



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2011124550/15, 16.11.2009

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
16.11.2009

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
17.11.2008 US 61/115,441

(43) Дата публикации заявки: 27.12.2012 Бюл. № 36

(45) Опубликовано: 20.09.2015 Бюл. № 26

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: WO 2005/065717 A2, 21.07.2005. WO 2008/071394 A1, 19.06.2008. WO 2006/084264 A2, 10.08.2006. US 2004/0202658 A1, 14.10.2004. US 2007/0086995 A1, 19.04.2007. US 2006/0128654 A1, 15.07.2006

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 17.06.2011

(86) Заявка РСТ:  
US 2009/064610 (16.11.2009)(87) Публикация заявки РСТ:  
WO 2010/057107 (20.05.2010)

Адрес для переписки:

129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, строение 3,  
ООО "Юридическая фирма Городисский и  
Партнеры"

(72) Автор(ы):

ЛОБО Брайан (US),  
ЛО Сабрина (US),  
ВАНГ Ючанг Джон (US),  
ВОНГ Рита (US)

(73) Патентообладатель(и):

ДЖЕНЕНТЕК, ИНК. (US)

## (54) СПОСОБ И КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ УМЕНЬШЕНИЯ АГРЕГАЦИИ МАКРОМОЛЕКУЛ ПРИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к медицине и может быть использована для минимизации воспаления в месте инъекции в процессе подкожного введения анти-СБ20-антитела в концентрации, составляющей от 100 мг/мл до 200 мг/мл, предусматривающий добавление к композиции, содержащей указанную макромолекулу, от 2% до 30% циклодекстрина. Также предложена фармацевтическая композиция для подкожного введения, способ лечения CD-20-положительного В-клеточного рака, способ

лечения аутоиммунного заболевания, способ улучшения или поддержания растворимости или минимизирования преципитации анти-CD20-антитела в водных композициях для подкожного введения при их введении, способ увеличения биодоступности анти-CD20-антитела, предназначенного для подкожного введения. Группа изобретений позволяет снизить агрегацию, повысить биодоступность, свести к минимуму воспаление в месте подкожного введения антитела. 6 н. и 42 з.п. ф-лы, 7 ил., 9

R U 2 5 6 3 8 2 3 C 2

R U 2 5 6 3 8 2 3 C 2



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 563 823** (13) **C2**

(51) Int. Cl.

*A61K 47/40* (2006.01)

*A61K 39/395* (2006.01)

*A61P 35/00* (2006.01)

*A61P 37/00* (2006.01)

## (12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: **2011124550/15, 16.11.2009**

(24) Effective date for property rights:  
**16.11.2009**

Priority:

(30) Convention priority:  
**17.11.2008 US 61/115,441**

(43) Application published: **27.12.2012** Bull. № **36**

(45) Date of publication: **20.09.2015** Bull. № **26**

(85) Commencement of national phase: **17.06.2011**

(86) PCT application:  
**US 2009/064610 (16.11.2009)**

(87) PCT publication:  
**WO 2010/057107 (20.05.2010)**

Mail address:

**129090, Moskva, ul. B. Spasskaja, 25, stroenie 3,  
OOO "Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery"**

(72) Inventor(s):

**LOBO Brajan (US),  
LO Sabrina (US),  
VANG Juchang Dzhon (US),  
VONG Rita (US)**

(73) Proprietor(s):

**DZhENENTEK, INK. (US)**

## (54) METHOD AND COMPOSITION FOR REDUCTION OF MICROMOLECULE AGGREGATION UNDER PHYSIOLOGICAL CONDITIONS

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: group of inventions relates to medicine and can be used for the minimisation of an inflammation in the place of injection in the process of a subcutaneous injection of an anti-CD20 antibody in a concentration, constituting from 100 mg/ml to 200 mg/ml, including the addition of 2% to 30% of cyclodextrin to the composition, containing the said macromolecule. Also claimed are: a pharmaceutical composition for subcutaneous introduction, a method of treating positive B-cell cancer, a method of treating an autoimmune disease, a method of improving or

supporting solubility or minimisation of the precipitation of the anti-CD20-antibody in water compositions for subcutaneous introduction in the process of their introduction, a method of increasing the bioavailability of the anti-CD20-antibody, intended for subcutaneous introduction.

EFFECT: group of inventions makes it possible to reduce aggregation, increase bioavailability, minimise inflammation in the place of subcutaneous introduction of the antibody.

48 cl, 7 dwg, 9 tbl, 6 ex

## ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение связано со способом минимизации воспаления в месте инъекции, при подкожном введении макромолекул, путем уменьшения агрегации макромолекул при физиологических условиях.

## 5 ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

В последние два десятилетия технология рекомбинантной ДНК привела к существенному увеличению количества лекарственных средств, являющихся биологическими молекулами, в частности, белками. Увеличение количества лекарственных средств на основе биомолекул приводит к возникновению новых задач, связанных с технологией приготовления лекарственных препаратов. Высокие дозы белковых лекарственных препаратов, таких как антитела, могут быть доставлены пациенту путем внутривенной инфузии, однако такой путь доставки лекарственного средства является затруднительным, и обычно, если это возможно, предпочтительной является лекарственная форма препарата для подкожного введения. Однако объем раствора лекарственного средства для подкожной инъекции значительно меньше, чем для внутривенной инфузии, а следовательно, белок в ней должен присутствовать в большей концентрации. При высоких терапевтических концентрациях белка в десятки миллиграммов в миллилитре важно поддерживать такие терапевтические белки в стабильно растворенном состоянии в течение продолжительного времени. В растворах с высокой концентрацией белков повышается вероятность межбелковых взаимодействий, способствующих агрегации; предотвращение агрегации становится основной проблемой при приготовлении белковых композиций лекарственных средств. Агрегация приводит к целому ряду проблем, включая уменьшение биодоступности лекарственного белка, изменение фармакокинетики и нежелательную иммуногенность. (Frokjaer, S. and Otzen, D. E., Nat. Rev. Drug. Discov. 4: 298-306 (2005); Jiskoot, W. and Crommelin, D.J.A., EJHP Practice 12: 20-21 (2006)).

Предотвращение агрегации остается в основном эмпирической проблемой, поскольку нюансы процесса агрегации на молекулярном уровне остаются в основном неизвестными. Типичной стратегией является добавление стабилизаторов к белковому раствору. Общеизвестные стабилизаторы включают сахара, соли, свободные аминокислоты, такие как L-аргинин и L-глутамин (Golovanov, A.P. et al., J. Am. Chem. Soc. 126: 8933-8939 (2004)), полиолы (Singh, S. and Singh, J., AAPS Pharm. Sci. Tech 4: 1-9 (2003); Mishra, R. et al., J. Biol. Chem. 280: 15553-15560 (2005)), полиэтиленгликоли (ПЭГ) и другие полимеры, такие как полисорбаты или поллоксамеры, которые могут уменьшать межбелковых взаимодействия (Frokjaer and Otzen, выше; Lee, R. C. et al., Ann. Biomed. Eng. 34: 1190-1200 (2006); (Nema, S. et al., PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology 51: 166-171 (1997))).

Циклодекстрины (ЦД) являются циклическими олигосахаридами, имеющими d-глюкопиранозные звенья, соединенные альфа-(1,4)-гликозидными связями. ЦД получают из кукурузного крахмала или других видов крахмала под действием амилазы, циклодекстринтрансглюкозилазы. Наиболее часто встречающимися и образующимися природным путем циклодекстринами являются альфа-циклодекстрин, бета-циклодекстрин и гамма-циклодекстрин, состоящие, соответственно, из 6, 7 и 8 глюкопиранозных звеньев. Поскольку природные циклодекстрины, в частности, бета-циклодекстрин, имеют низкую растворимость в воде, синтезирован целый ряд их производных, имеющих улучшенную растворимость и другие физико-химические свойства. Коммерчески доступные производные ЦД включают в себя метилированные ЦД, 2-гидроксипропилированные ЦД, ацетилированные ЦД, разветвленные ЦД и

сульфобутил-циклодекстрины. Синонимы циклодекстрина включают кавитрон, циклический олигосахарид, циклоамулозу и циклоглюкан. (В качестве обзора, см. Loftsson, T., and Brewster, M. E., J. Pharm. Sci. 85: 101 (1996); Uekama, K. et al., Chem. Rev. 98: 2045-2076 (1998); Me, T. and Uekama, K., Advanced Drug Delivery Reviews 36: 101-123 (1999); и Szjetli, J., Pure Appl. Chem. 76: 1825-1845 (2004)). Циклодекстрины имеют молекулярную массу менее чем 25000 дальтон и, следовательно, могут быть удалены из общей системы кровообращения путем клубочковой фильтрации в почках, поэтому можно ожидать, что они не будут накапливаться в организме. Документально подтверждено отсутствие токсичности природных циклодекстринов, также как и количество фармацевтически приемлемых релевантных производных, таких как гидроксипропил-бета-ЦД и сульфобутил-бета-ЦД (Uekama et al., выше; Szjetli, выше).

Циклодекстрины принимают форму усеченного конуса, когда внутреннее окружение является гидрофобным, а внешнее - гидрофильным. Гидрофобная полость обеспечивается окружением, в которое могут быть включены неполярные соединения подходящего размера, с образованием комплексов. ЦД и их производные используются в качестве солюбилизаторов для лекарственных средств, плохо растворимых в воде.

