвращения образования межмолекулярной дисульфидной связи. Затем 45 получаемые фрагменты Fab' преобразуют в производные тионитробензоата (TNB). Затем одно из производных Fab'-TNB снова преобразуют в Fab'-тиол путем восстановления меркаптоэтиламином и смешивают с эквимолярным количеством другого производного Fab'-TNB с образованием биспецифического антитела.

Получаемые биспецифические антитела можно использовать в качестве средств для селективной иммобилизации ферментов.

[0197] Последние достижения в данной области привели к облегчению прямого выделения фрагментов Fab'-SH из *E. coli*, которые можно химически связывать с образованием биспецифических антител. Shalaby et al., J. Exp. Med., 175: 217-225 (1992) описывают получение молекулы полностью гуманизированного биспецифического антитела F(ab')₂. Каждый фрагмент Fab' раздельно секретировали *E. coli* и подвергали направленному химическому связыванию *in vitro* с образованием биспецифического антитела.

[0198] Также описаны различные техники получения и выделения фрагментов биспецифических антител непосредственно из культуры рекомбинантных клеток. Например, биспецифические антитела получали с использованием лейциновой застежки. Kostelny et al., J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992). Пептиды лейциновой застежка из белков Fos и Jun связывали с участками Fab' двух различных антител путем слияния генов. Гомодимеры антител восстанавливали в шарнирной области с получением мономеров, а затем повторно окисляли с получением гетеродимеров антител. Этот способ также можно использовать для получения гомодимеров антител. Технология "диатела", описанная Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993), обеспечивала альтернативный механизм получения фрагментов биспецифического антитела. Фрагменты содержат вариабельный домен тяжелой цепи (V_H), соединенный с вариабельным доменом легкой цепи (V_L) посредством линкера, который является слишком коротким, чтобы обеспечивать спаривание между двумя доменами на одной и той же цепи. Таким образом, обеспечивают спаривание доменов V_H и V_L одного фрагмента с комплементарными доменами V_L и V_H другого фрагмента, таким образом получая два антигенсвязывающих участка. Также описана другая стратегия получения фрагментов биспецифических антител с использованием одноцепочечных димеров Fv (sFv). См. Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994).

[0199] Предусматривают антитела более чем с двумя валентностями. Например, можно получать триспецифические антитела. Tuft et al., J. Immunol. 147: 60 (1991).

(vii) Однодоменные антитела

[0200] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению представляет собой однодоменное антитело. Однодоменное антитело представляет собой одну полипептидную цепь, содержащую полный вариабельный домен тяжелой цепи или часть его части и полный вариабельный домен легкой цепи антитела или его части. В определенных вариантах осуществления однодоменное антитело представляет собой однодоменное антитело человека (Domantis, Inc., Waltham, Mass.; см., например, патент США № 6248516 B1). В одном из вариантов осуществления однодоменное антитело состоит из полного вариабельного домена тяжелой цепи антитела или его части.

(viii) Варианты антител

[0201] В некоторых вариантах осуществления проводят модификацию(и) аминокислотной последовательности антител, описываемых в настоящем описании. Например, желательным может являться улучшение аффинности связывания и/или других биологических свойств антитела. Варианты аминокислотной последовательности антитело можно получать введением соответствующих изменений в нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело, или пептидным синтезом. Такие модификации включают, например, делеции и/или вставки, и/или замены остатков в аминокислотных последовательностях антитела. В конечную конструкцию можно

вводить любое сочетание делеций, вставок и замен при условии, что конечная конструкция обладает желаемыми характеристиками. Изменения аминокислот можно проводить в индивидуальной аминокислотной последовательности антитела в момент получения такой последовательности.

5 (ix) Производные антител

[0202] Антитела по изобретению можно дополнительно модифицировать для того, чтобы они содержали дополнительные небелковые молекулы, которые известны в данной области и являются легкодоступными. В определенных вариантах осуществления молекулы, подходящие для дериватизации антитела, представляют собой

- 10 водорастворимые полимеры. Неограничивающие примеры водорастворимых полимеров включают, но не ограничиваются ими, полиэтиленгликоль (PEG), сополимеры этиленгликоля/пропиленгликоля, карбоксиметилцеллюлозу, декстран, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон, поли-1,3-диоксолан, поли-1,3,6-триоксан, сополимер этилен/малеиновый ангидрид, полиаминокислоты (гомополимеры или статистические 15 сополимеры) и декстран или поли(н-винилпирролидон)полиэтиленгликоль, гомополимеры проприленгликоля, сополимеры пролипропиленоксид/этиленоксид, полиоксиэтилированные полиолы (например, глицерин), поливиниловый спирт и их смеси. Пропиональдегид полиэтиленгликоля может обеспечивать преимущества при производстве вследствие своей стабильности в воде. Полимер может иметь любую 20 молекулярную массу и может являться разветвленным или неразветвленным. Число полимеров, присоединенных к антителу, может варьироваться, и если присоединяют более одного полимера, полимеры могут состоять из одинаковых или различных молекул. В основном число и/или тип полимеров, используемых для дериватизации, можно определять, исходя из нескольких факторов, включая, но, не ограничиваясь 25 ими, конкретные свойства или функции антитела, которые необходимо улучшать, независимо от определенных условий терапии, при которой будут использовать производное антитела, и т.д.

(x) Векторы, клетки-хозяева и рекомбинантные способы

[0203] Антитела также можно получать рекомбинантными способами. Для

- 30 рекомбинантной продукции антитело к антигену, нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, выделяют и встраивают в реплицируемый вектор для последующего клонирования (амплификации ДНК) или для экспрессии. ДНК, кодирующую антитело, можно легко выделять и секвенировать общепринятыми способами (например, с использованием олигонуклеотидных зондов, которые способны специфически 35 связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи антитела). Многие векторы являются доступными. Компоненты вектора, как правило, включают, но не ограничиваются ими, один или более из указанных ниже: сигнальную последовательность, участок начала репликации, один или более маркерных генов, энхансерный элемент, промотор и последовательность терминации транскрипции.

40 (a) Компонент сигнальной последовательности

[0204] Антитело по изобретению можно получать рекомбинантно не только непосредственно, но также в виде слитого полипептида с гетерологичным полипептидом, которые предпочтительно представляют собой сигнальную последовательность или другой полипептид, содержащий конкретный участок расщепления на N-конце зрелого 45 белка или полипептида. Выбранная гетерологичная сигнальная последовательность предпочтительно представляет собой последовательность, которая распознается и процессируется (например, отщепляется сигнальной пептидазой) клеткой-хозяином. Для прокариотических клеток-хозяев, которые не распознают и не процессируют

нативную сигнальную последовательность антитела, сигнальную последовательность заменяют прокариотической сигнальной последовательностью, выбранной, например, из группы лидерных последовательностей щелочной фосфатазы, пенициллиназы, *Ipp* или термостабильного энтеротоксина II. Для секреции в дрожжах нативную сигнальную

- 5 последовательность можно заменять, например, лидерной последовательностью инвертазы дрожжей, лидерной последовательностью фактора (включая лидерные последовательности α -фактора *Saccharomyces* и *Kluyveromyces*) или лидерной последовательностью кислой фосфатазы, лидерной последовательностью глюкоамилазы *C. albicans* или сигнальной последовательностью, описанной в WO 90/13646. Для
10 экспрессии в клетках млекопитающего доступными являются сигнальные последовательности млекопитающих, а также секреторные лидерные последовательности вирусов, например, сигнальная последовательность gD простого герпеса.

(b) Участок начала репликации

- 15 [0205] Экспрессирующие и клонирующие векторы содержат последовательность нуклеиновой кислоты, которая обеспечивает репликацию вектора в одной или более выбранных клетках-хозяевах. Как правило, в клонирующих векторах такая последовательность представляет собой последовательность, которая обеспечивает репликацию вектора независимо от хромосомной ДНК хозяина, и содержит участки
20 начала репликации или автономно реплицирующиеся последовательности. Такие последовательности хорошо известны для ряда бактерий, дрожжей и вирусов. Участок начала репликации из плазиды pBR322 является подходящим для большей части грамотрицательных бактерий, участок начала репликации плазиды 2 μ является подходящим для дрожжей, и участки начала репликации различных вирусов (SV40,
25 полиомы, аденоовириуса, VSV или BPV) являются пригодными для клонирования векторов в клетки млекопитающих. Как правило, компонент участка начала репликации не является обязательным для экспрессирующих векторов млекопитающих (участок начала репликации SV40, как правило, можно использовать только вследствие того, что содержит ранний промотор).

30 (c) Компонент селективного гена

- [0206] Экспрессирующие и клонирующие векторы могут содержать селективный ген, также называемый селектируемым маркером. Характерные селективные гены включают белки, которые (a) придают устойчивость к антибиотикам или другим токсинам, например, ампициллину, неомицину, метотрексату или тетрациклину, (b)
35 компенсируют дефицит, обусловленный ауксотрофией, или (c) обеспечивают доставку важных питательных веществ, недоступных из сложных сред, например, ген, кодирующий D-аланинрациемазу для *Bacilli*.

- [0207] В одном из примеров схемы отбора используют лекарственное средство, которое блокирует рост клетки-хозяина. Такие клетки, которые эффективно
40 трансформируют гетерологичным геном, продуцируют белок, придающий устойчивость к лекарственному средству, и, таким образом, выживают в схемах отбора. В примерах такого доминантного отбора используют лекарственные средства неомицин, миофеноловую кислоту и гигромицин.

- [0208] Другой пример подходящих селектируемых маркеров для клеток
45 млекопитающих представляет собой маркеры, которые обеспечивают идентификацию клеток, способных захватывать кодирующую антитело нуклеиновую кислоту, такие как DHFR, глутаминсингтетаза (GS), тимидинкиназа, металлотионеина-I и -II, предпочтительно гены металлотионеина приматов, аденоzinдиаминаза,

орнитиндекарбоксилаза и т.д.

[0209] Например, клетки, трансформированные геном DHFR, идентифицируют культивированием трансформантов в среде для культивирования, содержащей метотрексат (Mtx), конкурентный антагонист DHFR. В этих условиях ген DHFR

5 амплифицируется наряду с любой другой совместно трансформированной нуклеиновой кислотой. Можно использовать линию клеток яичника китайского хомяка (CHO) с недостатком активности эндогенного DHFR (например, ATCC CRL-9096).

[0210] Альтернативно, клетки, трансформированные геном GS, идентифицируют культивированием трансформантов в среде для культивирования, содержащей L-

10 метионинсульфоксимин (Msx), ингибитор GS. В этих условиях ген GS амплифицируется наряду с любой другой совместно трансформированной нуклеиновой кислотой. Систему отбора GS/амплификации можно использовать в комбинации с системой отбора DHFR/амплификации, описанной выше.

[0211] Альтернативно, клетки-хозяева (в частности хозяева дикого типа, которые 15 содержат эндогенный DHFR), трансформированные или совместно трансформированные последовательностями ДНК, кодирующей представляющее интерес антитело, ген DHFR дикого типа и другой селектируемый маркер, такой как аминогликозид-3'-фосфотрансфераза (APN), можно отбирать по росту клеток в среде, содержащей селективное средство для селектируемого маркера, такого как аминогликозидный 20 антибиотик, например, канамицин, неомицин или G418. См. патент США № 4965199.

[0212] Подходящий селективный ген для применения в дрожжах представляет собой ген trp1, содержащийся в дрожжевой плазмиде YRp7 (Stinchcomb et al., Nature, 282:39 25 (1979)). Ген trp1 представляет собой селективный маркер для мутантного штамма дрожжей, лишенных способности расти в триптофане, например, ATCC № 44076 или PEP4-1. Jones, Genetics, 85:12 (1977). Наличие повреждений в trp1 в геноме дрожжевой 30 клетки-хозяина, таким образом, обеспечивает эффективные условия для детекции трансформации по росту в отсутствие триптофана. Аналогично, дефектные по Leu2 штаммы дрожжей (ATCC 20.622 или 38.626) дополняют известными плазмидами, несущими ген Leu2.

[0213] Кроме того, для трансформации дрожжей *Kluyveromyces* можно использовать 35 векторы, получаемые из 1,6 мкм кольцевой плазмиды pKD1. Альтернативно, для *K. lactis* была опубликована экспрессирующая система для крупномасштабной продукции рекомбинантного химозина теленка. Van den Berg, Bio/Technology, 8:135 (1990). Также были описаны стабильные многокопийные экспрессирующие векторы для секреции зрелого рекомбинантного сывороточного альбумина человека промышленными 40 штаммами *Kluyveromyces*. Fleer et al., Bio/Technology, 9:968-975 (1991).

(d) Промоторный компонент

[0214] Экспрессирующие и клонирующие векторы, как правило, содержат промотор, 45 который распознается организмом-хозяином и является функционально связанным с нуклеиновой кислотой, кодирующей антитело. Промоторы, пригодные для использования с прокариотическими хозяевами, включают промотор phoA, промоторные системы β-лактамазы и лактозы, промотор щелочной фосфатазы, промоторную систему триптофана (trp) и гибридные промоторы, такие как промотор tac. Однако подходящими являются другие известные бактериальные промоторы. Промоторы для применения 50 в бактериальных системах также содержат последовательность Шайна-Дальгарно (S.D.), функционально связанную с ДНК, кодирующей антитело.

[0215] Известны промоторные последовательности для эукариот. Фактически все 55 эукариотические гены содержат AT-богатую область, располагающуюся приблизительно

от 25 до 30 пар выше участка инициации транскрипции. Другая последовательность, встречающаяся от 70 до 80 пар выше старта транскрипции многих генов, представляет собой область СНСААТ, где N может представлять собой любой нуклеотид. На 3'-конце большей части эукариотических генов располагается последовательность АТААА,

- 5 которая может представлять собой сигнал добавления хвоста поли-А к 3'-концу кодирующей последовательности. Все эти последовательности подходящим образом вводят в эукариотические экспрессирующие векторы.

[0216] Примеры подходящих промоторных последовательностей для использования с хозяевами-дрожжами включают промоторы для 3-фосфоглицераткиназы или других 10 гликолитических ферментов, таких как енолаза, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, гексокиназа, пируватдекарбоксилаза, фосфофруктокиназа, глюкоза-6-фосфатизомераза, 3-фосфоглицератмутаза, пируваткиназа, триозофосфатизомераза, фосфоглюкозоизомераза и глюкокиназа.

[0217] Другие промоторы дрожжей, которые представляют собой индуцибелльные 15 промоторы с дополнительным преимуществом транскрипции, регулируемой условиями роста, представляют собой промоторные области для алкогольдегидрогеназы 2, изоцитохрома С, кислой фосфатазы, деструктивных ферментов, связанных с метаболизмом азота, металлотионеина, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы и ферментов, участвующих в утилизации мальтозы и галактозы. Подходящие векторы 20 и промоторы для применения при экспрессии в дрожжах дополнительно описаны в ЕР 73657. С промоторами дрожжей преимущественно используют энхансеры дрожжей.

[0218] Транскрипцию антитело из векторов в клетках-хозяевах млекопитающих можно регулировать, например, промоторами, получаемыми из геномов вирусов, таких 25 как вирус полиомы, вирус куриной оспы, аденоовирус (такой как аденоовирус 2), вирус папилломы крупного рогатого скота, вирус саркомы птиц, цитомегаловирус, ретровирус, вирус гепатита В, вирус обезьян 40 (SV40), или из гетерологичных промоторов млекопитающих, например, промотора актина или промотора иммуноглобулина, из промоторов белков теплового шока при условии, что такие промоторы являются совместимыми с системами клетка-хозяин.

[0219] Ранние и поздние промоторы вируса SV40 подходящим способом получают 30 в виде SV40 рестрикционного фрагмента, который также содержит участок начала репликации вируса SV40. Предранний промотор цитомегаловируса человека подходящим способом получают в виде рестрикционного фрагмента HindIII E. Система экспрессии ДНК в хозяевах млекопитающих, в которой в качестве вектора 35 используют папиломавирус крупного рогатого скота, описана в патенте США № 4419446. Модификация этой системы описана в патенте США № 4601978. Также см. Reyes et al., Nature 297:598-601 (1982) в отношении экспрессии кДНК β-интерферона человека в клетках мышь под контролем тимидинкиназного промотора из вируса простого герпеса. Альтернативно в качестве промотора можно использовать длинный 40 концевой повтор вируса саркомы Payusa.

(e) Компонент энхансерного элемента

[0220] Транскрипцию ДНК, кодирующей антитело по настоящему изобретению, высшими эукариотами часто повышают встраиванием энхансерной последовательности в вектор. В настоящее время известно много энхансерных последовательностей из 45 генов млекопитающих (глобин, эластаза, альбумин, α-фетопротеин и инсулин). Однако, как правило, используют энхансер из вируса эукариотических клеток. Примеры включают энхансер SV40 в поздней области участка начала репликации (100-270 п.н.), энхансер раннего промотора цитомегаловируса, энхансер полиомы в поздней области

участка начала репликации и энхансеры аденоовируса. Касательно энхансерных элементов для активации эукариотических промоторов также см. Yaniv, Nature, 297:17-18 (1982). Энхансер можно встраивать в вектор в положении 5' или 3' по отношению к кодирующей антитело последовательности, но предпочтительно он располагается на участке 5' от промотора.

5 (f) Компонент терминации транскрипции

[0221] Экспрессирующие векторы, используемые в эукариотических клетках-хозяевах (клетках дрожжей, грибов, насекомых, растений, животных, человека или ядроодержащих клетках от других многоклеточных организмов) также содержат

10 последовательности, необходимые для терминации транскрипции и для стабилизации мРНК. Такие последовательности главным образом являются доступными из 5'- и в некоторых случаях из 3'-нетранслируемых областей эукариотической или вирусной ДНК или κ ДНК. Эти области содержат нуклеотидные сегменты, транскрибируемые в виде полиаденинированных фрагментов в нетранслируемом участке мРНК, кодирующей 15 антитело. Один из пригодных компонентов терминации транскрипции представляет собой полиаденинированную область бычьего гормона роста. См. WO94/11026 и описываемый там экспрессирующий вектор.

(g) Отбор и трансформация клеток-хозяев

[0222] Подходящие клетки-хозяева для клонирования или экспрессии ДНК в векторах 20 в настоящем описании представляют собой описанные выше прокариотические, дрожжевые клетки или клетки высших эукариот. Подходящие прокариоты для этой цели включают эубактерии, такие как грамотрицательные или грамположительные организмы, например, Enterobacteriaceae, такие как Escherichia, например, E. coli, Enterobacter, Erwinia, Klebsiella, Proteus, Salmonella, например, Salmonella typhimurium, 25 Serratia, например, Serratia marcescans и Shigella, а также Bacilli, такие как B. subtilis и B. licheniformis (например, B. licheniformis 41P, описанную в DD 266710, опубликованной 12 апреля 1989 года), Pseudomonas, такую как P. aeruginosa, и Streptomyces. Одним из 30 предпочтительных для клонирования хозяев E. coli является E. coli 294 (ATCC 31,446), хотя подходящими являются другие штаммы, такие как E. coli B, E. coli X1776 (ATCC 31.537) и E. coli W3110 (ATCC 27.325). Эти примеры являются иллюстративными, а не ограничивающими.

[0223] Полноразмерное антитело, слитые белки антитела и фрагменты антител можно получать в бактериях, в частности, когда гликозилирование и эффекторная функция Fc не являются обязательными, как в случае терапевтического антитела,

35 конъюгированного с цитотоксическим средством (например, токсином), которое само по себе является эффективным в отношении разрушения опухолевых клеток. Полноразмерные антитела имеют большее время полувыведения из кровотока.

Продукция в E. coli является более быстрой и в большей степени экономически эффективной. Для экспрессии фрагментов антител и полипептидов в бактериях, см.,

40 например, патент США № 5648237 (Carter et. al.), патент США № 5789199 (Joly et al.), патент США № 5840523 (Simmons et al.), в которых описывают область инициации трансляции (TIR) и сигнальные последовательности для оптимизации экспрессии и секреции. См. также Charlton, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J., 2003), pp. 245-254, в которой описывают экспрессию фрагментов

45 антител в E. coli. После экспрессии антитело можно выделять из клеточной массы E. coli в растворимой фракции и можно очищать, например, посредством колонки с белком A или G в зависимости от изотипа. Конечную очистку можно проводить аналогично способу очистки антитело, экспрессируемого, например, в клетках СНО.

[0224] Наряду с прокариотами эукариотические микроорганизмы, такие как нитевидные грибы или дрожжи, являются подходящими хозяевами для клонирования или экспрессии кодирующих антилого векторов. *Saccharomyces cerevisiae* или обычные пекарские дрожжи наиболее широко используются среди низших эукариотических

- 5 микроорганизмов-хозяев. Однако широко доступным и пригодным в настоящем описании является ряд других родов, видов и штаммов, таких как *Schizosaccharomyces pombe*; хозяева рода *Kluyveromyces*, такие как, например, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickeramii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilae* (ATCC 36.906), *K. thermotolerans* и *K. marxianus*; *Yarrowia* (EP 402226);
- 10 *Pichia pastoris* (EP 183070); *Candida*; *Trichoderma reesiae* (EP 244234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces*, такие как *Schwanniomyces occidentalis*, и нитевидные грибы, такие как, например, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* и хозяева *Aspergillus*, такие как *A. nidulans* и *A. niger*. Для обзора, в котором обсуждают использование дрожжей и нитевидных грибов для получения терапевтических белков, см., например, Gerngross, Nat. Biotech., 15 22:1409-1414 (2004).

[0225] Можно выбирать определенные штаммы грибов и дрожжей, в которых пути гликозилирования "гуманизировали", что приводит к продукции антилого с частичным или полным профилем гликозилирования человека. См., например, Li et al., Nat. Biotech., 24:210-215 (2006) (в которой описывают гуманизацию путем гликозилирования в *Pichia pastoris*) и Gerngross et al., выше.

[0226] Подходящие клетки-хозяева для экспрессии гликозилированного антилого также получают из многоклеточных организмов (беспозвоночных и позвоночных). Примеры клетки беспозвоночных включают клетки растений и насекомых.

- Идентифицировано множество штаммов и вариантов бактериальных вирусов и соответствующих 25 пермиссивных клеток-хозяев насекомых из хозяев, таких как *Spodoptera frugiperda* (гусеница), *Aedes aegypti* (комар), *Aedes albopictus* (комар), *Drosophila melanogaster* (плодовая мушка) и *Bombyx mori*. Общедоступным является ряд штаммов вирусов для трансфекции, например, вариант L-1 *Autographa californica* NPV и штамм Bm-5 *Bombyx mori* NPV, и такие вирусы можно использовать в качестве вируса в настоящем описании 30 по изобретению, в частности для трансфекции клеток *Spodoptera frugiperda*.

[0227] В качестве хозяев также можно использовать культуры растительных клеток хлопка, кукурузы, картофеля, соевых бобов, петунии, помидора, ряски (*Leninaceae*), люцерны (*M. truncatula*) и табака. См., например, патенты США № 5959177, 6040498, 6420548, 7125978 и 6417429 (в которых описывают технологию PLANTIBODIES™ 35 продукции антилого в трансгенных растениях).

- [0228] В качестве хозяев можно использовать клетки позвоночных, и выращивание клеток позвоночных в культуре (тканевой культуре) стало рутинной процедурой. Примеры пригодных линий клеток-хозяев млекопитающих представляют собой линию клеток почки обезьяны CV1, трансформированную SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); 40 линию клеток эмбриональной почки человека (клетки 293 или 293, субклонированные для роста в суспензионной культуре, Graham et al., J. Gen Virol., 36:59 (1977)); клетки почки детенышей хомяка (BHK, ATCC CCL 10); клетки Сертоли мыши (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); клетки почки обезьяны (CV1 ATCC CCL 70); клетки почки африканской зелено-мартышки (VERO-76, ATCC CRL-1587); клетки карциномы 45 шейки матки человека (HELA, ATCC CCL 2); клетки почки собаки (MDCK, ATCC CCL 34); клетки печени серой крысы (BRL 3A, ATCC CRL 1442); клетки легких человека (W138, ATCC CCL 75); клетки печени человека (Hep G2, HB 8065); опухоль молочной железы мыши (MMT 060562, ATCC CCL51); клетки TRI (Mather et al., Annals N.Y. Acad.

Sci., 383:44-68 (1982)); клетки MRC5; клетки FS4 и линия клеток гепатомы человека (Нер G2). Другие пригодные линии клеток-хозяев млекопитающих включают клетки яичника китайского хомяка (CHO), включая клетки DHFR⁻ CHO (Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)), и линии миеломных клеток, таких как NS0 и Sp2/0. Для обзора определенных линий клеток-хозяев млекопитающих, подходящих для продукции антитела, см., например, Yazaki and Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B. K. C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J., 2003), pp. 255-268.

[0229] Клетки-хозяева трансформируют описанными выше экспрессирующими или 10 клонирующими векторами для продукции антитела и культивирования в общепринятых питательных средах, модифицированных при необходимости для индукции промоторов, отбора трансформантов или амплификации генов, кодирующих желаемые последовательности.

(h) Культивирование клеток-хозяев

[0230] Клетки-хозяева, используемые для получения антитела по настоящему изобретению, можно культивировать в различных средах. Для культивирования клеток-хозяев подходящими являются коммерчески доступные среды, такие как Ham F10 (Sigma), минимальная питательная среда ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) и 15 модифицированная Дульбекко среда Игла ((DMEM), Sigma). Кроме того, в качестве среды для культивирования клеток-хозяев можно использовать любую из сред, описанных у Ham et al., Meth. Enz., 58:44 (1979), Barnes et al., Anal. Biochem., 102:255 (1980), в патентах США № 4767704; 4657866; 4927762; 4560655 или 5122469; WO 90/03430; WO 20 20 87/00195 или патенте США № 30985. Любую из этих сред можно дополнять по мере необходимости гормонами и/или другими факторами роста (такими как инсулин, трансферрин или эпидермальный фактор роста), солями (такими как хлорид натрия, кальция, магния и фосфат), буферами (такими как HEPES), нуклеотидами (такими как аденоzin и тимидин), антибиотиками (такими как лекарственное средство 25 GENTAMYCINTM), микроэлементами (определенными как неорганические соединения, как правило, содержащиеся в конечных концентрациях в микромолярном диапазоне) и глюкозой или эквивалентным источником энергии. Также можно вводить любые 30 другие необходимые добавки в соответствующих концентрациях, которые известны специалистам в данной области. Условия культивирования, такие как температура, pH и т.п., представляют собой условия, используемые ранее с клетками-хозяевами, отобранными для экспрессии, и, как правило, являются очевидными для специалиста 35 в данной области.

(xi) Очистка антитела

[0231] При применении рекомбинантных способов антитело может продуцироваться внутриклеточно в периплазматическом пространстве или непосредственно 40 секretироваться в среду. Если антитело продуцируется внутриклеточно, в качестве первого этапа удаляют дебрис из макрочастиц из клеток-хозяев или из лизированных фрагментов, например, центрифугированием или ультрацентрифугированием. Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992) описывают способ выделения антител, которые 45 секрециируются в периплазматическое пространство E.coli . В кратком изложении, клеточную массу размораживают в присутствии ацетата натрия (pH 3,5), EDTA и фенилметилсульфонилфторида (PMSF) в течение приблизительно 30 минут. Клеточный дебрис можно удалять центрифугированием. Когда антитело секрециируется в среду, супернатанты из таких экспрессирующих систем, как правило, сначала концентрируют с использованием коммерчески доступного фильтра для концентрирования белков, например, устройства для ультрафильтрации Amicon или Millipore Pellicon. На любом

из указанных выше этапов можно добавлять ингибитор протеаз, такой как PMSF, для ингибирования протеолиза, а также можно добавлять антибиотики для предотвращения роста случайных загрязнителей.

[0232] Композицию антител, получаемую из клеток, можно очищать с

использованием, например, хроматографии на гидроксиапатите, хроматографии на основе гидрофобных взаимодействий, электрофореза в геле, диализа и аффинной хроматографии, где аффинная хроматография, как правило, является одним из предпочтительных этапов очистки. Пригодность белка А в качестве аффинного лиганда зависит от вида и изотипа какого-либо домена Fc иммуноглобулина, который

присутствует в антителе. Белок А можно использовать для очистки антител, основанных на тяжелых цепях $\gamma 1$, $\gamma 2$ или $\gamma 4$ человека (Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983)). Белок G рекомендуют для всех изотипов мышей и для $\gamma 3$ человека (Guss et al., EMBO J. 5:1567-1575 (1986)). Матрица, к которой прикрепляют аффинный лиганд, чаще всего представляет собой агарозу, но также доступными являются другие матрицы.