Например, итраконазол (Sporanox<sup>(TM)</sup>) растворяют с помощью гидроксипропил-бета-ЦД, а зипразидона мезилат (Geodon<sup>(TM)</sup>) растворяют с помощью сульфобутилового эфира бета-циклодекстрина. Другие применения ЦД включают таковые для стабилизации лекарственных средств, для маскировки вкуса, их также используют в качестве адсорбента для эфирных масел. Доступные в настоящее время лекарственные продукты, которые содержат циклодекстрин, включают Sporanox<sup>(TM)</sup> (Janssen, Бельгия), проставазин<sup>(TM)</sup> (Ono, Япония; Schwarz, Германия), простандин-500<sup>(TM)</sup> (Ono, Япония), Geodon<sup>(TM)</sup> (Pfizer, США), VFEND<sup>(TM)</sup> (Pfizer, США), MitoExtra Mitozytrex<sup>(TM)</sup> (Novartis, Швейцария) и вольтарен<sup>(TM)</sup> (Novartis, Швейцария). См. также таблицу 1 в публикации Szjetli, выше. Все указанные композиции ограничены низкомолекулярными соединениями. Высокомолекулярные лекарственные средства, такие как пептиды и белки, также могут образовывать комплексы с циклодекстринами. Полагают, что улучшенная биодоступность пептидных лекарственных средств, образующих комплексы с ЦД, отчасти возникает вследствие ингибирующего эффекта ЦД в отношении клеточных выкачивающих насосов (Challa, R. et al., AAPS Pharm. Sci. Tech. 6: E329-357 (2005)).

Механизм стабилизации белков и пептидов также качественно отличается от такового в случае низкомолекулярных лекарственных средств. Несмотря на то, что ЦД могут образовывать комплексы включения с низкомолекулярными лекарственными средствами, ЦД обнаруживают способность связываться со специфическими обращенными в сторону растворителя аминокислотными остатками белка или пептида (Aachmann, F. L. et al., Protein Engineering 16: 905-912 (2003)). Максимально благотворный эффект обычно достигается при низких концентрациях циклодекстрина, и такой благотворный эффект зачастую лишь отчасти зависит от концентрации. Например, агрегация IL-2 оптимальным образом ингибируется 0,5% гидроксипропил-бета-циклодекстрином. (Loftsson и Brewster, выше). Растворимость гормона роста человека улучшается в присутствии приблизительно 2-6% ЦД, при этом обнаружено, что альфа- и гамма-ЦД в несколько раз менее эффективны, чем бета-циклодекстрины. (Otzen, D. E. et al., Protein Sci. 11: 1779-1787 (2002)).

Антиген CD20 (также называемый человеческим ограниченным В-лимфоцитами дифференцировочным антигеном, Вр35) является гидрофобным трансмембранным

белком с молекулярной массой приблизительно в 35 кДа, локализованным на пре-В- и зрелых В-лимфоцитах (Valentine et al., J. Biol. Chem. 264(19): 11282-11287 (1989); и Einfeld et al., EMBO J. 7(3): 711-717 (1988)). Указанный антиген экспрессируется также на более чем 90% В-клеточных неходжкинских лимфом (НХЛ) (Anderson et al., Blood 63(6): 1424-1433 (1984)), однако не обнаруживается на гематопозитических стволовых клетках, про-В-клетках, нормальных плазматических клетках или других нормальных тканях (Tedder et al., J. Immunol. 135(2): 973-979 (1985)). Считается, что CD20 регулирует раннюю стадию (стадии) в процессе активации инициации и дифференцировки клеточного цикла (Tedder et al., выше) и, возможно, функционирует в качестве канала иона кальция (Tedder et al., J. Cell. Biochem. 14D: 195 (1990)).

Если рассматривать экспрессию CD20 в В-клеточных лимфомах, данный антиген является полезной терапевтической мишенью для лечения таких лимфом. Например, антитело ритуксимаб (RITUXAN®, MABTHERA®), которое является созданным генно-инженерным путем химерным мышино-человеческим моноклональным антителом, направленным на человеческий антиген CD20 (коммерчески доступный в компаниях Genentech, Inc., к югу от Сан-Франциско, Калифорния, США, и F. Hoffmann-La Roche AG, Базель, Швейцария), используется для лечения пациентов с рецидивирующей или стойкой высокодифференцированной или фолликулярной, CD20-положительной В-клеточной неходжкинской лимфомой. Ритуксимаб является антителом, обозначаемым "C2B8" в патенте США № 5736137, опубликованном 7 апреля 1998 г. (Anderson et al.), и в патенте США № 5776456. Другие анти-CD20-антитела, предписанные для лечения НХЛ, включают мышинное антитело Zevalin<sup>(TM)</sup>, которое соединено с радиоактивным изотопом иттрием-90 (IDEC Pharmaceuticals, San Diego, CA), и Веххар<sup>(TM)</sup>, которое является еще одним полностью мышинным антителом, конъюгированным с <sup>131</sup>I (Corixa, WA).

CD20 является также полезным антигеном-мишенью для лечения аутоиммунных заболеваний. Действие ритуксимаба изучали также и при различных незлокачественных аутоиммунных заболеваниях, при которых В-клетки и аутоантитела, вероятно, играют роль в патофизиологии заболевания - см., например, Edwards et al., Biochem Soc. Trans. 30: 824-828 (2002). Сообщалось о том, что ритуксимаб потенциально способен смягчать признаки и симптомы, например, ревматоидного артрита (РА) (Leandro et al., Ann. Rheum. Dis. 61: 883-888 (2002); Edwards et al., Arthritis Rheum., 46 (Suppl. 9): S46 (2002); Stahl et al., Ann. Rheum. Dis., 62 (Suppl. 1): OP004 (2003); Emery et al., Arthritis Rheum. 48 (9): S439 (2003)), волчанки (Eisenberg, Arthritis. Res. Ther. 5: 157-159 (2003); Leandro et al. Arthritis Rheum. 46: 2673-2677 (2002); Gorman et al., Lupus, 13: 312-316 (2004)), иммунной тромбоцитопенической пурпуры (D'Arena et al., Leuk. Lymphoma 44: 561-562 (2003); Stasi et al., Blood, 98: 952-957 (2001); Saleh et al., Semin. Oncol, 27 (Suppl 12): 99-103 (2000); Zaia et al., Haematologica, 87: 189-195 (2002); Ratanatharathorn et al., Ann. Int. Med., 133: 275-279 (2000)), истинной эритроцитарной аплазии (Auner et al., Br. J. Haematol, 116: 725-728 (2002)); аутоиммунной анемии (Zaja et al., Haematologica 87: 189-195 (2002) (обнаружена ошибка: Haematologica 87: 336 (2002)), синдрома холодовой агглютинации (Layios et al., Leukemia, 15: 187-8 (2001); Berentsen et al., Blood, 103: 2925-2928 (2004); Berentsen et al., Br. J. Haematol, 115: 79-83 (2001); Bauduer, Br. J. Haematol, 112: 1083-1090 (2001); Damiani et al., Br. J. Haematol, 114: 229-234 (2001)), синдрома В-типа тяжелой резистентности к инсулину (Coll et al., N. Engl. J. Med., 350: 310-311 (2004), криоглобулинемии смешанного типа (DeVita et al., Arthritis Rheum. 46 Suppl. 9: S206/S469 (2002)), миастении гравис (Zaja et al., Neurology, 55: 1062-63 (2000); Wylam et al., J. Pediatr., 143: 674-677 (2003)), гранулематоза Вегенера (Specks et al., Arthritis & Rheumatism 44: 2836-2840 (2001)),

рефрактерной обыкновенной пузырчатки (Dupuy et al., Arch Dermatol, 140: 91-96 (2004)), дерматомиозита (Levine, Arthritis Rheum., 46 (Suppl. 9): S1299 (2002)), синдрома Шегрена (Somer et al., Arthritis & Rheumatism, 49: 394-398 (2003)), активной типа-II криоглобулинемии смешанного типа (Zaja et al., Blood, 101: 3827-3834 (2003)),  
 5 обыкновенной пузырчатки (Dupay et al., Arch. Dermatol, 140: 91-95 (2004)), аутоиммунной нейропатии (Pestronk et al., J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 74: 485-489 (2003)), паранеопластического опсоклонус-миоклонус-синдрома (Pranzatelli et al. Neurology 60 (Suppl.1) PO5.128: A395 (2003)) и возвратно-ремиттирующего рассеянного склероза (RRMS). Cross et al. (abstract) "Preliminary results from a phase II trial of Rituximab in MS"  
 10 Eighth Annual Meeting of the Americas Committees for Research and Treatment in Multiple Sclerosis, 20-21 (2003).

В настоящем изобретении предложены способы и композиции для предотвращения агрегации макромолекул, таких как антитела, в физиологических условиях. Способы согласно изобретению обеспечивают преимущества в изготовлении композиций  
 15 терапевтических белков, таких как анти-CD20-антитела, описанные в настоящей заявке. Указанные преимущества включают возможность изготавливать композиции для подкожной инъекции, которая будет обладать повышенной биодоступностью терапевтического антитела и характеризоваться уменьшением воспаления в месте инъекции, а также дополнительными преимуществами, которые станут очевидными из  
 20 нижеследующего подробного описания.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Циклодекстрины используются биохимиками в качестве солюбилизаторов для плохо растворимых в воде лекарственных средств. Открытие авторами данного изобретения того, что различные типы циклодекстринов (например, сульфобутилэфир,  
 25 гамма-гидроксипропил, бета-гидроксипропил) ингибируют агрегацию и флокуляцию белка, в частности, антител, является неожиданным, поскольку антитела являются высоко растворимыми в воде. Следовательно, открытие того, что циклодекстрины ингибируют агрегацию и флокуляцию антител в высоких концентрациях, является не чем иным как новым применением циклодекстрина. Авторы изобретения разработали  
 30 также новый способ скрининга *in vitro*, который включает применение диализных трубок, отсекающих определенную молекулярную массу (М.м.), и адаптированные высвобождающиеся среды, при этом то, и другое имитирует физиологические условия на участке (в месте) инъекции.