Механически устойчивые матрицы, такие как стекло с контролируемым размером пор или полистиролдивинил)бензол, обеспечивают более высокие скорости потока и более короткое время обработки, чем те, которые можно получать с использованием агарозы. Когда антитело содержит домен С_H3, для очистки пригодной является смола Bakerbond ABX™ (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ). В зависимости от антитела, которое необходимо

выделять, также доступны другие способы очистки белков, такие как фракционирование на ионообменной колонке, осаждение этанолом, ВЭЖХ с обращенной фазой, хроматография на силикагеле, хроматография на SEPHAROSE™ с гепарином, хроматография на анионо- или катионообменной смоле (такой как колонка с полиаспарагиновой кислотой), хроматофокусирование, SDS-PAGE и осаждение сульфатом аммония.

[0233] В основном, различные способы получения антител для применения в исследовании, тестировании и клинике являются хорошо разработанными в данной области, в соответствии с описанными выше способами и/или по усмотрению специалиста в данной области для конкретного представляющего интерес антитела.

30 В. Отбор биологически активных антител

[0234] Антитела, получаемые, как описано выше, можно подвергать одному или более анализов "биологической активности" для отбора антитела с благоприятными свойствами с точки зрения терапевтической перспективы. Можно проводить скрининг антитела на его способность связываться с антигеном, против которого его индуцировали. Например, для антитела против VEGF антигенсвязывающие свойства антитела можно оценивать в анализе, в котором детектируют способность связываться с VEGF. В другом примере, для антитела против CD20 антигенсвязывающие свойства антитела можно оценивать в анализе, в котором детектируют способность связываться с CD20.

40 [0235] В другом варианте осуществления аффинность антитела можно определять, например, по насыщению связывания, ELISA и/или конкурентными анализами (например, RIA).

[0236] Также антитело можно подвергать другим анализам биологической активности, например, для оценки его эффективности в качестве терапевтического средства. Такие анализы известны в данной области и зависят от антигена-мишени и назначаемого применения антитела.

[0237] Для скрининга на антитела, которые связываются с конкретным эпитопом на представляющем интерес антигене (например, таких, которые блокируют связывание

илюстративного антитела против VEGF с VEGF), можно проводить общепринятый эпитоп-перекрестный конкурентный анализ, такой как анализ, описанный в Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988).

Альтернативно, для определения, связывается ли антитело с представляющим интерес 5 эпитопом, можно проводить картирование эпитопов, например, как описано у Champe et al., J. Biol. Chem., 270:1388-1394 (1995).

[0238] Термин "экспрессия антигена CD20" предназначен означать значительный уровень экспрессии антигена CD20 в клетке, предпочтительно на клеточной поверхности T- или В-клетки, более предпочтительно В-клетки из опухоли или злокачественной 10 опухоли, соответственно, предпочтительно несолидной опухоли. Пациентов со "злокачественной опухолью, экспрессирующей CD20" можно определять стандартными анализами, известными в данной области. Например, экспрессию антигена CD20 измеряют с использованием иммуногистохимической (ИХ) детекции, FACS или путем детекции на основе ПЦР соответствующей мРНК.

15 С. Получение составов

[0239] После получения представляющего интерес антитела (например, способы получения антител, которые можно формулировать, как описано в настоящем описании, разработаны ниже и известны в данной области), получают фармацевтический состав, содержащий его. В определенных вариантах осуществления антитела, которое 20 необходимо формулировать, не подвергают предварительной лиофилизации, и представляющий интерес состав в настоящем описании представляет собой водный состав. В определенных вариантах осуществления антитела представляет собой полноразмерное антитело. В одном из вариантов осуществления антитела в составе представляет собой фрагмент антитела, такой как F(ab')₂, в этом случае может возникать 25 необходимость решения проблем, которые не возникают в случае полноразмерного антитела (такие прикрепление антитела к Fab). Терапевтически эффективное количество антитела, содержащегося в составе, определяют, например, учитывая желаемые объемы дозы и способы(ы) введения. Иллюстративная концентрация антитела в составе 30 составляет приблизительно от 25 мг/мл приблизительно до 100 мг/мл или приблизительно от 30 мг/мл приблизительно до 100 мг/мл, или приблизительно от 45 мг/мл приблизительно до 55 мг/мл.

[0240] Получают водный состав, содержащий антитело в растворе с забуференным pH. pH буфера по настоящему изобретению находится в диапазоне приблизительно от 5,5 приблизительно до 7,0. В определенных вариантах осуществления pH находится в 35 диапазоне от pH 5,5 до 6,5, в диапазоне от pH 5,7 до 6,8, в диапазоне от pH 5,8 до 6,5, в диапазоне от pH 5,9 до 6,5, в диапазоне от pH 6,0 до 6,5 или в диапазоне от pH 6,2 до 6,5. В определенных вариантах осуществления pH состава составляет 6,2 или приблизительно 6,2. В определенных вариантах осуществления pH состава составляет 40 6,0 или приблизительно 6,0. Примеры буферов, которые регулируют pH в этом диапазоне включают фосфат натрия и гистидин (такой L-гистидин). В определенных вариантах осуществления буфер содержит фосфат натрия в концентрации приблизительно от 15 mM приблизительно до 35 mM. В определенных вариантах осуществления буфер содержит фосфат натрия в концентрации приблизительно от 20 mM приблизительно до 30 mM, приблизительно от 22 mM приблизительно до 28 mM, или приблизительно 45 25 mM. В одном из вариантов осуществления буфер представляет собой фосфат натрия в количестве приблизительно 25 mM, pH 6,2. В определенных вариантах осуществления буфер содержит гистидин в концентрации приблизительно от 15 mM приблизительно до 35 mM. В определенных вариантах осуществления буфер содержит гистидин в

концентрации приблизительно от 20 мМ приблизительно до 30 мМ, приблизительно от 22 мМ приблизительно до 28 мМ или приблизительно 25 мМ. В одном из вариантов осуществления буфер представляет собой гистидин в количестве приблизительно 20 мМ, pH 6,0.

⁵ [0241] Состав дополнительно содержит трегалозу в количестве приблизительно от 40 мМ приблизительно до 120 мМ. В некоторых вариантах осуществления трегалоза в составе составляет приблизительно от 40 мМ приблизительно до 100 мМ, приблизительно от 40 мМ приблизительно до 90 мМ, приблизительно от 40 мМ

¹⁰ приблизительно до 80 мМ, приблизительно от 50 мМ приблизительно до 70 мМ или приблизительно от 55 мМ приблизительно до 65 мМ. В некоторых вариантах осуществления трегалоза в составе составляет приблизительно 40 мМ, приблизительно 50 мМ, приблизительно 60 мМ, приблизительно 70 мМ, приблизительно 80 мМ, приблизительно 90 мМ, приблизительно 100 мМ, приблизительно 110 мМ или приблизительно 120 мМ.

¹⁵ [0242] В некоторых вариантах осуществления массовое отношение моноклонального антитела к трегалозе в составе составляет приблизительно от 1,65 приблизительно до 4,95. В некоторых вариантах осуществления массовое отношение моноклонального антитела к трегалозе в составе составляет приблизительно от 1,65 приблизительно до 3,30. В некоторых вариантах осуществления массовое отношение моноклонального

²⁰ антитела к трегалозе составляет приблизительно от 1,70 приблизительно до 2,91. В некоторых вариантах осуществления массовое отношение моноклонального антитела к трегалозе составляет приблизительно от 2,00 приблизительно до 3,30. В некоторых вариантах осуществления массовое отношение моноклонального антитела к трегалозе составляет приблизительно любую величину из 1,65, 1,70, 1,80, 1,90, 2,00, 2,08, 2,10, 2,20,

²⁵ 2,30, 2,31, 2,38, 2,40, 2,48, 2,50, 2,60, 2,70, 2,80, 2,90, 2,91, 3,00, 3,10, 3,20, 3,30, 3,40, 3,50, 3,70, 3,80, 3,90, 4,00, 4,10, 4,20, 4,30, 4,40, 4,50, 4,60, 4,70, 4,80, 4,90 и 4,95, включая каждое значение в диапазоне этих чисел. Как используют в настоящем описании, масса трегалозы в составе для вычисления массового отношения антитела к трегалозе основано на количестве дигидрата трегалозы (M_w 378,33). Если используют другие

³⁰ формы трегалозы (например, безводной трегалозы), массу трегалозы в составе следует пересчитывать на масса дигидрата трегалозы с аналогичной молярной концентрацией.

[0243] В состав антитела можно необязательно добавлять поверхностно-активное вещество. Иллюстративные поверхностно-активные вещества включают неионные поверхностно-активные вещества, такие как полисорбаты (например, полисорбаты 20, 35 80 и т.д.) или полоксамеры (например, полоксамер 188 и т.д.). Количество добавляемого поверхностно-активного вещества является таким, что снижает агрегацию формулируемого антитела и/или сводит к минимуму образование частиц в составе и/или снижает адсорбцию. Например, поверхностно-активное вещество может содержаться в составе в количестве приблизительно от 0,001% приблизительно до 0,5%,

⁴⁰ приблизительно от 0,005% приблизительно до 0,2%, приблизительно от 0,01% приблизительно до 0,1% или приблизительно от 0,02% приблизительно до 0,06%, или приблизительно от 0,03% приблизительно до 0,05%. В определенных вариантах осуществления поверхностно-активное вещество содержится в составе в количестве 0,04% или приблизительно 0,04%. В определенных вариантах осуществления

⁴⁵ поверхностно-активное вещество содержится в составе в количестве 0,02% или приблизительно 0,02%. В одном из вариантов осуществления состав не содержит поверхностно-активное вещество.

[0244] В одном из вариантов осуществления состав содержит определяемые выше

средства (например, антитело, буфер, трегалозу и/или поверхностно-активное вещество) и по существу не содержит один или более консервантов, таких как бензиловый спирт, фенол, мета-крезол, хлорбутанол и бензетоний Cl. В другом варианте осуществления в состав можно вводить консервант, в частности, когда состав представляет собой

5 многодозовый состав. Концентрация консерванта может находиться в диапазоне приблизительно от 0,1% приблизительно до 2%, предпочтительно приблизительно от 0,5% приблизительно до 1%. В состав можно вводить один или более других фармацевтически приемлемых носителей, экспириентов или стабилизаторов, таких как соединения, описанные в Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed.

10 (1980), при условии, что они не оказывают отрицательного воздействия на желаемые характеристики состава. Приемлемые носители, экспириенты или стабилизаторы являются нетоксичными для реципиентов в применяемых дозах и концентрациях и включают дополнительные буферные средства; вспомогательные растворители; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; хелатирующие средства,

15 так как EDTA; комплексные соединения с металлами (например, комплексы Zn-белок); биоразрушающие полимеры, такие как сложные полиэфиры, и/или солеобразующие противоионы. Иллюстративные фармацевтически приемлемые носители в настоящем описании дополнительно включают средства диспергирования лекарственных средств в интерстициальном пространстве, такие как растворимые нейтрально-активные

20 гликопротеины гиалуронидазы (sHASEGP), например, растворимые гликопротеины гиалуронидазы RH-20 человека, такие как rHuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.). Определенные иллюстративные sHASEGP и способы использования, включая rHuPH20, описаны в патентных публикациях США № 2005/0260186 и 2006/0104968. В одном из аспектов sHASEGP объединяют с одной или более дополнительными

25 гликозаминогликаназами, такими как хондроитиназы.

[0245] Несмотря на то, что различные описания хелаторов в настоящем описании, как правило, сводятся к EDTA, следует понимать, что в изобретение также предусматривают другие хелаторы ионов металлов. Хелаторы ионов металлов хорошо известны специалистам в данной области и включают, но не обязательно

30 ограничиваются ими, аминополикарбоксилаты, EDTA (этилендиаминтетрауксусную кислоту), EGTA (этиленгликоль-бис(бета-аминоэтиловый эфир)-N,N,N',N'-тетрауксусную кислоту), NTA (нитрилотриуксусную кислоту), EDDS (этилендиаминдисукцинат), PDTA (1,3-пропилендиаминтетрауксусную кислоту), DTPA (диэтilentriаминпентауксусную кислоту), ADA (бета-аланиндиуксусную кислоту), MGCA (метилглициндиуксусную кислоту) и т.д. Кроме того, некоторые варианты осуществления в настоящем описании содержат хелаторы фосфонатов/фосфоновой кислоты.

[0246] Состав в настоящем описании также может содержать более одного белка по мере необходимости для конкретного показания, в отношении которого проводят лечение, предпочтительно белки с комплементарными видами активности, которые не

40 оказывают отрицательного воздействия на другой белок. Например, в случае когда антитело представляет собой антитело против VEGF, его можно комбинировать с другим средством (например, химиотерапевтическим средством и противоопухолевым средством).

[0247] В некоторых вариантах осуществления оценивают или измеряют физическую

45 стабильность, химическую стабильность или биологическую активность антитела в составе. Для оценки стабильности и биологической активности можно использовать любые способы, известные в данной области. В некоторых вариантах осуществления антитело в составе является стабильным при -20°C в течение по меньшей мере

приблизительно 12 месяцев, по меньшей мере приблизительно 18 месяцев, по меньшей мере приблизительно 21 месяц или по меньшей мере приблизительно 24 месяца (или по меньшей мере приблизительно 52 недели). В некоторых вариантах осуществления стабильность измеряют по образованию высокомолекулярных соединений ($\text{HM}_{\text{W}}\text{S}$) в составе после хранения. В некоторых вариантах осуществления процент $\text{HM}_{\text{W}}\text{S}$ в составе составляет менее любой из величин приблизительно 0,8%, приблизительно 0,9% или приблизительно 1% после хранения при -20°C в течение по меньшей мере приблизительно 6 месяцев, по меньшей мере приблизительно 12 месяцев, по меньшей мере приблизительно 18 месяцев или по меньшей мере приблизительно 24 месяцев. В некоторых вариантах осуществления общее содержание агрегатов в составе составляет менее любой из величин приблизительно 2,5% или приблизительно 3% после хранения при -20°C в течение по меньшей мере приблизительно 6 месяцев, по меньшей мере приблизительно 12 месяцев, по меньшей мере приблизительно 18 месяцев или по меньшей мере приблизительно 24 месяцев.

[0248] Составы, используемые для введения *in vivo*, должны быть стерильными. Это легко получать фильтрованием через стерильные фильтрационные мембранны перед или после получения состава.

III. Введение составов антител

[0249] Состав вводят млекопитающему, нуждающемуся в лечении антителом, предпочтительно человеку в соответствии с известными способами, такими как внутривенное введение в виде болюсной или непрерывной инфузии в течение длительного периода времени, внутримышечным, внутрибрюшинным, интрацереброспинальным, подкожным, внутрисуставным, интрасиновиальным, интратекальным, пероральным, местным или ингаляционным путями. В одном из вариантов осуществления состав вводят млекопитающему посредством внутривенного введения. Для таких целей, состав можно инъектировать, например, с использованием шприца или через капельницу. В одном из вариантов осуществления состав вводят млекопитающему посредством подкожного введения.

[0250] Подходящая доза ("терапевтически эффективное количество") антитела зависит, например, от состояния, подлежащего лечению, тяжести и течения состояния, вводя ли антитело в профилактических или терапевтических целях, предшествующей терапии, истории болезни и реакции пациента на антитело, типа используемого антитела и решения лечащего врача. Антитело подходящим способом вводят пациенту один раз или в течение серии периодов лечения, и его можно вводить пациенту в любой момент времени после диагностики. Антитело можно вводить в виде одного типа лечения или в сочетании с другими лекарственными средствами или видами терапии, пригодными для лечения рассматриваемого состояния.

[0251] В качестве общего положения, терапевтически эффективное количество вводимого антитела находится в диапазоне приблизительно от 0,1 приблизительно до 50 мг/кг массы тела пациента независимо от одного или более введений, где характерный диапазон используемого антитела составляет приблизительно от 0,3 приблизительно до 20 мг/кг, предпочтительно приблизительно от 0,3 приблизительно до 15 мг/кг, например, при ежесуточном введении. Однако пригодными могут являться другие режимы дозирования. В одном из вариантов осуществления антагонист представляет собой антитело против VEGF, которое вводят в дозе приблизительно 100 или 400 мг каждые 1, 2, 3 или 4 недели или вводят в дозе приблизительно 1, 3, 5, 7,5, 10, 15 или 20 мг/кг каждые 1, 2, 3 или 4 недели. Дозу можно вводить в виде однократной дозы или в виде многократных доз (например, 2 или 3 дозы), таких как инфузии. Мониторинг

эффективности такой терапии легко проводить общепринятыми способами.

IV. Промышленные изделия

[0252] Другой вариант осуществления изобретения относится к промышленному изделию, содержащему контейнер, который содержит водный фармацевтический состав по изобретению, и необязательно содержит инструкции по его использованию.

Подходящие контейнеры включают, например, бутылки, флаконы и шприцы. Контейнер можно формировать из различных материалов, таких как стекло или пластик.

Иллюстративный контейнер представляет собой 3-20 см³ одноразовый стеклянный флакон. Альтернативно, для многодозовых составов контейнер может представлять собой 3-100 см³ стеклянный флакон. Контейнер содержит состав и этикетку на корпусе или вложенную, на контейнере могут быть указаны инструкции по использованию. Промышленное изделие может дополнительно содержать другие вещества, желательные с коммерческой точки зрения и с точки зрения потребителя, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы, шприцы и вкладыши в упаковку с инструкциями по использованию.

[0253] Полагают, что описание является достаточным для обеспечения практической реализации изобретения специалистом в данной области. Различные модификации изобретения в дополнение к продемонстрированным и описываемым в настоящем описании модификациям станут понятны специалистам в данной области из указанного выше описания и входят в объем прилагаемой формулы изобретения. Все публикации, патенты и патентные заявки, цитируемые в настоящем описании, таким образом, полностью включены посредством ссылки для всех целей.

ПРИМЕРЫ

[0254] Изобретение можно более полно понять посредством ссылки на следующие ниже примеры. Однако не следует их интерпретировать как ограничивающие объем изобретения. Следует понимать, что примеры и варианты осуществления, описываемые в настоящем описании, предоставлены исключительно с иллюстративными целями, и что различные модификации или изменения, учитывая их, будут понятны специалистам в данной области и входят в рамки сущности и область действия настоящего описания и объем прилагаемой формулы изобретения.

Пример 1: Разработка стабильных жидких составов бевацизумаба

[0255] Каждый из различных составов, содержащих бевацизумаб с концентрацией белков в диапазоне приблизительно 25 мг/мл - 100 мг/мл, фосфат натрия в концентрации 25 мМ или 51 мМ и трегалозу в концентрации в диапазоне приблизительно 40 мМ - 240 мМ, тестировали на образование высокомолекулярных соединений (HM_WS) при хранении в течение 24 месяцев при температуре -20°C или -40°C. Перед измерением HM_WS растворы состава подвергали неблагоприятному воздействию или не подвергали.

Условия с неблагоприятным воздействием заключались в том, что эти составы подвергали условиям ускоренной агрегации для кристаллизации трегалозы. Результаты демонстрировали, что состав A (называемый "F_A") бевацизумаба (25 мг/мл бевацизумаба, 51 мМ фосфата натрия, 159 мМ трегалозы, 0,04% PS20, pH 6,2) начинал образовывать агрегаты при хранении при -20°C, но не при -40°C (фиг. 1). Следует отметить, что снижение концентрации трегалозы при сохранении постоянной концентрации белка при 25 мг/мл приводило к увеличению образования агрегатов, когда состав хранили при -20°C (фиг. 1). Аналогичные результаты наблюдали, когда повышали концентрацию белка и сохраняли постоянной концентрацию фосфата натрия и трегалозы или снижали, как в случае состава бевацизумаба B (называемого "F_B"; 50 мг/мл бевацизумаба, 25 мМ

фосфата натрия, 60 мМ трегалозы, 0,04% PS20, pH 6,2) (фиг. 1; незаштрихованные кружки). Эти результаты демонстрируют, что составы бевацизумаба с более высокими концентрациями белка относительно концентраций трегалозы могут снижать уровни хвостового димера (TED) и растворимого агрегата.

[0256] Следует отметить, что состав F_B , по-видимому, находился в устойчивой области состава. Для обеспечения устойчивости при производстве состава F_B тестировали 10% диапазон различных переменных путем получения составов, содержащих бевацизумаб с концентрациями белков в диапазоне приблизительно 45 мг/мл - 55 мг/мл, фосфат натрия в концентрации в диапазоне приблизительно 22 мМ - 28 мМ и трегалозу в концентрации в диапазоне приблизительно 50 мМ - 70 мМ в конечном объеме 5 мл в 15 см³ флаконах (таблица 2). pH всех составов составлял 6,2 с 0,04% PS20. Каждый состав тестировали на образование $HM_W S$ при хранении в течение 12 месяцев при температуре -20°C. Перед изменением $HM_W S$ растворы состава подвергали неблагоприятному воздействию для создания условий ускоренной агрегации для кристаллизации трегалозы и сравнивали с растворами состава, которые не подвергали неблагоприятному воздействию. Для анализа образования агрегатов составов при хранении в течение 1, 2, 3, 6 и 12 месяцев при -20°C использовали эксклюзионную хроматографию (SEC). Результаты демонстрируют, что тестируемые растворы состава не образуют агрегаты при хранении при -20°C в течение 12 месяцев. Это демонстрировало, что состав F_B находился в устойчивой области состава, что эффективно снижало уровни TED и растворимых агрегатов (фиг. 2).

Таблица 2.
Составы для исследования устойчивости

Состав	Бевацизумаб (мг/мл)	Фосфат натрия (мМ)	Трегалоза (мМ)	Массовое отношение белок/трегалоза*
F_B	50	25	60	2,20
1	45	22	50	2,38
2	55	22	70	2,08
3	45	28	70	1,70
4	55	28	50	2,91

* Для получения состава использовали дигидрат трегалозы (M_W 378,33).

[0257] Проводили дополнительные анализы стабильности с составом F_A и составом F_B , а также альтернативным составом (F_C), содержащим 33 мг/мл бевацизумаба, 25 мМ фосфата натрия и 60 мМ трегалозы. pH всех составов составлял 6,2 с 0,04% PS20. Каждый состав тестировали на образование $HM_W S$ при хранении в течение 24 месяцев при температуре -20°C или -40°C. Перед измерением $HM_W S$ растворы состава подвергали неблагоприятному воздействию для создания условий ускоренной агрегации способом индукции агрегации (фиг. 3; заштрихованные треугольники) для кристаллизации трегалозы и сравнивали с растворами состава, которые не подвергали неблагоприятному воздействию (фиг. 3; заштрихованные квадратики). Растворы составов подвергали разведению способом SEC. После хранения в течение 1 месяца способ разведения SEC указывал на увеличение уровней агрегатов для состава F_A при неблагоприятном воздействии для ускорения агрегации (фиг. 3A). Для сравнения образование агрегатов в составе F_B замедлялось приблизительно до 12 месяцев при неблагоприятном воздействии. Кроме того, хранение при -40°C, по-видимому, предотвращало какое-либо увеличение общего образования агрегатов для всех тестируемых растворов (фиг. 3B).

SEC хроматографией демонстрировали повышенное содержание TED в составе F_A по сравнению с составом F_B после 24 месяцев хранения при -20°C (фиг. 4, стрелки).

Пример 2: Разработка стабильных жидких составов обинутузумаба

[0258] Каждый из различных составов, содержащих обинутузумаб с концентрацией белков в диапазоне приблизительно 35 мг/мл - 75 мг/мл, L-гистидин в концентрации 20 mM, полоксамер 188 в концентрации 0,02% (масс./об.), трегалозу в концентрации в диапазоне приблизительно 40 mM - 240 mM, и pH 6,0 тестировали на образование высокомолекулярных соединений (HM_WS) при хранении в течение до 52 недель при температуре -20°C или до 52 недель при -40°C. См. таблицу 3.

Таблица 3.
Составы обинутузумаба

Состав	Обинутузумаб (мг/мл)	Трегалоза (мМ)	L-Гистидин (мM)	Полоксамер 188% (масс./об.)	Массовое отношение белок/трегалоза*
F2	35	160	20	0,02	0,58
F3	35	120	20	0,02	0,77
F4	35	80	20	0,02	1,16
F5	35	40	20	0,02	2,31
F6	50	240	20	0,02	0,55
F7	50	120	20	0,02	1,10
F8	50	80	20	0,02	1,65
F9	50	40	20	0,02	3,30
F10	75	80	20	0,02	2,48
F11	75	40	20	0,02	4,95

*Для получения состава использовали дигидрат трегалозы (M_W 378,33).

[0259] Перед длительным хранением при -20°C и -40°C растворы состава подвергали неблагоприятному воздействию, подвергая замороженные составы ускоренным условиям кристаллизации трегалозы. В каждый момент времени анализа момент времени отбирали аликвоты из каждого состава при хранении, размораживали и подвергали анализу HM_WS эксклюзионной хроматографией. Результаты эксклюзионного анализа демонстрировали, что несколько составов обинутузумаба характеризовались повышением содержания HM_WS при хранении при -20°C, но не наблюдали агрегацию в течение длительного периода времени при -40°C (фигура 5А и 5В и фигура 6).

[0260] Снижение или даже предотвращение образования агрегатов на 52 неделе при -20°C получали, когда повышали концентрацию белка и снижали концентрацию трегалозы, как продемонстрировано составами обинутузумаба F2-F5 и F6- F11 (фигура 5А).

[0261] Повышение концентрации антитела приводит к снижению образования HM_WS, тогда как повышение концентрации трегалозы повышает образование HM_WS со временем. На фигуре 7 продемонстрировано, что эффект концентрации трегалозы на образование агрегатов при -20°C является наиболее значительным при низкой концентрации антитела, чем при высокой концентрации антитела. Вследствие того, что данные представлены в формате DoE (многофакторной модели) (2 фактора составов + время), можно использовать множественную линейную регрессию (MLR) для оценки эффекта на различные параметры. Анализом MLR получают регрессионную модель для высокомолекулярных соединений (HM_WS) с R² 0,968, демонстрирующую очень хорошую аппроксимацию модели и высокий Q² 0,957 в качестве величины хорошей

точности прогнозирования. Получаемый график коэффициентов (фигура 7А) отражает соответствующие коэффициенты регрессии аппроксимированной модели с доверительными интервалами, которые можно использовать для интерпретации влияния различных факторов. Статистически значимые коэффициенты (за исключением времени) 5 представляют собой факторы состава сMAb (концентрация обинутузумаба) и сTreh (концентрация трегалозы). Вследствие того, что коэффициент сTre является намного больше сMAb и коэффициент времени, концентрацию трегалозы можно рассматривать как наиболее важный фактор. Противоположная ориентация столбцов коэффициентов сMAb и сTreh демонстрирует, что повышение концентрации антитела приводит к 10 снижению образования HM_WS, тогда как повышение концентрации трегалозы повышает образование HM_WS со временем. Кроме того модель включает значительное взаимодействие двух факторов, обозначаемое сMAb*cTreh (фигура 7В), 15 демонстрирующее, что эффект концентрации трегалозы на образование агрегатов при -20°C является более существенным при низкой концентрации антитела, чем при высокой концентрации антитела. На фигуре 7С продемонстрирован график контура откликов, получаемый с факторами сMAb и сTreh по осям и временем, фиксированным на высоком уровне.

[0262] Эти результаты демонстрируют, что составы обинутузумаба с более высокой концентрацией белка относительно концентраций трегалозы характеризуются 20 сниженным риском образования растворимых агрегатов и хвостовых димеров (TED) при хранении состава при -20°C.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<210> 1

<211> 112

<212> Белок

<213> Mus sp.

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи 30 (VH) моноклонального антитела мыши B-Ly1 против CD20

<400> 1

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

<210> 2

<211> 103

<212> Белок

<213> Mus sp.