В настоящем изобретении предложен способ уменьшения агрегации и ингибирования  
 35 флокуляции макромолекулы, такой как белок, при физиологических условиях, путем добавления от 2% до 30% циклодекстринов (ЦД), где указанный циклодекстрин выбран из группы, состоящей из бета-гидроксипропил- (НР-бета), гамма-гидроксипропил- (НР-гамма) и сульфобутилэфир-(SBE)-циклодекстрина. Значительное уменьшение агрегации и флокуляции при добавлении циклодекстринов коррелировало также со значительным  
 40 уменьшением воспаления в месте подкожной инъекции у крыс. Кроме того, в настоящем изобретении предложен способ минимизации воспаления на участке инъекции при подкожном введении макромолекулы, такой как белок, путем введения от 2% до 30% НР-бета-циклодекстрина, НР-гамма-циклодекстрина или SBE-циклодекстрина в композицию, предназначенную для подкожного введения. В различных воплощениях  
 45 настоящего изобретения макромолекулой является антитело. В дополнительных воплощениях настоящего изобретения антитело представляет собой антитело терапевтического назначения или антитело диагностического назначения.

В различных воплощениях настоящего изобретения макромолекулой является анти-

CD20-антитело. В определенных воплощениях настоящего изобретения анти-CD20-антитело представляет собой гуманизированное антитело. В определенных воплощениях настоящего изобретения анти-CD20-антитело содержит один из вариантов А, В, С, D, F, G, H или I из таблицы 1. В настоящем изобретении дополнительно предложены

5 способы и композиции, в которых анти-CD20-антитело содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-15. В дополнительных воплощениях настоящего изобретения антитело содержит

вариабельный домен легкой цепи последовательности SEQ ID NO:1 и вариабельный домен тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO:2, или вариабельный домен легкой

10 цепи последовательности SEQ ID NO:3 и вариабельный домен тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO:4, или вариабельный домен легкой цепи последовательности SEQ ID NO:3 и вариабельный домен тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO:5. В настоящем изобретении дополнительно предложены

способы и композиции, в которых антитело содержит полноразмерную легкую цепь

15 последовательности SEQ ID NO:6 и полноразмерную тяжелую цепь последовательности SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8 или SEQ ID NO:15. В настоящем изобретении дополнительно предложены способы и композиции, в которых антитело содержит полноразмерную легкую цепь последовательности SEQ ID NO:9 и полноразмерную тяжелую цепь последовательности SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13 или

20 SEQ ID NO:14.

В дополнительных аспектах настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция для подкожного введения макромолекулы, такой как белок, содержащая от 2% до 30% НР-бета-циклодекстрина, НР-гамма-циклодекстрина или SBE-циклодекстрина. В некоторых воплощениях настоящего изобретения предложена

25 фармацевтическая композиция для подкожного введения антитела, содержащая указанное антитело в концентрации в интервале от 10 мг/мл до 200 мг/мл и от 2% до 30% НР-бета-циклодекстрина, НР-гамма-циклодекстрина или SBE-циклодекстрина. В некоторых воплощениях концентрация указанного антитела варьирует в интервале от 30 мг/мл до 150 мг/мл. В дополнительных воплощениях концентрация антитела

30 варьирует в интервале от 100 до 150 мг/мл. В определенных воплощениях фармацевтическая композиция содержит НР-бета-циклодекстрин в концентрации от 5% до 30%. В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция содержит НР-гамма-циклодекстрин от 5% до 20%. В определенных воплощениях фармацевтическая композиция дополнительно содержит аргининсукцинат в концентрации от 50 мМ до

35 200 мМ. В определенных воплощениях фармацевтическая композиция содержит SBE-циклодекстрин в концентрации от 2% до 9%. В определенных воплощениях фармацевтическая композиция содержит антитело в концентрации, приблизительно составляющей 100 мг/мл, а НР-бета-циклодекстрин в концентрации от 15% до 30%. В определенных воплощениях фармацевтическая композиция содержит антитело в

40 концентрации, приблизительно составляющей 150 мг/мл, а НР-бета-циклодекстрин в концентрации, приблизительно составляющей 30%. В определенных воплощениях фармацевтическая композиция содержит антитело в концентрации, приблизительно составляющей 150 мг/мл, а НР-гамма циклодекстрин в концентрации, приблизительно составляющей 10%. В определенных воплощениях фармацевтическая композиция

45 дополнительно содержит аргининсукцинат в концентрации от 50 мМ до 200 мМ. В специфическом воплощении фармацевтическая композиция содержит гуманизированное антитело 2H7 в концентрации в интервале от 100 мг/мл до 150 мг/мл, НР-гамма циклодекстрин в концентрации от 15% до 30% и аргининсукцинат в концентрации от



50 мМ до 100 мМ. В дополнительных воплощениях фармацевтическая композиция дополнительно содержит 30 мМ ацетата натрия; 5% дигидрата трегалозы и 0,03% полисорбата-20, при рН 5,3.

В настоящем изобретении дополнительно предложены любая из указанных выше композиций, содержащих гуманизированное анти-CD20-антитело, состоящее из любого из антител, перечисленных в таблице 1. В настоящем изобретении дополнительно предложены композиции, в которых указанное анти-CD20-антитело содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:1-15. В дополнительных воплощениях настоящего изобретения указанное антитело содержит вариабельный домен легкой цепи последовательности SEQ ID NO:1 и вариабельный домен тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO:2, или вариабельный домен легкой цепи последовательности SEQ ID NO:3 и вариабельный домен тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO:4. В настоящем изобретении дополнительно предложены способы и композиции, в которых антитело содержит полноразмерную легкую цепь последовательности SEQ ID NO:6 и полноразмерную тяжелую цепь последовательности SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8 или SEQ ID NO:15. В настоящем изобретении дополнительно предложены способы и композиции, в которых антитело содержит полноразмерную легкую цепь последовательности SEQ ID NO:9 и полноразмерную тяжелую цепь последовательности SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13 или SEQ ID NO:14.

В настоящем изобретении дополнительно предложен способ лечения рака В-клеток, экспрессирующих CD20, включающий введение любого из гуманизированных анти-CD20-антител из таблицы 1 в составе фармацевтической композиции, содержащей от 2% до 30% HP-бета-циклодекстрина, HP-гамма-циклодекстрина или SBE-циклодекстрина. CD20-положительным В-клеточным раком предпочтительно является В-клеточная лимфома или лейкоз. В специфических воплощениях композиции, содержащие гуманизированные антитела 2H7, которые связываются с человеческим CD20 (hCD20) и его функциональными фрагментами, используются для лечения неходжкинской лимфомы (НХЛ), НХЛ низкой степени злокачественности, включая рецидивирующую и стойкую к действию ритуксимаба НХЛ низкой степени злокачественности, лимфоцит-доминирующей болезни Ходжкина (LPHD), мелкоклеточной В-лимфоцитарной лимфомы (SLL), хронической лимфоцитарной лейкозии (ХЛЛ). В специфических воплощениях композиции, содержащие гуманизированные CD20-связывающие антитела, в частности, варианты А, В, С, D или Н из таблицы 1, и их функциональные фрагменты, используются для лечения перечисленных выше CD20-положительных типов В-клеточного рака.

В настоящем изобретении предложен также способ лечения аутоиммунного заболевания, включающий введение пациенту, страдающему от указанного аутоиммунного заболевания, терапевтически эффективного количества гуманизированного антитела 2H7, указанного в таблице 1, в составе фармацевтической композиции, содержащей от 2% до 30% HP-бета-циклодекстрина, HP-гамма-циклодекстрина или SBE-циклодекстрина. В специфических воплощениях аутоиммунное заболевание выбрано из группы, состоящей из ревматоидного артрита (РА) и ювенильного ревматоидного артрита, а пациенты с РА являются пациентами, неадекватно реагирующими на воздействие метотрексата (Mtx) и неадекватно реагирующими на воздействие антагониста TNF $\alpha$ , пациентами, резистентными к воздействию ритуксимаба, или пациентами с рецидивом заболевания. В одном из воплощений пациентом с РА является пациент, резистентный к воздействию другого терапевтического анти-CD20-антитела, или пациент с рецидивом. В других воплощениях

аутоиммунное заболевание выбрано из группы, состоящей из системной красной волчанки (СКВ), включая волчаночный нефрит, рассеянного склероза (РС), возвратно-ремиттирующего рассеянного (или множественного) склероза (RRMS), гранулематоза Вегенера, воспалительного заболевания кишечника, язвенного колита, идиопатической тромбоцитопенической пурпуры (ИТП), тромботической тромбоцитопенической пурпуры (ТТП), аутоиммунной тромбоцитопении, рассеянного склероза, псориаза, IgA-нефропатии, IgM-полиневропатий, миастении гравис, ANCA-ассоциированного васкулита, сахарного диабета, синдрома Рейно, синдрома Шегрена, оптиконевромиелита (NMO) и гломерулонефрита. В специфических воплощениях композиции, содержащие гуманизированные CD20-связывающие антитела, в частности, варианты А, В, С, D или Н из таблицы 1, или их функциональные фрагменты, используются для лечения перечисленных выше аутоиммунных заболеваний.

В определенных воплощениях способов лечения указанных выше заболеваний, субъект или пациент, страдающий от указанного заболевания, является приматом, предпочтительно человеком.