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи (VL) моноклонального антитела мыши B-Ly1 против CD20

<400> 2

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

<210> 3

<211> 119

<212> Белок

20 <213> Искусственная

<220>

<223> аминокислотные последовательности вариабельной области тяжелой цепи (VH) гуманизированного антитела B-Ly1 (B-HH2)

<400> 3

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

<210> 4

<211> 119

40 <212> Белок

<213> Искусственная

<220>

<223> аминокислотные последовательности вариабельной области тяжелой цепи (VH) гуманизированного антитела B-Ly1 (B-HH3)

45 <400> 4

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

<210> 5

<211> 119

<212> Белок

<213> Искусственная

<220>

<223> аминокислотные последовательности вариабельной области тяжелой цепи
20 (VH) гуманизированного антитела B-Ly1 (B-HH4)

<400> 5

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

<210> 6

<211> 119

<212> Белок

<213> Искусственная

<220>

<223> аминокислотные последовательности вариабельной области тяжелой цепи
40 (VH) гуманизированного антитела B-Ly1 (B-HH5)

<400> 6

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

<210> 7

<211> 119

<212> Белок

<213> Искусственная

<220>

<223> аминокислотные последовательности вариабельной области тяжелой цепи
 20 (VH) гуманизированного антитела B-Ly1 (B-HH6)

<400> 7

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

<210> 8

<211> 119

<212> Белок

<213> Искусственная

<220>

<223> аминокислотные последовательности вариабельной области тяжелой цепи
 40 (VH) гуманизированного антитела B-Ly1 (B-HH7)

<400> 8

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

<210> 9

<211> 119

<212> Белок

<213> Искусственная

<220>

<223> аминокислотные последовательности вариабельной области тяжелой цепи

20 (VH) гуманизированного антитела B-Ly1 (B-HH8)

<400> 9

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

<210> 10

<211> 119

<212> Белок

<213> Искусственная

<220>

40 <223> аминокислотные последовательности вариабельной области тяжелой цепи

(VH) гуманизированного антитела B-Ly1 (B-HH9)

<400> 10

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

<210> 11

15 <211> 119

<212> Белок

<213> Искусственная

<220>

20 <223> аминокислотные последовательности вариабельной области тяжелой цепи
 (VH) гуманизированного антитела B-Ly1 (B-HL8)

<400> 11

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

30 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 35 115

<210> 12

<211> 119

<212> Белок

<213> Искусственная

<220>

40 <223> аминокислотные последовательности вариабельной области тяжелой цепи
 (VH) гуманизированного антитела B-Ly1 (B-HL10)

<400> 12

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

<210> 13

<211> 119

<212> Белок

<213> Искусственная

<220>

<223> аминокислотные последовательности вариабельной области тяжелой цепи

20 (VH) гуманизированного антитела B-Ly1 (B-HL11)

<400> 13

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

<210> 14

<211> 119

<212> Белок

<213> Искусственная

40 <220>

<223> аминокислотные последовательности вариабельной области тяжелой цепи

(VH) гуманизированного антитела B-Ly1 (B-HL12)

<400> 14

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

<210> 15

15 <211> 119

<212> Белок

<213> Искусственная

<220>

<223> аминокислотные последовательности вариабельной области тяжелой цепи
 20 (VH) гуманизированного антитела B-Ly1 (B-HL13)

<400> 15

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

35 <210> 16

<211> 119

<212> Белок

<213> Искусственная

<220>

<223> аминокислотные последовательности вариабельной области тяжелой цепи
 40 (VH) гуманизированного антитела B-Ly1 (B-HL14)

<400> 16

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

<210> 17

15 <211> 119

<212> Белок

<213> Искусственная

<220>

<223> аминокислотные последовательности вариабельной области тяжелой цепи
 20 (VH) гуманизированного антитела B-Ly1 (B-HL15)

<400> 17

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

35 <210> 18

<211> 119

<212> Белок

<213> Искусственная

<220>

<223> аминокислотные последовательности вариабельной области тяжелой цепи
 40 (VH) гуманизированного антитела B-Ly1 (B-HL16)

<400> 18

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

<210> 19

<211> 119

<212> Белок

<213> Искусственная

<220>

<223> аминокислотные последовательности вариабельной области тяжелой цепи
 20 (VH) гуманизированного антитела B-Ly1 (B-HL17)

<400> 19

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

<210> 20

<211> 115

<212> Белок

<213> Искусственная

<220>

<223> аминокислотные последовательности вариабельной области легкой цепи (VL)
 40 гуманизированного антитела B-Ly1 B-KV1

<400> 20

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

15 (57) Формула изобретения

1. Стабильный водный фармацевтический состав, где состав содержит (а) моноклональное антитело в количестве от 45 мг/мл до 55 мг/мл; (б) трегалозу в количестве от 50 мМ до 70 мМ и (с) фосфат натрия в количестве от 22 мМ до 28 мМ, где pH указанного состава составляет от 5,9 до 6,5, где указанное антитело представляет собой бевацизумаб.
2. Состав по п.1, где указанное моноклональное антитело содержится в количестве 50 мг/мл.
3. Состав по п.1, где указанная трегалоза содержится в количестве 60 мМ.
4. Состав по п.1, где указанный фосфат натрия содержится в количестве 25 мМ.
- 25 5. Состав по п.1, где указанное моноклональное антитело содержится в количестве 50 мг/мл; указанная трегалоза содержится в количестве 60 мМ и указанный фосфат натрия содержится в количестве 25 мМ.
6. Состав по п.1, дополнительно содержащий поверхностно-активное вещество.
7. Состав по п.6, где указанное поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат или полоксамер.
- 30 8. Состав по п.7, где указанный полисорбат представляет собой полисорбат 20.
9. Состав по п.7, где указанный полоксамер представляет собой полоксамер 188.
10. Состав по п.6, где концентрация указанного поверхностно-активного вещества составляет от 0,01% до 0,1%.
- 35 11. Состав по п.6, где концентрация указанного поверхностно-активного вещества составляет от 0,01% до 0,05%.
12. Состав по п.6, где концентрация указанного поверхностно-активного вещества составляет 0,04%.
13. Состав по п.8, концентрация полисорбата 20 составляет 0,02%.
- 40 14. Состав по п.1, где pH указанного состава составляет 6,2 или 6,0.
15. Состав по п.1, где указанное моноклональное антитело не подвергают предварительной лиофилизации.
16. Состав по п.1, где состав является стабильным при -20°C в течение по меньшей мере 12 месяцев, по меньшей мере 18 месяцев или по меньшей мере 24 месяцев.
- 45 17. Состав по п.1, который является стерильным.
18. Состав по п.1, который вводят индивидууму.
19. Состав по п.1, который предназначен для внутривенного (в/в), подкожного (п/к) или внутримышечного (в/м) введения.

20. Состав по п.1, где указанный бевацизумаб содержится в количестве 50 мг/мл, указанная трегалоза содержится в количестве 60 мМ, указанный фосфат натрия содержится в количестве 25 мМ и где состав дополнительно содержит полисорбат 20 в количестве 0,04% и pH указанного состава составляет 6,2, где состав характеризуется уменьшенным образованием хвостовых димеров при хранении состава при -20°C в течение по меньшей мере 12 месяцев.

21. Состав по п.20, где образование хвостовых димеров при хранении уменьшено по сравнению с образованием хвостовых димеров в композиции, содержащей 50 мг/мл бевацизумаба, 25 мМ фосфата натрия, 60 мМ трегалозы, 0,04% полисорбата 20, pH 6,2, где композиция показывает уменьшенное образование хвостовых димеров при хранении в течение по меньшей мере 24 месяцев при -20°C.

22. Состав по п.20, где образование хвостовых димеров при хранении уменьшено по сравнению с образованием хвостовых димеров в композиции, содержащей 50 мг/мл бевацизумаба, 25 мМ фосфата натрия, 60 мМ трегалозы, 0,04% полисорбата 20, pH 6,2, где композиция показывает уменьшенное образование хвостовых димеров при хранении в течение по меньшей мере 12 месяцев при -40°C.

23. Состав по п.20, где образование хвостовых димеров при хранении уменьшено по сравнению с образованием хвостовых димеров в композиции, содержащей 50 мг/мл бевацизумаба, 25 мМ фосфата натрия, 60 мМ трегалозы, 0,04% полисорбата 20, pH 6,2, где композиция показывает уменьшенное образование хвостовых димеров при хранении в течение по меньшей мере 24 месяцев при -40°C.

24. Состав по п.20, где образование хвостовых димеров при хранении уменьшено по сравнению с образованием хвостовых димеров в композиции, содержащей 50 мг/мл бевацизумаба, 25 мМ фосфата натрия, 60 мМ трегалозы, 0,04% полисорбата 20, pH 6,2, где образование хвостовых димеров определяют методом эксклюзионной хроматографии.

25. Состав по п.24, метод эксклюзионной хроматографии представляет собой способ разведения методом эксклюзионной хроматографии.

26. Промышленное изделие, предназначенное для лечения злокачественной опухоли у индивидуума, содержащее контейнер, содержащий стабильный водный фармацевтический состав по любому из пп.1-25.

27. Промышленное изделие по п.26, где злокачественная опухоль выбрана из кишечногубого рака, рака легкого, рака молочной железы, злокачественной опухоли почки и глиобластомы.

28. Способ снижения агрегации терапевтического моноклонального антитела, включающий формулирование указанного антитела в составе, содержащем трегалозу в количестве от 50 мМ до 70 мМ и фосфат натрия в количестве от 22 мМ до 28 мМ, и pH указанного состава составляет от 5,9 до 6,5, где указанное моноклональное антитело формулируют в количестве от 45 мг/мл до 55 мг/мл в составе, где указанные антитело представляет собой бевацизумаб.

29. Способ по п.28, где указанный фосфат натрия содержится в количестве 25 мМ.

30. Способ по п.28, где указанное моноклональное антитело содержится в количестве 50 мг/мл.

31. Способ по п.28, где указанная трегалоза содержится в количестве 60 мМ.

32. Способ по п.28, где указанный состав дополнительно содержит поверхностно-активное вещество.

33. Способ по п.32, где указанное поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат или полоксамер.

34. Способ по п.33, где указанный полисорбат представляет собой полисорбат 20.

35. Способ по п.33, где указанный полоксамер представляет собой полоксамер 188.

36. Способ по п.32, где концентрация указанного поверхностно-активного вещества составляет от 0,01% до 0,1%.

⁵ 37. Способ по п.32, где концентрация указанного поверхностно-активного вещества составляет от 0,01% до 0,05%.

38. Способ по п.32, где концентрация указанного поверхностно-активного вещества составляет 0,04%.

39. Способ по п.28, где pH указанного состава составляет 6,2 или 6,0.

¹⁰ 40. Способ получения фармацевтического состава, включающий:

(a) получение состава по любому из пп.1-25 и

(b) оценку физической стабильности, химической стабильности или биологической активности антитела в составе.

¹⁵ 41. Способ лечения злокачественной опухоли у индивидуума, включающий введение состава по любому из пп.1-25 индивидууму в количестве, эффективном для лечения злокачественной опухоли.

42. Способ по п.41, где злокачественная опухоль выбрана из колоректального рака, рака легкого, рака молочной железы, злокачественной опухоли почки и глиобластомы.

20

25

30

35

40

45

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> GOKARN, YATIN
 ZARRAGA, ISIDRO
 ZARZAR, JONATHAN
 PATAPOFF, THOMAS
 WURTH, CHRISTINE

<120> ANTIBODY FORMULATIONS

<130> 146392012400

<140> Not Yet Assigned
 <141> Concurrently Herewith

<150> US 61/780,899
 <151> 2013-03-13

<160> 22

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
 <211> 112
 <212> Белок
 <213> Unknown

<220>

<223> аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH) моноклонального антитела мыши B-Lyl против CD20

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

<210> 2

<211> 103
 <212> Белок
 <213> Unknown

<220>

<223> аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи (VL) моноклонального антитела мыши B-Lyl против CD20

<400> 2
 Asn Pro Val Thr Leu Gly Thr Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
 1 5 10 15
 Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu
 20 25 30
 Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn

35	40	45
Leu Val Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr		
50	55	60
Asp Phe Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val		
65	70	75
Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly		80
85	90	95
Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg		
100		

<210> 3
<211> 119
<212> Белок
<213> Искусственная

<220>

<223> аминокислотные последовательности вариабельной области тяжелой цепи (VH) гуманизированного антитела B-Ly1 (B-HH2)

<400> 3		
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser		
1	5	10
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser		
20	25	30
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met		
35	40	45
Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe		
50	55	60
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr		
65	70	75
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		80
85	90	95
Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly		
100	105	110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
115		

<210> 4
<211> 119
<212> Белок
<213> Искусственная

<220>

<223> аминокислотные последовательности вариабельной области тяжелой цепи (VH) гуманизированного антитела B-Ly1 (B-HH3)

<400> 4		
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser		
1	5	10
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser		
20	25	30
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met		
35	40	45
Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe		
50	55	60
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr		
65	70	75
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Leu Cys		80
85	90	95
Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly		
100	105	110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
115		

<210> 5

<211> 119

<212> Белок

<213> Искусственная

<220>

<223> аминокислотные последовательности вариабельной области тяжелой цепи
(VH) гуманизированного антитела B-Ly1 (B-HH4)

<400> 5

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

<210> 6

<211> 119

<212> Белок

<213> Искусственная

<220>

<223> аминокислотные последовательности вариабельной области тяжелой цепи
(VH) гуманизированного антитела B-Ly1 (B-HH5)

<400> 6

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

<210> 7

<211> 119

<212> Белок

<213> Искусственная

<220>

<223> аминокислотные последовательности вариабельной области тяжелой цепи
(VH) гуманизированного антитела B-Ly1 (B-HH6)

<400> 7

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

<210> 8

<211> 119

<212> Белок

<213> Искусственная

<220>

<223> аминокислотные последовательности вариабельной области тяжелой цепи (VH) гуманизированного антитела B-Lyl (B-НН7)

<400> 8
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
 20 25 30
 Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 9

<211> 119

<212> Белок

<213> Искусственная

<220>

<223> аминокислотные последовательности вариабельной области тяжелой цепи (VH) гуманизированного антитела B-Lyl (B-НН8)

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

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 10
 <211> 119
 <212> Белок
 <213> Искусственная

<220>
 <223> аминокислотные последовательности вариабельной области тяжелой цепи (VH) гуманизированного антитела B-Ly1 (B-HN9)

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

<210> 11
 <211> 119
 <212> Белок
 <213> Искусственная

<220>
 <223> аминокислотные последовательности вариабельной области тяжелой цепи (VH) гуманизированного антитела B-Ly1 (B-HL8)

<400> 11
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Ser
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 12
 <211> 119
 <212> Белок

<213> Искусственная

<220>

<223> аминокислотные последовательности вариабельной области тяжелой цепи (VH) гуманизированного антитела B-Ly1 (B-HL10)

<400> 12

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

<210> 13

<211> 119

<212> Белок

<213> Искусственная

<220>

<223> аминокислотные последовательности вариабельной области тяжелой цепи (VH) гуманизированного антитела B-Ly1 (B-HL11)

<400> 13

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

<210> 14

<211> 119

<212> Белок

<213> Искусственная

<220>

<223> аминокислотные последовательности вариабельной области тяжелой цепи (VH) гуманизированного антитела B-Ly1 (B-HL12)

<400> 14

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

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

<210> 15

<211> 119

<212> Белок

<213> Искусственная

<220>

<223> аминокислотные последовательности вариабельной области тяжелой цепи (VH) гуманизированного антитела B-Ly1 (B-HL13)

<400> 15

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

<210> 16

<211> 119

<212> Белок

<213> Искусственная

<220>

<223> аминокислотные последовательности вариабельной области тяжелой цепи (VH) гуманизированного антитела B-Ly1 (B-HL14)

<400> 16

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

100	105	110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
115		
<210> 17		
<211> 119		
<212> Белок		
<213> Искусственная		
<220>		
<223> аминокислотные последовательности вариабельной области тяжелой цепи (VH) гуманизированного антитела B-Ly1 (B-HL15)		
<400> 17		
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Ser		
1	5	10
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Ser		
20	25	30
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met		
35	40	45
Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe		
50	55	60
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr		
65	70	75
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly		
100	105	110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
115		
<210> 18		
<211> 119		
<212> Белок		
<213> Искусственная		
<220>		
<223> аминокислотные последовательности вариабельной области тяжелой цепи (VH) гуманизированного антитела B-Ly1 (B-HL16)		
<400> 18		
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly		
1	5	10
Ser Leu Arg Val Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Ser		
20	25	30
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met		
35	40	45
Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe		
50	55	60
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr		
65	70	75
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly		
100	105	110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
115		
<210> 19		
<211> 119		
<212> Белок		
<213> Искусственная		
<220>		

<223> аминокислотные последовательности вариабельной области тяжелой цепи (VH) гуманизированного антитела B-Ly1 (B-HL17)

<400> 19
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Ser
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 20

<211> 115
 <212> Белок
 <213> Искусственная

<220>

<223> аминокислотные последовательности вариабельной области легкой цепи (VL) гуманизированного антитела B-Ly1 B-KV1

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

<210> 21

<211> 449
 <212> Белок
 <213> Искусственная

<220>

<223> аминокислотные последовательности вариабельной области тяжелой цепи гуманизированного антитела B-Ly1

<400> 21
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
 20 25 30
 Trp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

10

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445
 Lys

<210> 22
 <211> 219
 <212> Белок
 <213> Искусственная

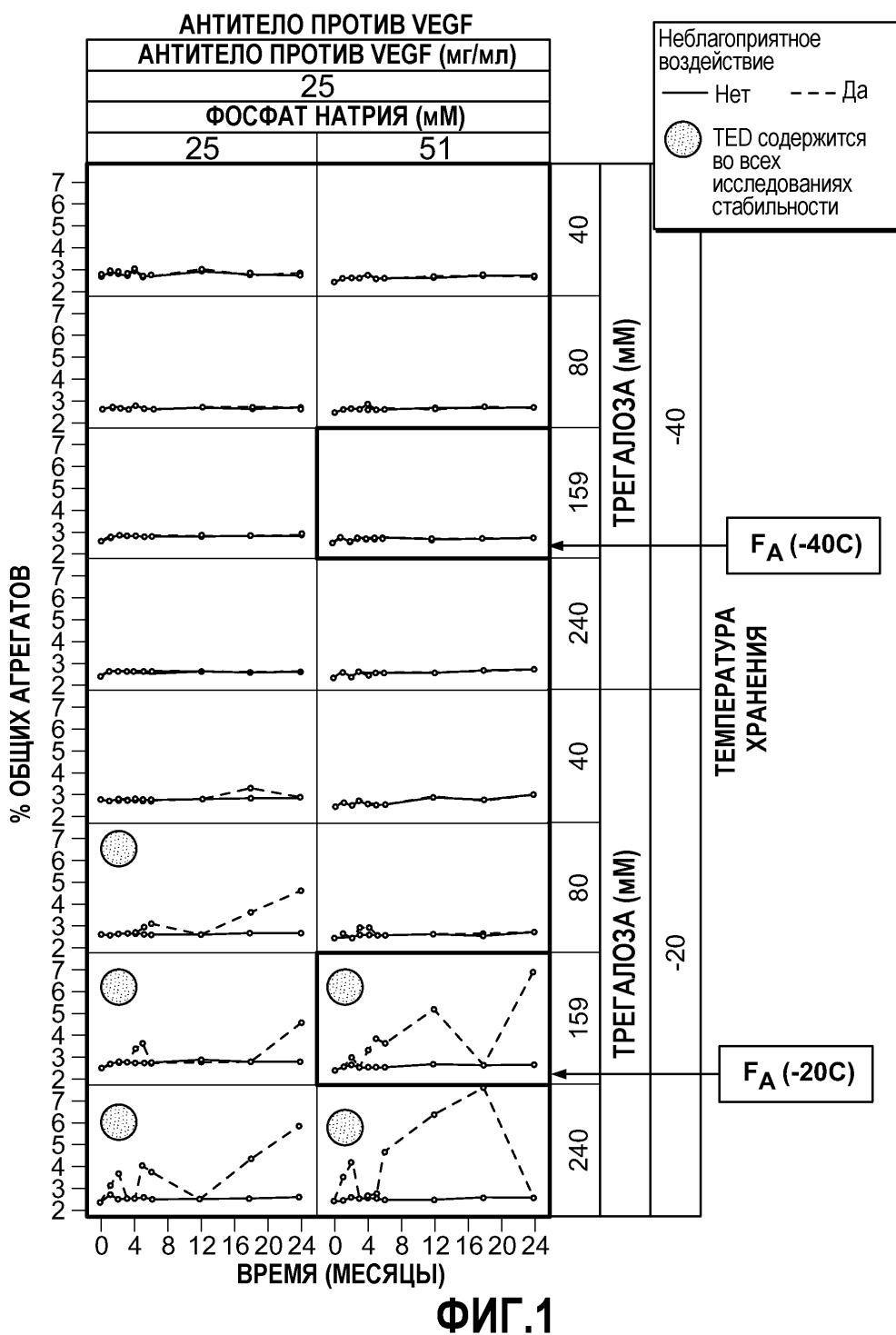
<220>
 <223> аминокислотные последовательности вариабельной области легкой цепи
 гуманизированного антитела B-Ly1

<400> 22
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly

11

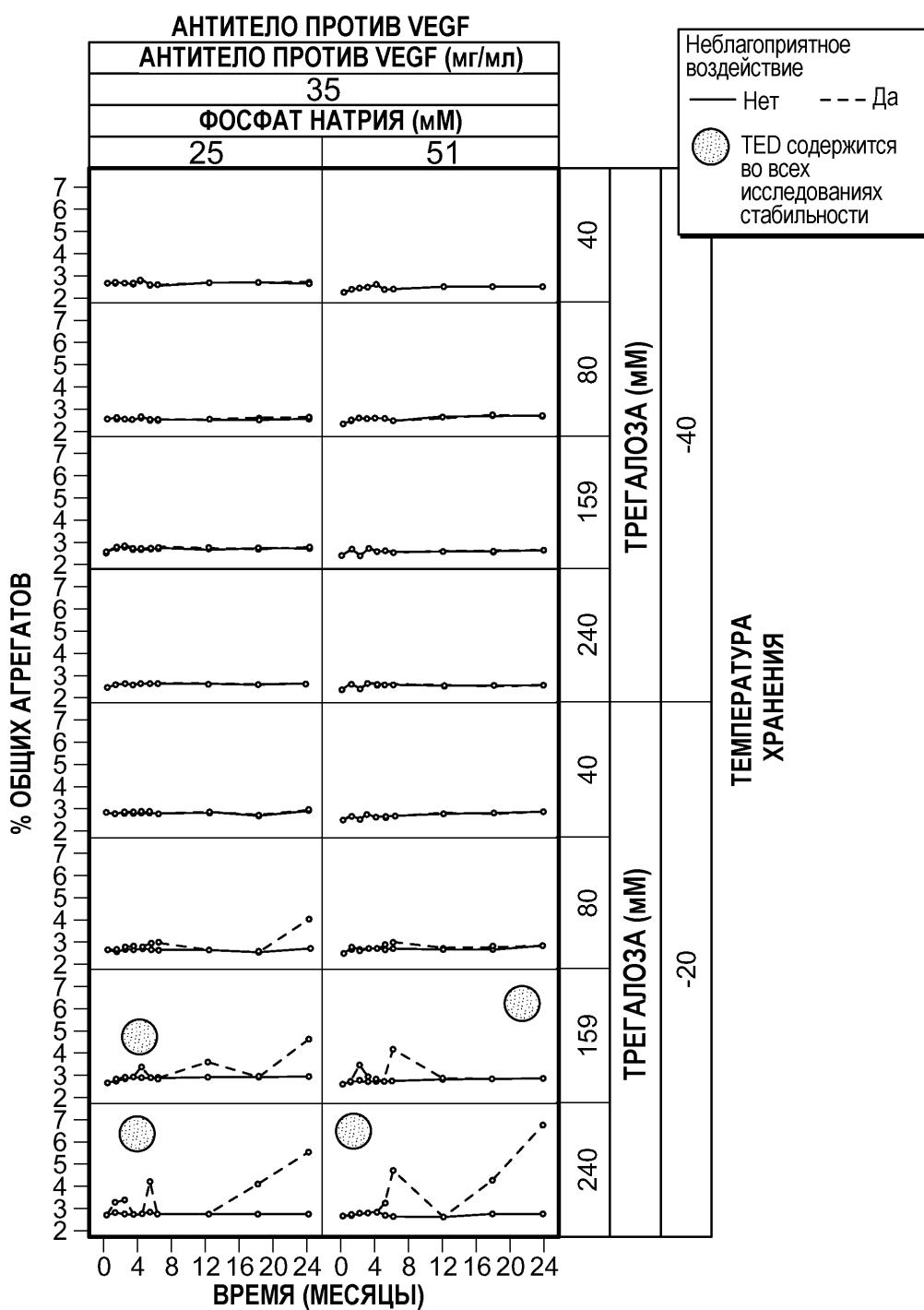
1	5	10	15												
Glu	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Lys	Ser	Leu	Leu	His	Ser
20	25	30													
Asn	Gly	Ile	Thr	Tyr	Leu	Tyr	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser
35	40	45													
Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Gln	Met	Ser	Asn	Leu	Val	Ser	Gly	Val	Pro
50	55	60													
Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser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