В настоящем изобретении дополнительно предложен способ улучшения или поддержания растворимости или минимизации выпадения в осадок антитела в составе водной композиции для подкожного введения при ее инъекции в место введения пациенту, где указанный способ включает добавление от 2% до 30% НР-бета-циклодекстрина, НР-гамма-циклодекстрина или SBE-циклодекстрина к водной композиции для подкожного введения. В определенных воплощениях фармацевтическая композиция содержит НР-бета-циклодекстрин в концентрации от 5% до 30%. В определенных воплощениях фармацевтическая композиция содержит НР-гамма-циклодекстрин в концентрации от 5% до 20%. В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция дополнительно содержит аргининсукцинат в концентрации от 50 мМ до 200 мМ. В определенных воплощениях фармацевтическая композиция содержит SBE-циклодекстрин в концентрации от 2% до 9%.

В настоящем изобретении дополнительно предложен способ повышения биодоступности вводимого подкожно антитела, включающий добавление от 2% до 30% НР-бета-циклодекстрина, НР-гамма-циклодекстрина или SBE-циклодекстрина к водной композиции для подкожного введения, содержащей указанное антитело. В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция содержит НР-бета-циклодекстрин в концентрации от 5% до 30%. В определенных воплощениях фармацевтическая композиция содержит НР-гамма-циклодекстрин в концентрации от 5% до 20%. В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция дополнительно содержит аргининсукцинат в концентрации от 50 мМ до 200 мМ. В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция содержит SBE-циклодекстрин в концентрации от 2% до 9%.

В настоящем изобретении дополнительно предложен способ диализа *in vitro* для оценки способности эксципиента уменьшать агрегацию антитела или другой макромолекулы в физиологических условиях, включающий диализ композиций макромолекулы, в присутствии или в отсутствие тестируемого эксципиента, против тестируемой среды, для имитации физиологических условий при 37°C, при постоянном перемешивании; взятие образцов раствора модифицированной среды; и измерение внешних проявлений, таких как мутность образцов и количество белка, присутствующего в высвобождаемой среде, такими методами, как УФ-фотометрическое сканирование, при этом увеличение концентрации белка и уменьшение мутности в высвобождаемой среде в образце для анализа, содержащем тестируемый эксципиент, по сравнению с

контрольным образцом, не содержащим эксципиент, являются показателем того, что тестируемый эксципиент способен уменьшать агрегацию указанной макромолекулы. В специфических воплощениях указанную среду сопоставляют с модифицированным раствором PBS, таким как раствор PBS, содержащий 167 мМ натрия, 140 мМ хлорида, 17 мМ фосфата, 4 мМ калия. В специфических воплощениях указанного способа диализная трубка отсекает макромолекулы с молекулярной массой выше, чем 1 миллион дальтон. В дополнительных специфических воплощениях указанного способа, концентрацию белка и мутность в тестируемых образцах измеряют с использованием УФ-спектрометрии. В дальнейших воплощениях указанного способа, такой способ включает визуальный осмотр модифицированной высвобождаемой среды и раствора внутри диализной трубки на предмет осаждения, при этом уменьшение осаждения в диализной трубке, содержащей тестируемый эксципиент, по сравнению с контрольным образцом, не содержащим эксципиент, являются показателем того, что тестируемый эксципиент способен уменьшать агрегацию указанной макромолекулы.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На фиг. 1 показана агрегация антитела 2Н7 при физиологических условиях. 2Н7 в концентрации 150 мг/мл диализовали против буфера PBS в течение двух дней при 37°C.

На фиг. 2 показана модель диализа *in vitro*, используемая для оценки эффектов, оказываемых эксципиентами, в отношении агрегации антитела 2Н7 при физиологических условиях. 250-мл стеклянный сосуд заполняли 220 мл модифицированного раствора PBS (167 мМ натрия, 140 мМ хлорида, 17 мМ фосфата, 4 мМ калия) при 37°C. 12-миллиметровую диализную трубку длиной в 6 см зажимали с одного конца, заполняли приблизительно 1 мл тестируемого образца, избыточный воздух удаляли, и другой конец трубки перехватывали зажимом. Стеклянный сосуд помещали в условия при 37°C и при постоянном перемешивании.

На фиг. 3 показано поведение контролей в диализной модели *in vitro*. Как 2Н7, так и rhuMab CD11a тестировали в диализной модели, представленной на фиг. 2. Кумулятивное процентное содержание белка, высвобождаемого в раствор PBS, измеряли во временных точках, соответствующих 2,5, 6, 12, 24, 33 и 48 часам.

На фиг. 4 показано воздействие 2-9% SBE-циклодекстрина на высвобождение 2Н7 в указанной модели *in vitro*.

На фиг. 5 показано воздействие 5-20% HP-гамма-циклодекстрина на высвобождение 2Н7 в указанной модели *in vitro*.

На фиг. 6 показано воздействие 5-20% HP-бета-циклодекстрина на высвобождение 2Н7 в указанной модели *in vitro*.

На фиг. 7 показано воздействие HP-гамма-циклодекстрина и аргининсукцината на высвобождение 2Н7 в указанной модели *in vitro*.

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ВОПЛОЩЕНИЙ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Различные формы глагола "агрегировать" относятся к процессу, при котором индивидуальные белковые молекулы или комплексы ассоциируют с образованием агрегатов. "Агрегат" представляет собой совокупность полимеров, включающую молекулы или комплексы белка. Агрегация может происходить до такой степени, что образуется видимый осадок. Образование такого видимого осадка называется здесь также "флокуляцией".

Относительное количество преципитата макромолекул может быть определено, например, путем сравнения с визуальным контролем. Дополнительные способы анализа преципитации известны в данной области и описаны ниже, например, способ диализа *in vitro*, подробно описанный в примере 2, или модель *in vivo*, описанная в примере 3.

Термин "биодоступность" относится к степени, в которой - или к скорости, при которой - лекарственное средство или другое вещество абсорбируется или становится доступным в области физиологической активности в месте его введения. Биодоступность макромолекулы может быть изучена с помощью фармакокинетических методов *in vivo*, известных в данной области.

Термин "макромолекула" относится к молекуле с молекулярной массой, по меньшей мере составляющей 10000 дальтон, и может включать в себя белки, такие как антитела.

Термины "эксципиент" или "фармацевтический эксципиент" относятся к соединениям, которые могут уменьшить агрегацию макромолекулы. Эксципиенты могут включать сахара, соли, свободные аминокислоты, такие как L-аргинин и L-глутамин, полиолы, полиэтиленгликоли (ПЭГ) и другие полимеры, такие как полисорбаты, поллоксамеры или поливинилпирролидон.

Термин "циклодекстрин" (или "ЦД") относится к циклическим олигосахаридам, имеющим d-глюкопиранозные звенья, соединенные альфа-(1,4)-гликозидными связями. Наиболее часто встречающимися, образующимися природным путем циклодекстринами являются альфа-циклодекстрин, бета-циклодекстрин и гамма-циклодекстрин, состоящие, соответственно, из 6, 7 и 8 глюкопиранозных звеньев. Синонимы циклодекстрина включают кавитрон, циклический олигосахарид, циклоамулозу и циклоглюкан.

Используемый здесь термин "циклодекстрин" может дополнительно включать в себя производные циклодекстрина, включая, но не ограничиваясь указанным, метилированные ЦД, 2-гидроксипропилированные ЦД, ацетилированные ЦД, разветвленные ЦД и сульфобутил-циклодекстрины.

Термин "терапевтическое антитело" относится к антителу, которое используется при лечении заболевания. Терапевтическое антитело может иметь различные механизмы действия. Терапевтическое антитело может связываться с мишенью и нейтрализовать ее нормальную функцию. Например, моноклональное антитело, которое блокирует активность белка, необходимого для выживания раковых клеток, вызывает гибель таких клеток. Другое терапевтическое моноклональное антитело может связываться с мишенью и активировать его нормальную функцию. Например, моноклональное антитело может связываться с белком на клеточной поверхности и запускать сигнал апоптоза. Наконец, если моноклональное антитело связывается с мишенью, экспрессируемой только на пораженной болезнью ткани, путем конъюгации токсичного вещества (эффективный агент), такого как химиотерапевтический или радиоактивный агент, с моноклональным антителом можно создать средство для специфической доставки токсичного вещества к пораженной болезнью ткани, уменьшая, таким образом, вред, наносимый здоровой ткани.

Термин "диагностическое антитело" относится к антителу, которое используется в качестве диагностического антитела в отношении того или иного заболевания реагента. Такое диагностическое антитело может связываться с мишенью, которая специфически ассоциирована с конкретным заболеванием или которая при указанном заболевании экспрессируется в повышенном количестве. Диагностическое антитело может быть использовано, например, для детектирования мишени в биологическом образце, полученном из организма пациента, или для диагностической визуализации у пациента пораженных болезнью участков, таких как опухоли.

Антиген "CD20" является негликозилированным трансмембранным фосфопротеином с молекулярной массой, приблизительно составляющей 35 кДа, который обнаруживается на поверхности более чем 90% В-клеток из периферической крови или лимфоидных органов. CD20 экспрессируется в процессе ранней стадии развития пре-В-клеток и

сохраняется до стадии дифференцировки в плазматические клетки; указанный антиген не обнаруживается на стволовых клетках человека, лимфоидных клетках-предшественниках или нормальных плазматических клетках. CD20 присутствует как на нормальных В-клетках, так и на злокачественных В-клетках. Другие названия, встречающиеся в литературе для CD20, включают в себя "ограниченный В-лимфоцитами дифференцировочный антиген" и "Br35". Антиген CD20 описан, например, у Clark and Ledbetter, Adv. Can. Res. 52: 81-149 (1989) и Valentine et al. J. Biol. Chem. 264(19): 11282-11287 (1989).

Термин "антитело" используется в широком смысле и, в частности, охватывает моноклональные антитела (включая полноразмерные моноклональные антитела), мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела), и фрагменты антител, при условии, что они проявляют требуемую биологическую активность или функцию.