1/12



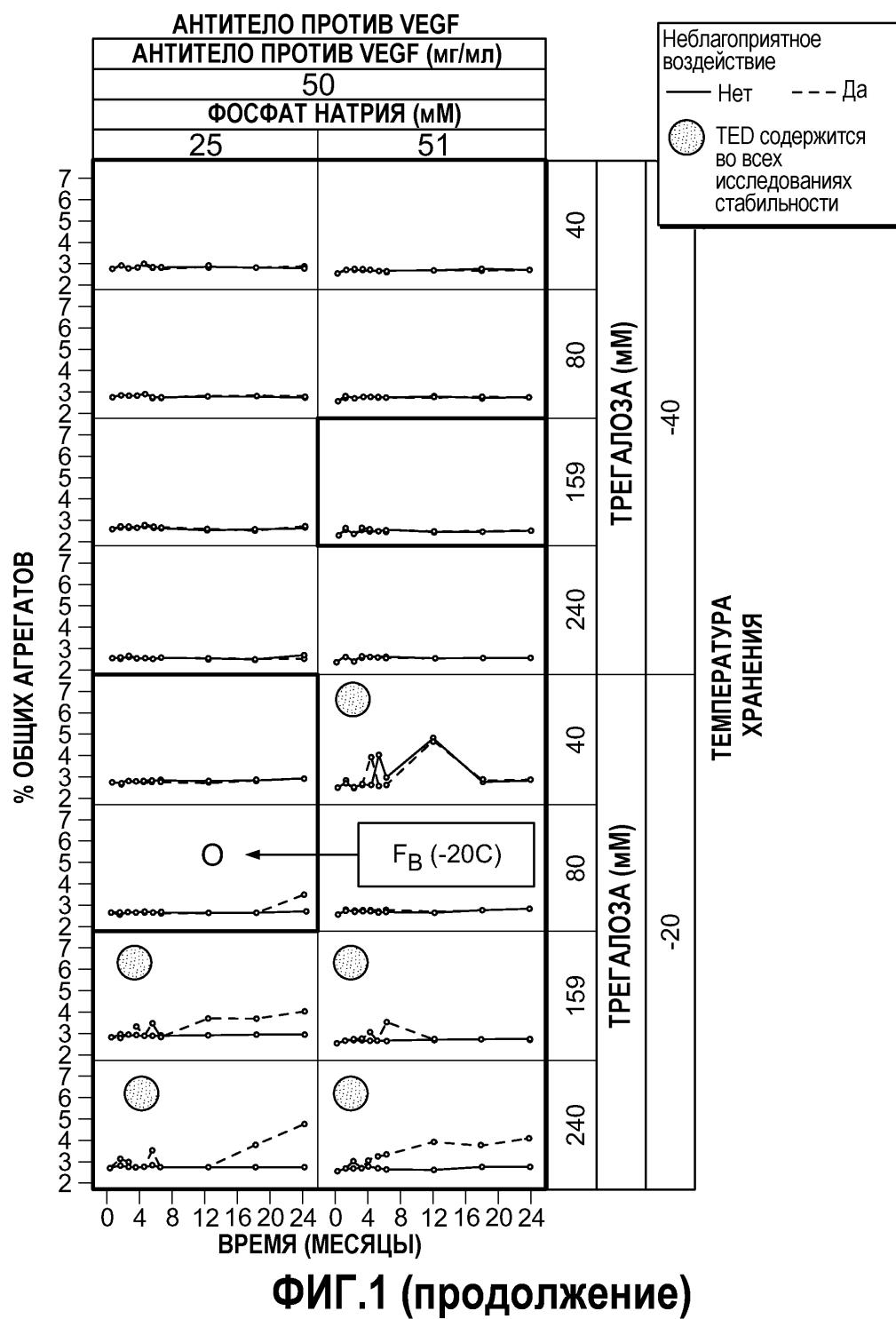
ФИГ.1

2/12

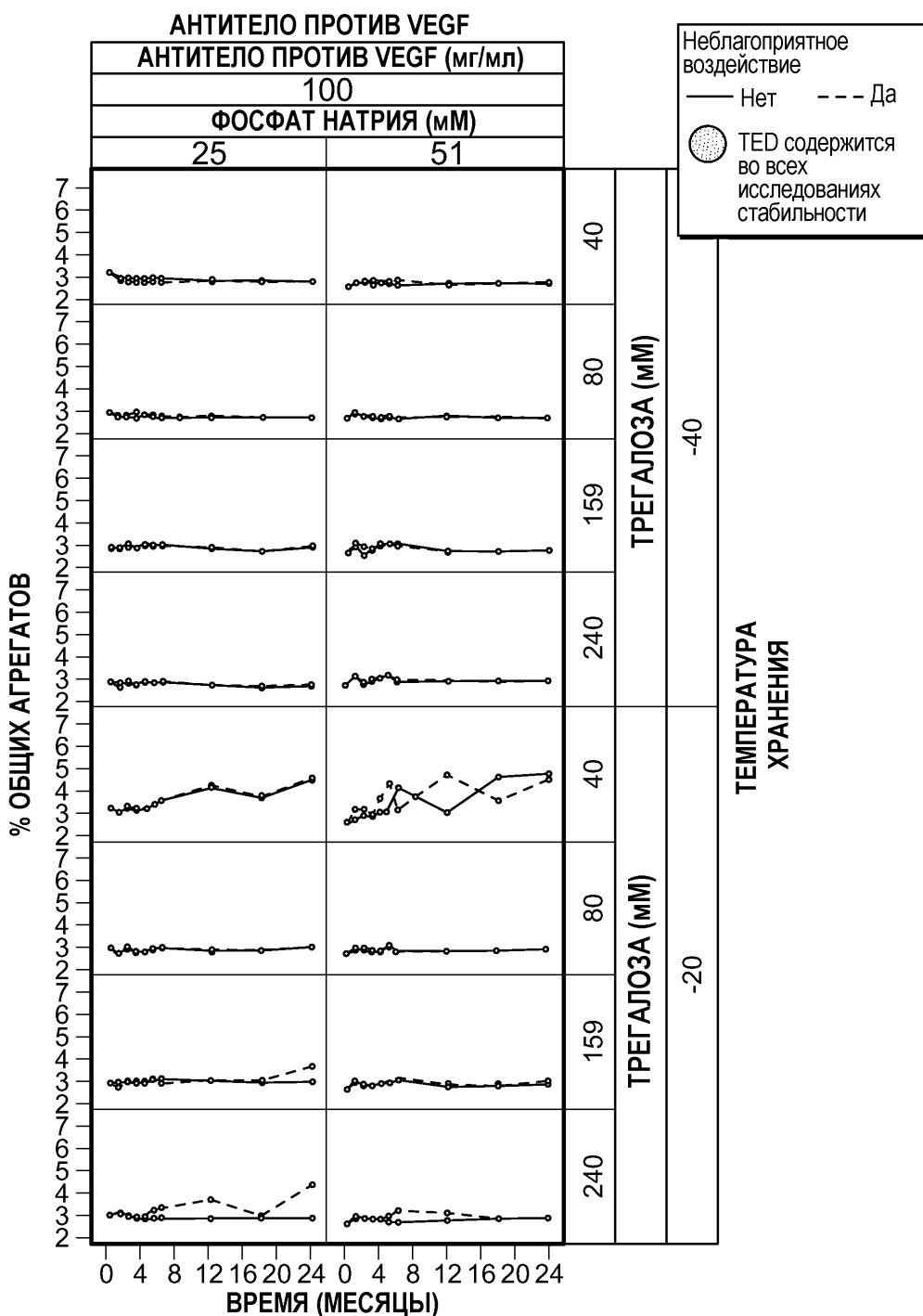


ФИГ.1 (продолжение)

3/12

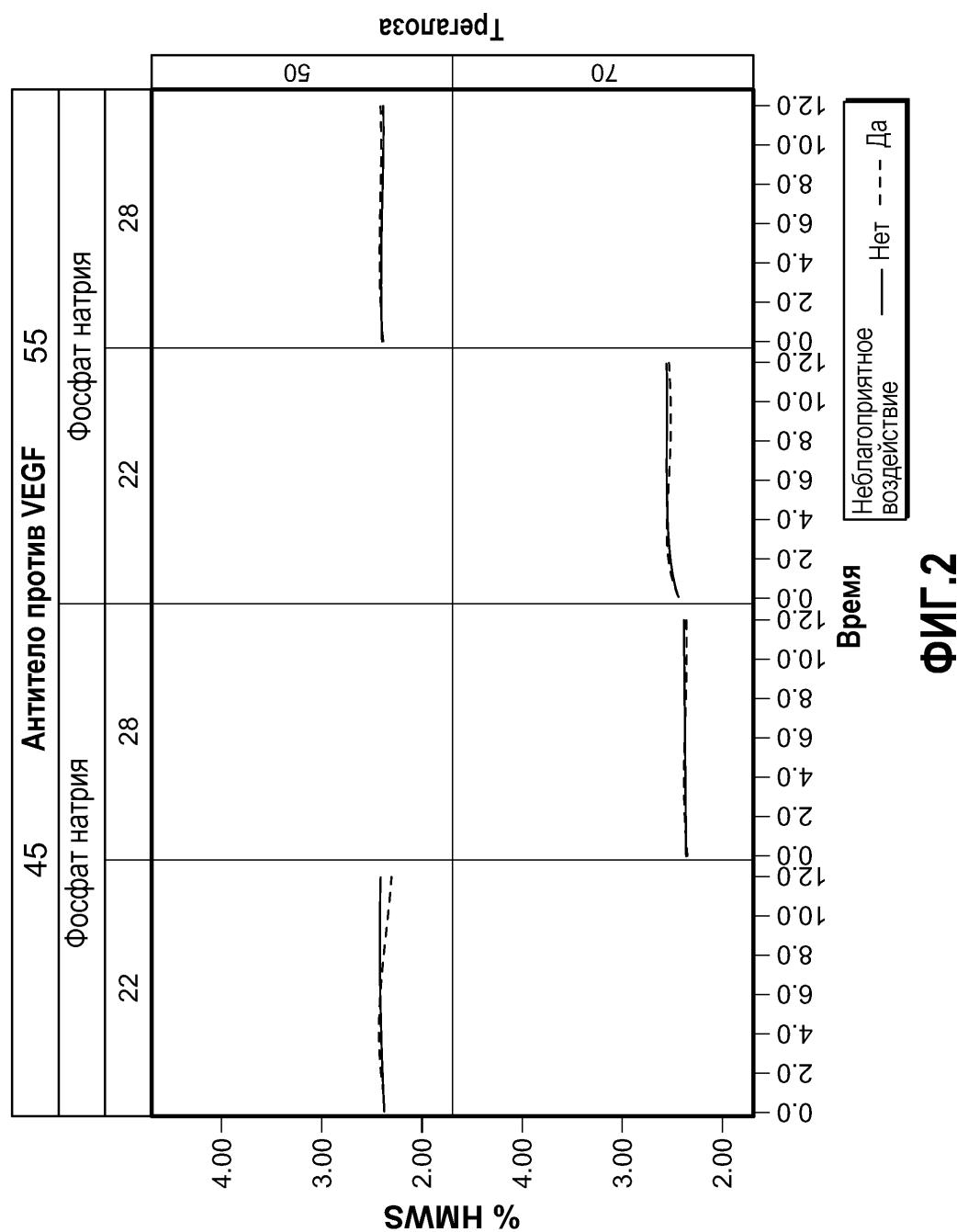


4/12

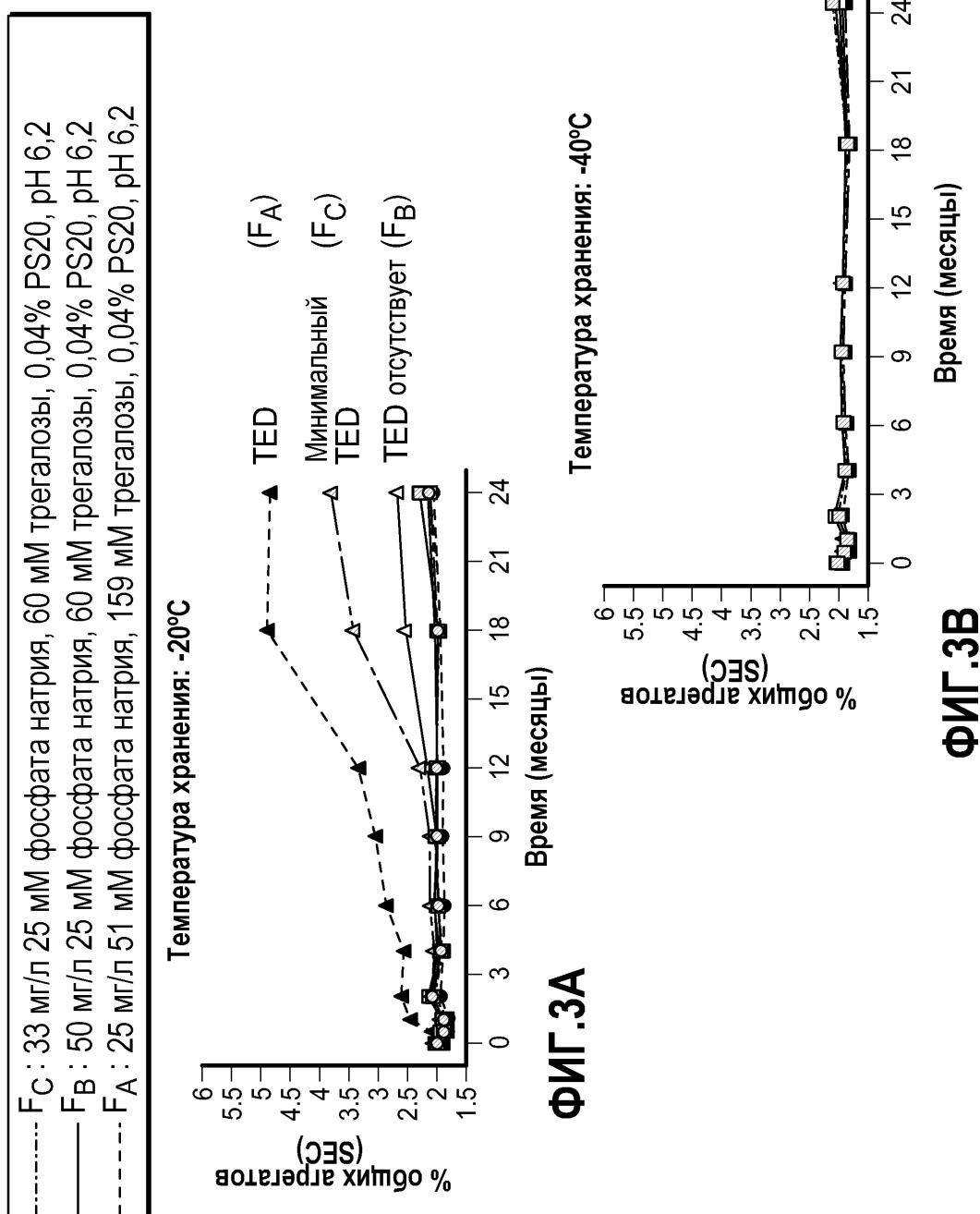


ФИГ.1 (продолжение)

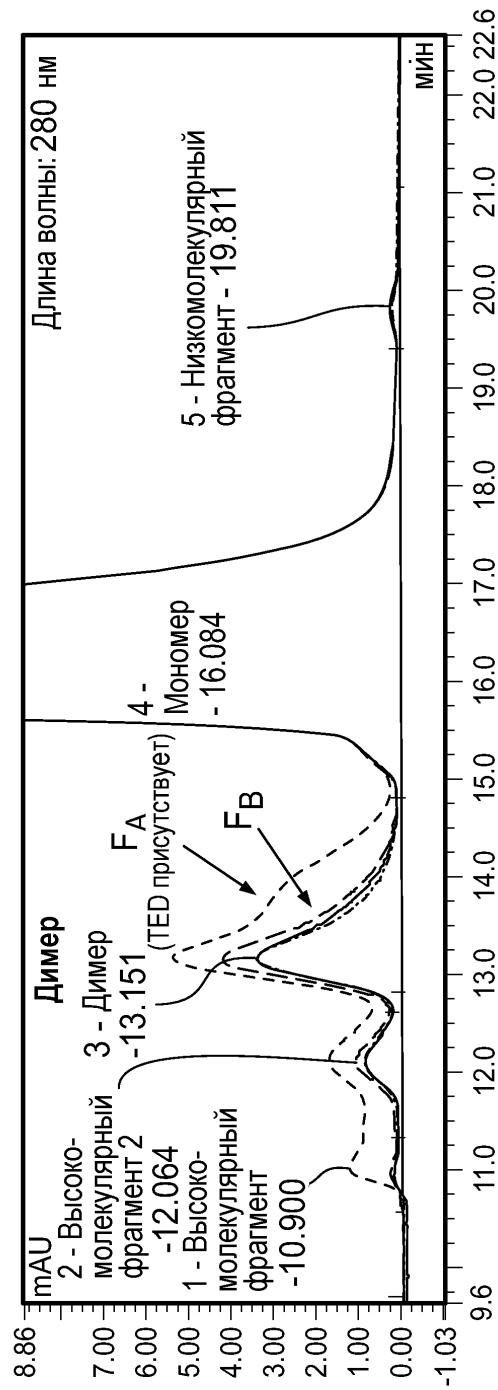
5/12



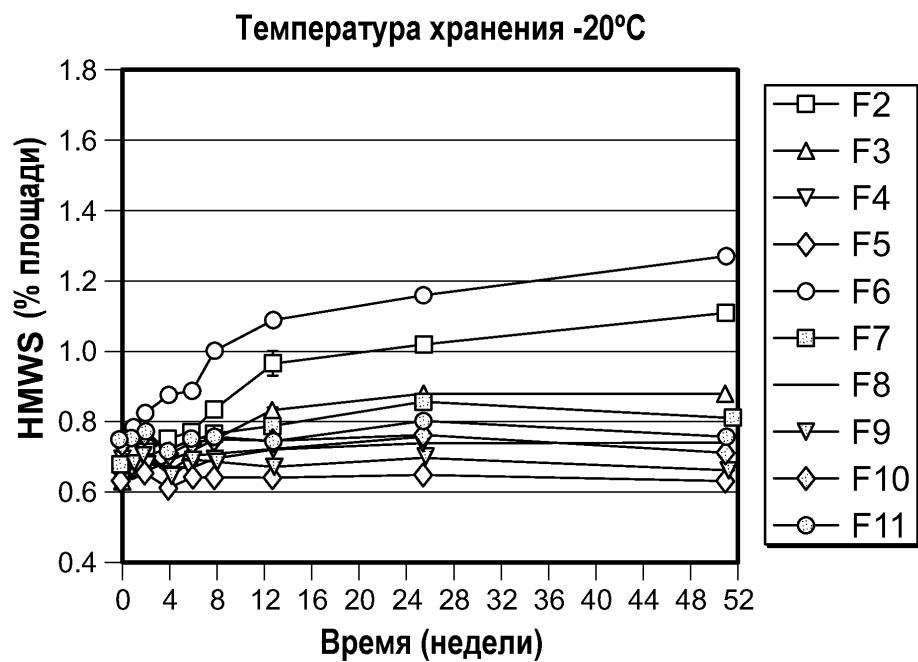
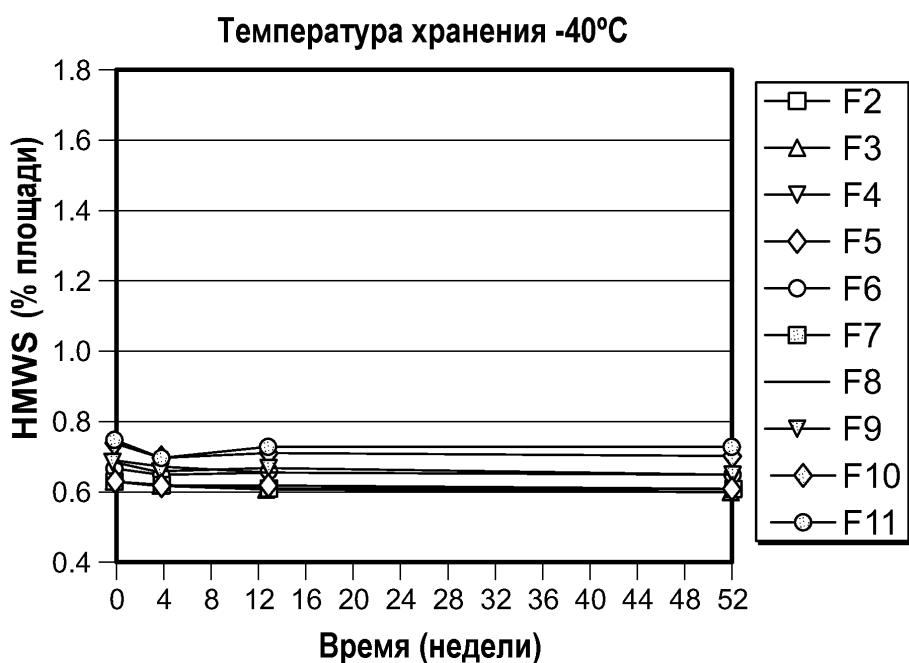
6/12



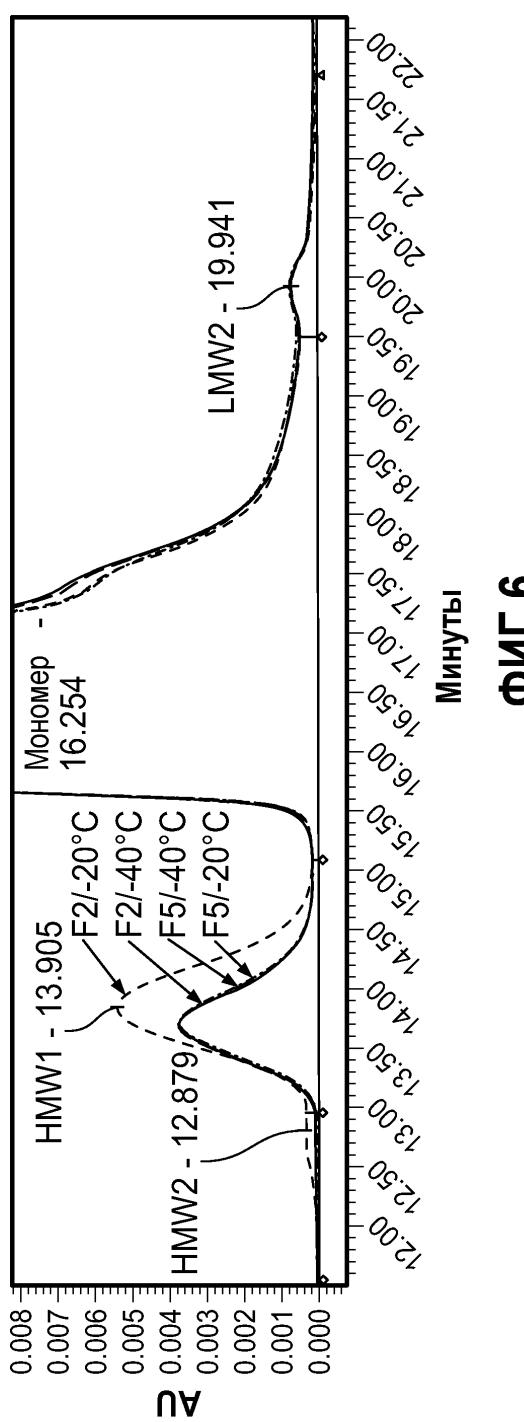
7/12

**ФИГ.4**

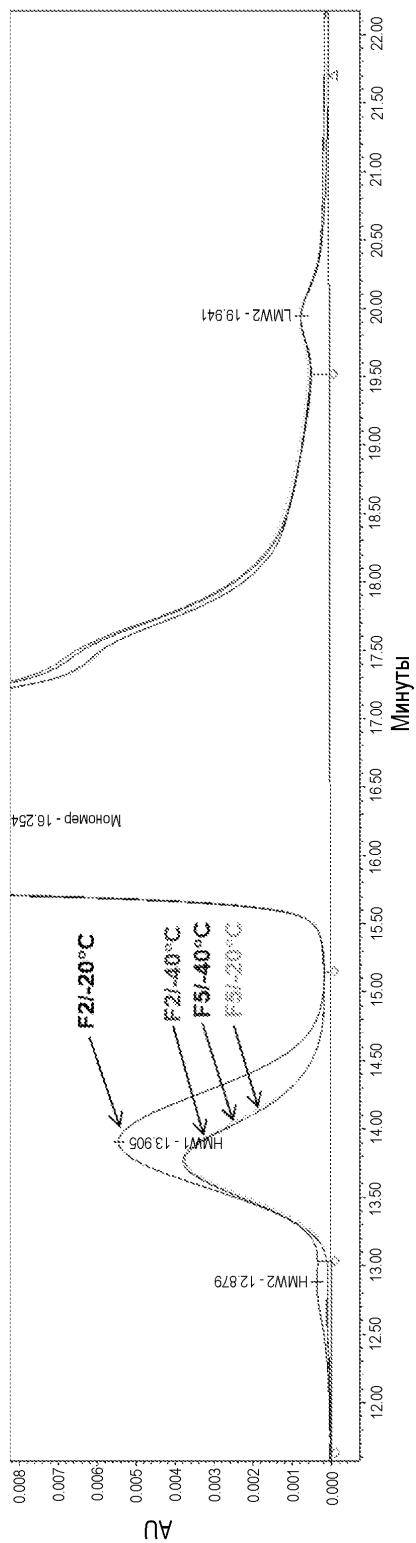
8/12

**ФИГ.5А****ФИГ.5В**

9/12

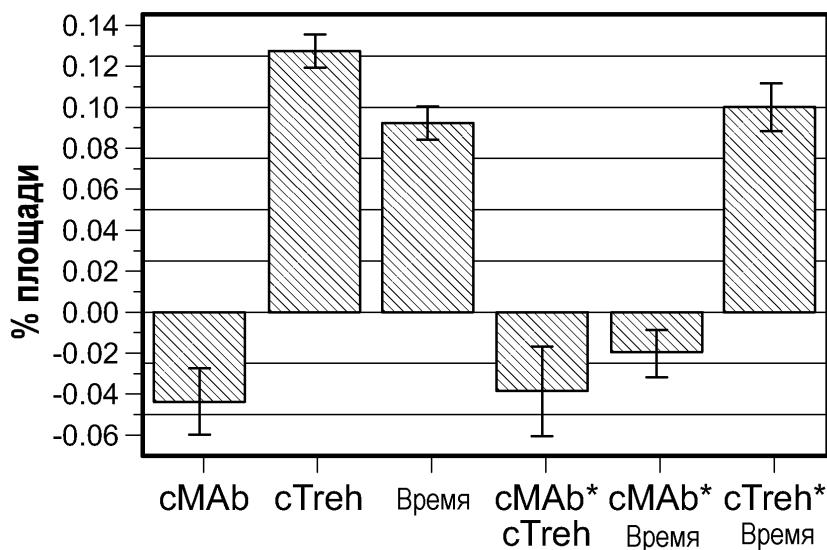


10/12

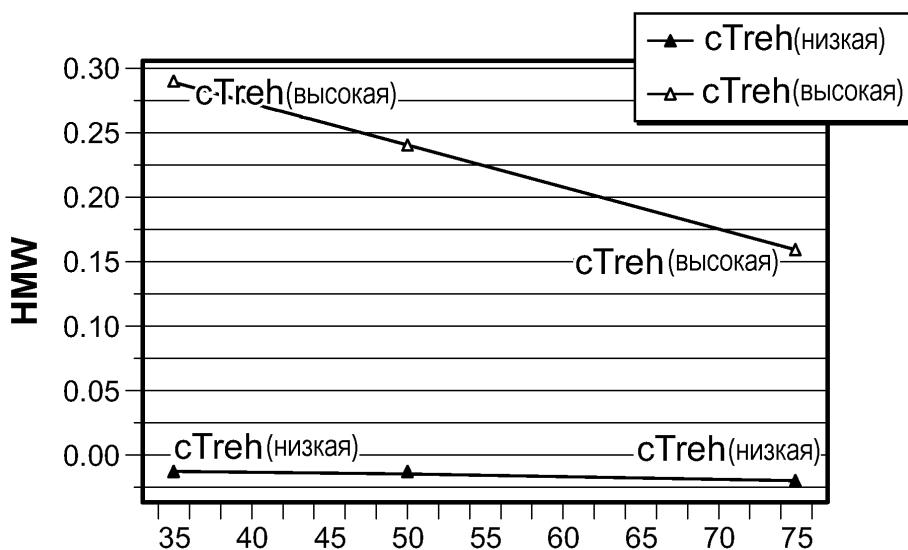


ФИГ. 6

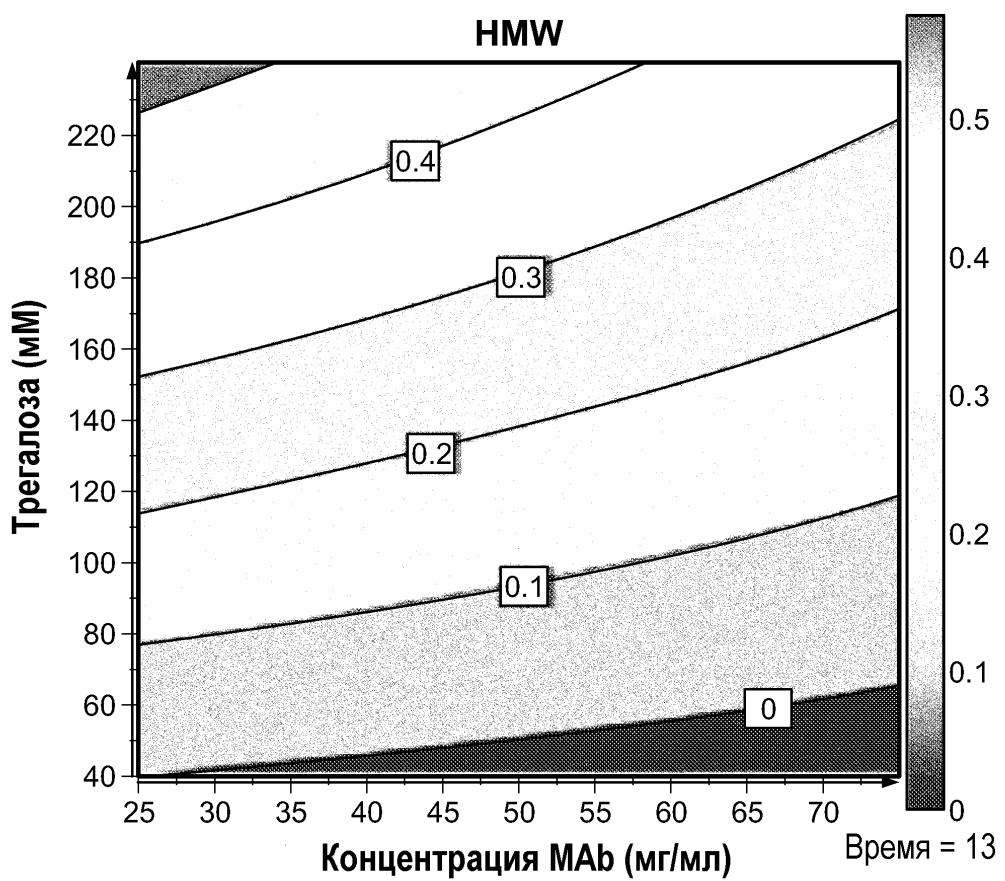
11/12



ФИГ.7А



ФИГ.7В

12/12**ФИГ.7С**