Биологическая активность гуманизированных CD20-связывающих антител согласно изобретению будет включать по меньшей мере связывание такого антитела с человеческим антигеном CD20, более предпочтительно, связывание с антигеном CD20 другого примата (включая макака-крабоедов, макака-резус, шимпанзе). Такие антитела должны будут связываться с CD20 с Kd, составляющей не более чем  $1 \times 10^{-8}$ ,

предпочтительно с Kd, составляющей не более чем  $1 \times 10^{-9}$ , и будут способны уничтожать или истощать В-клетки *in vivo*, предпочтительно по меньшей мере на 20% по сравнению с соответствующим отрицательным контролем, не обработанным таким антителом. Истощение В-клеток может быть результатом одного или более из таких механизмов, как ADCC, CDC, апоптоз или другой механизм. В некоторых воплощениях указанного здесь лечения заболеваний, могут больше других потребоваться специфические эффекторные функции или механизмы, также как и определенные варианты гуманизированного антитела 2H7 могут оказаться более предпочтительными для достижения указанных биологических функций, таких, например, как ADCC.

Термин "фрагменты антитела" включает в себя часть полноразмерного антитела, обычно его антигенсвязывающий участок или его вариабельную область. Примеры фрагментов антитела включают Fab-, Fab'-, F(ab')<sub>2</sub> и Fv-фрагменты; диатела; линейные антитела; молекулы одноцепочечных антител; и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

"Fv" представляет собой минимальный фрагмент антитела, который содержит полный антигенраспознающий и антигенсвязывающий участок. Такой фрагмент состоит из димера, образованного вариабельными доменами одной тяжелой и одной легкой цепи, находящимися в тесной нековалентной ассоциации друг с другом. Из пространственной упакованной структуры указанных двух доменов выступает шесть гипервариабельных петель (по 3 петли из H- и L-цепей), аминокислотные остатки которых участвуют в связывании антигена и придают антителу специфичность связывания антигена. Однако даже одиночный вариабельный домен (или половина фрагмента Fv, содержащая только три специфичных в отношении антигена участка CDR) обладает способностью распознавать антиген и связываться с ним, хоть и с меньшей аффинностью, чем полный участок связывания.

Используемый здесь термин "моноклональное антитело" относится к антителу из популяции по существу гомогенных антител, то есть индивидуальные антитела, содержащиеся в такой популяции, являются идентичными и/или связываются с одним и тем же эпитопом (эпитопами), за исключением возможных вариантов, которые могут

возникать в процессе продуцирования моноклонального антитела, однако такие варианты обычно присутствуют в минорных количествах. Такое моноклональное антитело обычно включает антитело, содержащее полипептидную последовательность, которая связывается с мишенью, где связывающаяся с мишенью полипептидная последовательность была получена способом, который включает в себя выбор единственной связывающейся с мишенью полипептидной последовательности из множества полипептидных последовательностей. Например, процесс отбора может представлять собой селекцию единственного клона из множества клонов, таких как пул гибридных клонов, фаговых клонов или клонов рекомбинантных ДНК. Следует понимать, что выбранная связывающаяся с мишенью последовательность может быть дополнительно изменена, например, для улучшения аффинности в отношении мишени, для гуманизации связывающейся с мишенью последовательности, для улучшения ее продуцирования в клеточной культуре, для уменьшения ее иммуногенности *in vivo*, для создания мультиспецифического антитела и т.д., и что антитело, содержащее такую измененную связывающуюся с мишенью последовательность, также является моноклональным антителом согласно настоящему изобретению. В отличие от получения препаратов поликлональных антител, которые обычно включают в себя различные антитела, направленные на разные детерминанты (эпитопы), каждое моноклональное антитело в препарате моноклональных антител направлено на единственную антигенную детерминанту. Помимо их специфичности, препараты моноклональных антител предпочтительны в том отношении, что они обычно не имеют примесей других иммуноглобулинов. Определение "моноклональное" указывает на характер антитела, то есть на то, что антитело получено из популяции по существу гомогенных антител, а не сконструировано каким-нибудь конкретным способом в виде предписанного продуцирования антитела. Например, моноклональные антитела, используемые в соответствии с настоящим изобретением, могут быть получены с помощью различных технологий, включая, например, гибридомный метод (например, Kohler et al., *Nature*, 256: 495 (1975); Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2<sup>nd</sup> ed. 1988); Hammerling et al., в книге: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681, (Elsevier, N.Y., 1981)), методы рекомбинантных ДНК (см., например, патент США № 4816567), технологии фагового дисплея (см., например, Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004); и Lee et al. *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132 (2004), а также технологии для продуцирования человеческих антител или антител наподобие человеческих, полученных у животных, которые содержат частично или полностью локусы или гены человеческого иммуноглобулина, кодирующие последовательности человеческого иммуноглобулина (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 Immuno.*, 7: 33 (1993); патенты США №№ 5545806; 5569825; 5591669 (все на имя GenPharm); 5545807; WO 1997/17852; патенты США №№ 5545807; 5545806; 5569825; 5625126; 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 Biotechnology*, 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology*, 14: 826 (1996); и Lonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.*, 13: 65-93 (1995).

"Функциональными фрагментами" CD20-связывающих антител согласно изобретению являются те фрагменты, которые сохраняют способность связывания с CD20 по существу

с той же самой аффинностью, что и интактная полноразмерная молекула, из которой они получены, и проявляют биологическую активность, включая истощение В-клеток, измеряемое с помощью анализов *in vitro* или *in vivo*, таких как описанные здесь анализы.

Термин "вариабельный" относится к тому факту, что определенные сегменты  
 5 вариабельных доменов в антителах значительно отличаются друг от друга. V-доменом опосредовано связывание антигена и определяется специфичность конкретного антитела в отношении его конкретного антигена. Однако вариабельность распределена вовсе не равномерно вдоль длины вариабельных доменов, насчитывающих 110  
 10 аминокислотных остатков. На самом деле V-области состоят из относительно инвариантных отрезков, называемых участками рамки считывания (FR) из 15-30 аминокислот, разделенных короткими участками, отличающимися исключительной вариабельностью и называемыми "гипервариабельными областями", каждая из которых содержит в длину по 9-12 аминокислот. Вариабельные домены нативных тяжелых и  
 15 легких цепей содержат каждый по четыре FR, в основном принимающие пространственную конфигурацию в виде  $\beta$ -складчатой структуры, соединенные тремя гипервариабельными областями, которые образуют петли, соединяющие, а в некоторых случаях образующие часть,  $\beta$ -складчатой структуры. Гипервариабельные области в каждой цепи удерживаются в непосредственной близости друг от друга посредством  
 20 участков FR и, вместе с гипервариабельными областями из другой цепи, участвуют в образовании антигенсвязывающего участка антител (см. Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Константные домены непосредственно в связывании антитела с антигеном не участвуют, однако они проявляют различные эффекторные функции, такие как участие антитела в антитело-зависимой клеточной цитотоксичности (ADCC).

Используемый здесь термин "гипервариабельная область" относится к  
 25 аминокислотным остаткам антитела, которые ответственны за связывание с антигеном. Обычно гипервариабельная область содержит аминокислотные остатки из "определяющей комплементарности области", или "CDR" (например, это приблизительно остатки 24-34 (L1), 50-56 (L2) и 89-97 (L3) в  $V_L$ , и приблизительно 31-35B (H1), 50-65 (H2)  
 30 и 95-102 (H3) в  $V_H$  (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)), и/или остатки из "гипервариабельной петли" (например, остатки 26-32 (L1), 50-52 (L2) и 91-96 (L3) в  $V_L$ , и 26-32 (H1), 52A-55 (H2) и 96-101 (H3) в  $V_H$  (Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196: 901-917  
 35 (1987))).

Используемый здесь термин "консенсусная последовательность", или консенсусная последовательность V-домена, относится к искусственной последовательности, полученной в результате сравнения аминокислотных последовательностей известных  
 40 вариабельных областей человеческих иммуноглобулинов. На основе таких сравнений были получены последовательности рекомбинантных нуклеиновых кислот, кодирующие аминокислоты V-домена, которые являются консенсусом последовательностей, полученных из человеческой к- и человеческой Н-цепи V-доменов подгруппы III. Консенсусная V-последовательность не обладает какой бы то ни было из известных специфичностью или аффинностью связывания антитела.

"Химерные" антитела (иммуноглобулины) имеют область тяжелой и/или легкой цепи, идентичную или гомологичную соответствующим последовательностям в антителах,  
 45 полученных из конкретных видов или принадлежащих конкретному классу или подклассу антител, в то время как остальная цепь (цепи) идентична или гомологична

соответствующим последовательностям в антителах, полученных из других видов или принадлежащих другому классу или подклассу антител, а также фрагментах таких антител, при условии, что они проявляют требуемую биологическую активность (патент США № 4816567; и Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6851-6855 (1984)).

5 Используемое здесь гуманизированное антитело является субпопуляцией химерных антител.

"Гуманизированные" формы нечеловеческих (например, мышинных) антител являются химерными антителами, которые содержат минимальную последовательность, полученную из нечеловеческого иммуноглобулина. По большей части, гуманизированные антитела являются человеческими иммуноглобулинами (реципиентное или акцепторное антитело), в которых остатки гипервариабельной области реципиента заменены остатками гипервариабельной области из видов, отличных от человека (донорское антитело), таких как мышь, крыса, кролик или нечеловекообразный примат, обладающими требуемой специфичностью, аффинностью и емкостью. В некоторых случаях остатки Fv-области рамки считывания (FR) человеческого иммуноглобулина заменены соответствующими нечеловеческими остатками. Кроме того, гуманизированные антитела могут содержать остатки, которые не содержатся в реципиентном антителе или в антителе-доноре. Такие модификации предпринимают для дальнейшего улучшения эффективности антитела, такой как его аффинность связывания. В целом гуманизированное антитело будет содержать по существу все из по меньшей мере одного, обычно двух, вариабельных доменов, в которых все или по существу все гипервариабельные петли соответствуют таковым нечеловеческого иммуноглобулина, и все или по существу все из FR-областей являются таковыми из последовательности человеческого иммуноглобулина, хотя FR-области могут включать одну или более аминокислотных замен, которые улучшают аффинность связывания. Число таких аминокислотных замен в области FR обычно составляет не более чем 6 в H-цепи, а в L-цепи не более чем 3. Кроме того, гуманизированное антитело будет необязательно содержать по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc), обычно иммуноглобулина человека. Для ознакомления с дальнейшими подробностями см. Jones et al., *Nature* 321: 522-525 (1986); Reichmann et al., *Nature* 332: 323-329 (1988); and Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2: 593-596 (1992).

"Комплемент-зависимая цитотоксичность", или "CDC", относится к лизису клетки-мишени в присутствии комплемента. Активация классического пути комплемента инициируется путем связывания первого компонента системы комплемента (C1q) с антителами (соответствующего подкласса), которые связаны с распознаваемым ими антигеном. Для оценки активации комплемента предпринимают анализ CDC, например, так, как описано Gazzano-Santoro с соавторами, *J. Immunol. Methods* 202: 163 (1996).

В настоящем описании заявки и в формуле изобретения, если специально не указано иное, нумерация остатков в константном домене тяжелой цепи иммуноглобулина соответствует таковой в указателе EU, как у Kabat с соавторами, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), специально включенном в настоящее описание в виде ссылки. Указатель "EU, как у Kabat" относится к нумерации остатков в человеческом антителе IgG1 EU. Остатки в V-области пронумерованы в соответствии с нумерацией Kabat, если специально не указано, что нумерация соответствует последовательной нумерации или другой системе нумерации.

CD20-антитела включают в себя антитело "C2B8", которое теперь называется "ритуксимабом" ("RITUXAN®") (патент США № 5736137); меченное иттрием-90



мышинное антитело 2B8, обозначаемое "Y2B8" или "ибритумомаб тиуксетаном" (ZEVALIN®), коммерчески доступным в компании IDEC Pharmaceuticals, Inc. (патент США № 5736137; 2B8, депонированное 22 июня 1993 года в АТСС под регистрационным номером HB11388); мышинное антитело IgG2a "B1", также называемое "тозитумомабом",

5 необязательно меченное  $^{131}\text{I}$ , с получением антитела " $^{131}\text{I}$ -B1", или "йодин- $^{131}\text{I}$ -тозитумомаба" (BEXXAR<sup>TM</sup>), GlaxoSmithKline, см. также патент США № 5595721); мышинное моноклональное антитело "1F5" (Press et al. *Blood* 69(2): 584-591 (1987) и его варианты, включая "framework patched", или гуманизированное антитело 1F5 (WO 2003/002607, Leung, S.; АТСС-депозит HB-96450); мышинное антитело 2H7 и химерное антитело 2H7 (патент США № 5677180); гуманизированное антитело 2H7 (WO 2004/056312 (Lowman et al.) и как указано ниже); полностью человеческое антитело HuMAX-CD20 (TM) (Genmab, Denmark; см., например, Glennie и van de Winkel, *Drug Discovery Today* 8: 503-510 (2003), а также Cragg et al., *Blood* 101: 1045-1052 (2003)); человеческие 15 моноклональные антитела, описанные в международной заявке WO 2004/035607 (Teeling et al.); антитела, имеющие сложные N-гликозид-связанные сахарные цепи, которые связаны с Fc-областью, описанные в заявке US 2004/0093621 (Shitara et al.); CD20-связывающие молекулы, такие как серия антител АМЕ, например, антитела АМЕ-133 (TM), описанные в международной заявке WO 2004/103404 (Watkins et al., Applied Molecular 20 Evolution); антитело А20 или его варианты, такие как химерное или гуманизированное антитело А20 (сА20, IMMU-106 a.k.a. hA20, соответственно (US 2003/0219433, US 2005/0025764; Immunomedics); и моноклональные антитела L27, G28-2, 93-1B3, B-Cl или NU-B2, доступные в компании International Leukocyte Typing Workshop (Valentine et al., In: Leukocyte Typing III (McMichael, Ed., p. 440, Oxford University Press (1987)). Здесь 25 предпочтительными CD20-антителами являются гуманизированные, химерные или человеческие CD20-антитела, более предпочтительно гуманизированное антитело 2H7, ритуксимаб, химерное или гуманизированное антитело А20 (Immunomedics), а также человеческое CD20-антитело HuMAX-CD20<sup>TM</sup> (Genmab).

30 "Выделенным" антителом является антитело, которое идентифицировано и отделено и/или восстановлено из компонента его природного окружения. Примесными компонентами его природного окружения являются вещества, которые будут мешать диагностическому или терапевтическому применениям указанного антитела, и могут включать ферменты, гормоны и другие вещества белковой или небелковой природы. 35 В предпочтительных воплощениях такое антитело будет очищено (1) более чем до 95% по массе антитела, что определяется методом Лоури, а наиболее предпочтительно более чем до 99% по массе, (2) до степени, достаточной для получения по меньшей мере 15 остатков с N-конца или из внутренней аминокислотной последовательности, с помощью секвенатора с вращающимся стаканом, или (3) до степени гомогенности, 40 определяемой путем ДСН-ПААГ-ЭФ в восстановительных или невосстановительных условиях при окрашивании Кумасси голубым или, предпочтительно, при окрашивании серебром. Выделенное антитело включает антитело *in situ* в рекомбинантных клетках, поскольку в этом случае не присутствует по меньшей мере один из компонентов природного окружения антитела. Однако чаще всего выделенное антитело будет 45 получено посредством по меньшей мере одной стадии очистки.

#### **Композиции и способы согласно изобретению**

В настоящем изобретении предложены фармацевтические композиции для подкожного введения макромолекулы, такой как белок, содержащие от 2% до 30% НР-бета-циклодекстрина, НР-гамма-циклодекстрина или SBE-циклодекстрина. В

определенных воплощениях в настоящем изобретении предложена фармацевтическая композиция для подкожного введения антитела в концентрации от 10 мг/мл до 200 мг/мл, содержащая также от 2% до 30% НР-бета-циклодекстрина, НР-гамма-циклодекстрина или SBE-циклодекстрина. В определенных воплощениях концентрация антитела составляет от 30 до 150 мг/мл. В дополнительных воплощениях концентрация антитела составляет 100-150 мг/мл. В определенных воплощениях фармацевтическая композиция содержит НР-бета-циклодекстрин в концентрации от 5% до 30%. В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция содержит НР-гамма-циклодекстрин в концентрации от 5% до 20%. В определенных воплощениях фармацевтическая композиция дополнительно содержит аргининсукцинат в концентрации от 50 мМ до 200 мМ. В определенных воплощениях фармацевтическая композиция содержит SBE-циклодекстрин в концентрации от 2% до 9%. В определенных воплощениях фармацевтическая композиция содержит антитело в концентрации, приблизительно составляющей 100 мг/мл, и НР-бета-циклодекстрин в концентрации от 15% до 30%. В определенных воплощениях фармацевтическая композиция содержит антитело в концентрации, приблизительно составляющей 150 мг/мл, и НР-бета-циклодекстрин в концентрации, приблизительно составляющей 30%. В определенных воплощениях фармацевтическая композиция содержит антитело в концентрации, приблизительно составляющей 150 мг/мл, и НР-гамма-циклодекстрин в концентрации, приблизительно составляющей 10%. В определенных воплощениях фармацевтическая композиция дополнительно содержит аргининсукцинат в концентрации от 50 мМ до 200 мМ. В специфическом воплощении фармацевтическая композиция содержит гуманизированное антитело 2Н7 в концентрации от 100 мг/мл до 150 мг/мл, НР-гамма-циклодекстрин в концентрации от 15% до 30% и аргининсукцинат в концентрации от 50 мМ до 100 мМ. В дальнейших воплощениях фармацевтическая композиция дополнительно содержит 30 мМ ацетата натрия; 5% дигидрата трегалозы; и 0,03% полисорбата-20, при pH 5,3.

В различных воплощениях в настоящем изобретении предложены фармацевтические композиции, содержащие гуманизированные антитела 2Н7 (также обозначаемые здесь как hu2Н7). В специфических воплощениях указанное гуманизированное антитело 2Н7 является антителом, указанным в таблице 1.

ТАБЛИЦА 1 Гуманизированное анти-CD20-антитело и его варианты				
Вариант 2Н7	V <sub>L</sub> SEQ ID NO:	V <sub>H</sub> SEQ ID NO:	SEQ ID NO: SEQ ID NO:	SEQ ID NO: полной Н-цепи SEQ ID NO:
A	1	2	6	7
B	1	2	6	8
C	3	4	9	10
D	3	4	9	11
F	3	4	9	12
G	3	4	9	13
H	3	5	9	14
I	1	2	6	15

Каждый из вариантов А, В и I указанного в таблице 1 антитела содержит переменную последовательность легкой цепи (V<sub>L</sub>): DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC  
 RASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSR FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFA  
 TYYCQQWSFNPTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:1);

и переменную последовательность тяжелой цепи (V<sub>H</sub>): EVQLVESGGGLVQPGGSL  
 RLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSY NQKFKGRFTISVDKS

KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSNSYWFYFDVWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:2).

Каждый из вариантов С, D, F и G указанного в таблице 1 антитела содержит вариабельную последовательность легкой цепи ( $V_L$ ): DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC  
 RASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSR FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFA  
 5 TYYCQQWAFNPPTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:3),

и вариабельную последовательность тяжелой цепи ( $V_H$ ): EVQLVESGGGLVQPGGSL  
 RLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGATSY NQKFKGRFTISVDKS  
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYASASYWFYFDVWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:  
 4).

10 Вариант H указанного в таблице 1 антитела содержит вариабельную последовательность легкой цепи ( $V_L$ ), SEQ ID NO:3 (выше), и вариабельную последовательность тяжелой цепи ( $V_H$ ):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGN  
 15 GATSY NQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSYRYWFYFDV  
 WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:5).

Каждый из вариантов A, B и I указанного в таблице 1 антитела содержит полную последовательность легкой цепи:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGV  
 20 PSR FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWSFNPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFP  
 PS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKIDSTYSLSS  
 TLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:6).

Вариант A в таблице 1 содержит полноразмерную последовательность тяжелой цепи:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGN  
 25 GDTSY NQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSNSYWFYFDV  
 WGQGLTVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT  
 SGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT  
 HTCPCPAPELL GGPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV  
 EVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK  
 30 GQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD  
 SDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:7).

Вариант B в таблице 1 содержит полноразмерную последовательность тяжелой цепи:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGN  
 GDTSY NQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSNSYWFYFDV  
 35 WGQGLTVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT  
 SGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT  
 HTCPCPAPELL GGPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV  
 EVHNAKTKPREEQ YNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIAATISKA  
 KGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV  
 40 LDDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:  
 8).

Вариант I в таблице 1 содержит полноразмерную последовательность тяжелой цепи:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGN  
 GDTSY NQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSNSYWFYFDV  
 45 WGQGLTVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT  
 SGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT  
 HTCPCPAPELL GGPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV  
 EVHNAKTKPREEQ YNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIAATISKA

KGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV  
LDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:  
15).

Каждый из указанных в таблице 1 вариантов C, D, F, G и H содержит полноразмерную  
последовательность легкой цепи:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVP  
SR FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWAFNPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFP  
PS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYSLSS  
TLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:9).

Вариант C в таблице 1 содержит полноразмерную последовательность тяжелой цепи:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGN  
GATSY NQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYASASYWYFDV  
WGQGTLLTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT  
SGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT  
HTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV  
EVHNAKTKPREEQ YNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIAATISKA  
KGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV  
LDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:  
10).

Вариант D в таблице 1 содержит полноразмерную последовательность тяжелой цепи:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGN  
GATSY NQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYASASYWYFDV  
WGQGTLLTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT  
SGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT  
HTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV  
EVHNAKTKPREEQ YNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEATISKA  
KGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV  
LDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:  
11).

Вариант F в таблице 1 содержит полноразмерную последовательность тяжелой цепи:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGN  
GATSY NQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYASASYWYFDV  
WGQGTLLTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT  
SGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT  
HTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV  
EVHNAKTKPREEQ YNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNAALPAPIAATISKA  
KGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV  
LDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:  
12).

Вариант G в таблице 1 содержит полноразмерную последовательность тяжелой цепи:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGN  
GATSY NQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYASASYWYFDV  
WGQGTLLTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT  
SGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT  
HTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV  
EVHNAKTKPREEQ YNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNAALPAPIAATISKA  
KGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV  
LDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHWHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:

13).

Вариант Н в таблице 1 содержит полноразмерную последовательность тяжелой цепи:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGN  
GATSY NQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYYSYRYWYFDV  
5 WGQGTLLTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT  
SGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT  
HTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV  
EVHNAKTKPREEQ YNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNAAALPAPIAATISKA  
KGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV  
10 LDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:  
14).

В некоторых воплощениях гуманизированное антитело 2H7 согласно изобретению дополнительно содержит аминокислотные преобразования в области Fc молекулы IgG и обладает повышенной аффинностью связывания человеческого FcRn по сравнению  
15 с антителом, имеющим область Fc молекулы IgG дикого типа, по меньшей мере в 60 раз, по меньшей мере в 70 раз, по меньшей мере в 80 раз, более предпочтительно по меньшей мере в 100 раз, предпочтительно по меньшей мере в 125 раз, еще более предпочтительно по меньшей мере от 150 приблизительно до 170 раз.

Участок N-гликозилирования в IgG находится в CH2-доме в положении Asn297.  
20 Композиции гуманизированного антитела 2H7 согласно изобретению включают в себя композиции любого из предшествующих гуманизированных антител 2H7, имеющих Fc-область, при этом приблизительно 80-100% (а предпочтительно, примерно 90-99%) указанного антитела в такой композиции содержит структуру зрелого углеводного ядра антитела, лишенного фукозы, присоединенной к Fc-области гликопротеина. Здесь  
25 показано, что такие композиции обладают неожиданно улучшенными свойствами связывания с FcγRIIIA(F158), который не столь эффективен, как FcγRIIIA (V158), во взаимодействии с человеческим IgG. В норме FcγRIIIA (F158) чаще, чем FcγRIIIA (V158), встречается у здоровых афроамериканцев и представителей белой европеоидной расы. См. Lehrnbecher et al. *Blood* 94: 4220 (1999). Исторически в популяции антител,  
30 продуцируемых в клетках яичника китайского хомячка (CHO), наиболее часто используемых в качестве промышленных клеток-хозяев, содержится приблизительно от 2 до 6% нефукозилированных антител. Однако клетки YB2/0 и Lec 13 могут продуцировать популяции антител, которые являются на 78-98% нефукозилированными. Shinkawa с соавторами, *J Biol. Chem.* 278 (5), 3466-347 (2003), сообщали, что антитела,  
35 продуцируемые в клетках YB2/0 и Lec 13, которые обладают меньшей FUT8-активностью, проявляют существенно более высокую ADCC-активность *in vitro*. Производство антител с пониженным содержанием фукозы также было описано, например, Li с соавторами (GlycoFi) "Optimization of humanized IgGs in glycoengineered *Pichia pastoris*" в интерактивной публикации Nature Biology online publication от 22 января  
40 2006 г.; Niwa R. et al. *Cancer Res.* 64(6): 2127-2133 (2004); в заявках US 2003/0157108 (Presta); US 6602684 и US 2003/0175884 (Glycart Biotechnology); US 2004/0093621, US 2004/0110704, US 2004/0132140 (все на имя Kyowa Hakko Kogyo).

Описанные здесь композиции могут также содержать более чем одно активное соединение, если это необходимо для конкретного терапевтического назначения,  
45 предпочтительно соединения с дополняющими друг друга активностями, которые не оказывают нежелательного влияния друг на друга. Например, может потребоваться дополнительное воздействие цитотоксического агента, терапевтического агента, цитокина или иммуносупрессивного агента (например, агента, который действует на

Т-клетки, такого как циклоспорин, или антитела, которое связывается с Т-клетками, например, антитела, которое связывается с LFA-1). Эффективное количество таких других агентов зависит от количества антитела, присутствующего в композиции, от типа заболевания или расстройства или лечения, а также от других описанных выше факторов. Они обычно используются в одинаковых дозировках и, как здесь описано, вводятся одинаковыми путями, или используются приблизительно в дозировках, составляющих от 1 до 99% от используемых прежде дозровок.

Композиции, используемые для введения *in vivo*, должны быть стерильными. Этого легко достичь путем фильтрации через стерильные фильтры.

#### **Продуцирование антител**

##### *Моноклональные антитела*

Моноклональные антитела могут быть получены с помощью гибридного метода, впервые описанного Kohler с соавторами, *Nature*, 256: 495 (1975), или могут быть получены с использованием технологий рекомбинантной ДНК (патент США № 4816567).

В гибридном методе мышь или другое подходящее животное-хозяина, такое как хомяк, иммунизируют, как описано выше, для получения лимфоцитов, которые продуцируют или способны продуцировать антитела, которые будут специфически связываться с белком, который был использован для иммунизации. Альтернативно лимфоциты могут быть иммунизированы *in vitro*. После иммунизации лимфоциты выделяют, а затем сливают с линией клеток миеломы с помощью подходящего фактора, вызывающего слияние клеток, такого как полиэтиленгликоль, с образованием гибридной клетки (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986)).

Полученные таким образом гибридные клетки высевают и выращивают в соответствующей культуральной среде, которая предпочтительно содержит одно или несколько веществ, которые ингибируют рост или выживаемость не слившихся родительских клеток миеломы (также называемых партнерами слияния). Например, если родительские клетки миеломы лишены фермента гипоксантингуанин-фосфорибозилтрансферазы (HGPRT или HPRT), селективная культуральная среда для гибридом будет, как правило, включать в себя гипоксантин, аминоптерин и тимидин (среда HAT) - вещества, которые препятствуют росту HGPRT-дефицитных клеток.

Предпочтительными партнерами слияния миеломных клеток являются такие, которые обеспечивают эффективное слияние, поддерживают стабильно высокий уровень продуцирования антитела отобранными антитело-продуцирующими клетками и являются чувствительными в отношении селективной среды, которая противодействует не слитым родительским клеткам. Предпочтительными миеломными линиями клеток являются мышинные миеломные линии, такие как линии, полученные из мышинных опухолей MOPC-21 и MPC-11, доступные в распределительном центре Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA, и SP-2 и производные, например, клетки X63-Ag8-653, доступные в Американской Коллекции Типовых Культур, Rockville, Maryland USA. Линии клеток человеческой миеломы и гетеромиеломы человек-мышь также описаны в связи с продуцированием человеческих моноклональных антител (Kozbor, *J. Immunol*, 133: 3001 (1984); и Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

Культуральную среду, в которой выращивают гибридные клетки, анализируют на предмет продуцирования моноклональных антител против антигена. Предпочтительно, чтобы специфичность связывания моноклональных антител, продуцируемых гибридными клетками, определялась методом иммунопреципитации

или посредством анализа связывания *in vitro*, такого как радиоиммуноанализ (RIA) или твердофазный иммуносорбентный анализ (ELISA).

Аффинность связывания моноклонального антитела может быть определена, например, с помощью анализа Скэтчарда, описанного у Munson с соавторами, *Anal. Biochem.*, 107: 220 (1980).

Сразу после идентификации гибридомных клеток, которые продуцируют антитела требуемой специфичности, аффинности и/или активности, клоны можно субклонировать с использованием методов предельного разведения и выращивать стандартными способами (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986)). Соответствующая для данных целей культуральная среда включает, например, среду D-MEM или среду RPMI-1640. Кроме того, гибридомные клетки можно выращивать *in vivo* в виде асцитных опухолей у животного, например, путем внутрибрюшинной инъекции таких клеток в организм мышей.

Моноклональные антитела, секретируемые указанными субклонами, соответствующим образом отделяют от культуральной среды, асцитной жидкости или сыворотки посредством обычно используемых методов очистки антител, таких, например, как аффинная хроматография (например, с использованием колонки с протеин А- или протеин G-сефарозой) или ионообменная хроматография, хроматография на гидроксилapatите, гель-электрофорез, диализ и т.д.

ДНК, кодирующую моноклональные антитела, легко изолируют и секвенируют, используя общепринятые приемы (например, с использованием олигонуклеотидных зондов, которые способны связываться с генами, кодирующими тяжелую и легкую цепи мышинных антител). Клетки гибридомы служат в качестве предпочтительного источника такой ДНК. Сразу после выделения указанную ДНК можно встроить в экспрессирующие векторы, которые затем трансфицируют в хозяйские клетки, такие как клетки *E. coli*, в обезьяньи клетки COS, в клетки яичника китайского хомячка (CHO) или в миеломные клетки, которые иначе не продуцируют белок антитела, добиваясь синтеза моноклональных антител в рекомбинантных клетках-хозяевах. Обзорные статьи по рекомбинантной экспрессии в бактериях ДНК, кодирующей антитело, включают Skerra et al., *Curr. Opinion in Immunol.*, 5: 256-262 (1993), и Plückthun, *Immunol. Revs.*, 130: 151-188 (1992).

В дальнейшем воплощении моноклональные антитела или фрагменты антител могут быть выделены из фаговых библиотек антител, полученных с использованием технологий, описанных у McCafferty с соавторами, *Nature*, 348: 552-554 (1990). У Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991), и Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991) описано выделение, соответственно, мышинных и человеческих антител с использованием библиотек фагового дисплея. В следующих публикациях описано продуцирование высокоаффинных (в нМ диапазоне) человеческих антител путем перегруппировки цепей (Marks et al., *Bio/Technology*, 10: 779-783 (1992)), а также путем комбинаторного инфицирования и *in vivo* рекомбинации в качестве стратегии для конструирования очень крупных фаговых библиотек (Waterhouse et al., *Nuc. Acids. Res.*, 21: 2265-2266 (1993)). Таким образом, указанные технологии являются доступными альтернативами традиционных гибридомных технологий моноклональных антител для получения выделенных моноклональных антител.

ДНК, которая кодирует антитело, может быть модифицирована с целью продуцирования химерных или слитых антительных полипептидов, например, путем замены последовательностей константного домена ( $C_H$  и  $C_L$ ) человеческой тяжелой цепи и легкой цепи гомологичными мышинными последовательностями (патент США

№ 4816567; а также Morrison et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81: 6851 (1984)), или путем слияния кодирующей иммуноглобулин последовательности с полной или частичной кодирующей последовательностью неиммуноглобулинового полипептида (гетерологичного полипептида). Последовательности неиммуноглобулинового полипептида можно заменить константными доменами антитела, или же их заменяют

5    вариабельными доменами одного антигенсвязывающего участка антитела, с получением химерного бивалентного антитела, содержащего один антигенсвязывающий участок, обладающий специфичностью в отношении антигена, и другой антигенсвязывающий участок, обладающий специфичностью в отношении другого антигена.

#### 10    Гуманизированные антитела

Способы гуманизации антител, не относящихся к человеческим антителам, описаны в данной области. Предпочтительно, чтобы гуманизированное антитело содержало один или несколько аминокислотных остатков, встроенных в него из источника, который не относится к человеку. Такие нечеловеческие аминокислотные остатки часто называют

15   «импортируемыми» остатками, которые, как правило, взяты из «импортируемого» вариабельного домена. Гуманизацию можно в основном проводить согласно методу Winter и соавторов (Jones et al., *Nature*, 321: 522-525 (1986); Reichmann et al., *Nature*, 332: 323-327 (1988); Verhoeven et al., *Science*, 239: 1534-1536 (1988)), путем замены последовательностей гипервариабельной области на соответствующие

20   последовательности человеческого антитела. Соответственно, такие «гуманизированные» антитела являются химерными антителами (патент США № 4816567), в которых домен, существенно меньший, чем интактный человеческий вариабельный домен, заменен соответствующей последовательностью из видов, не относящихся к человеку. На практике, как правило, гуманизированные антитела

25   являются человеческими антителами, в которых некоторые остатки гипервариабельной области и, возможно, некоторые остатки FR-области заменены остатками из аналогичных участков в антителах грызунов.

Выбор человеческих вариабельных доменов как легкой, так и тяжелой цепей для использования при получении гуманизированных антител является очень важным для

30   снижения антигенности и НАМА-ответа (человеческое антимышиное антитело), когда такие антитела предназначаются для применения в терапии человека. Согласно так называемому методу «наилучшей подгонки», последовательность вариабельного домена антитела грызунов подвергают скринингу против целой библиотеки известных последовательностей человеческих вариабельных доменов. Идентифицируют

35   человеческую последовательность V-домена, которая является наиболее близкой к таковой у грызунов, и область человеческой рамки считывания (FR) внутри него включают в гуманизированное антитело (Sims et al., *J. Immunol.*, 151: 2296 (1993); Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 196: 901 (1987)). В другом способе используется конкретный участок области рамки считывания, полученный из консенсусной последовательности всех

40   человеческих антител конкретной подгруппы легкой или тяжелой цепей. Одна и та же рамка считывания может быть использована для нескольких различных гуманизированных антител (Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4285 (1992); Presta et al., *J. Immunol.*, 151: 2623 (1993)).

Важно также, чтобы антитела были гуманизированы с сохранением их высокой

45   аффинности связывания с антигеном, а также других полезных биологических свойств. Для достижения этой цели, согласно предпочтительному способу, гуманизированные антитела получают в соответствии со способом анализа последовательностей исходных антител и различных воображаемых гуманизированных продуктов с использованием



трехмерных моделей исходных и гуманизированных последовательностей. Трехмерные модели иммуноглобулинов обычно доступны, и они известны специалистам в данной области. Имеются компьютерные программы, которые иллюстрируют расположение возможных трехмерных конформационных структур выбранных иммуноглобулиновых последовательностей-кандидатов. Изучение таких дисплеев позволяет анализировать вероятную роль остатков в функционировании последовательностей иммуноглобулиновых последовательностей-кандидатов, то есть анализировать остатки, которые оказывают влияние на способность иммуноглобулина-кадидата связываться со своим антигеном. Таким образом можно выбрать остатки из FR и объединить рецепиентные и импортируемые последовательности, с тем, чтобы достичь получения антитела с желательными характеристическими свойствами, такими как повышенная аффинность в отношении антигена(ов)-мишени. Обычно именно остатки гипервариабельной области непосредственно и в первую очередь влияют на связывание с антигеном.

Гуманизированное антитело может быть фрагментом антитела, таким как Fab, который необязательно конъюгирован с одним или несколькими цитотоксическими средствами, с тем, чтобы получить иммуноконъюгат. Альтернативно гуманизированное антитело может быть полноразмерным антителом, таким как полноразмерное антитело IgG1.

#### *Человеческие антитела и методология фагового дисплея*

В качестве альтернативы гуманизации, могут быть получены человеческие антитела. Например, в настоящее время возможно продуцирование трансгенных животных (например, мышей), которые в результате иммунизации способны, в отсутствие эндогенной продукции иммуноглобулинов, производить полный репертуар человеческих антител. Например, описано, что гомозиготная делеция гена J-области ( $J_H$ ) тяжелой цепи антитела у химерных мышей и у мышей-мутантов зародышевой линии приводит к полному ингибированию эндогенной продукции антител. Перенос множества человеческих генов иммуноглобулина зародышевой линии таким мышам-мутантам зародышевой линии приведет при введении антигена к продуцированию человеческих антител. См., например, Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature*, 362: 255-258 (1993); Bruggemann et al., *Year in Immuno.*, 7:33 (1993); патенты США №№ 5545806, 5569825, 5591669 (все на имя GenPharm), 5545807; и WO 97/17852.

Альтернативно технология фагового дисплея (McCafferty et al., *Nature* 348: 552-553 [1990]) может быть использована для продуцирования человеческих антител и фрагментов антител *in vitro* из репертуара генов вариабельных (V) доменов иммуноглобулинов из неиммунизированных доноров. В соответствии с такой технологией, гены V-доменов антител клонируют внутри рамки считывания либо в основной, либо в минорный ген белка оболочки нитевидного бактериофага, такого как M13 или fd, и распределяют в качестве фрагментов функционального антитела на поверхности фаговой частицы. Поскольку нитевидная частица содержит копию одноцепочечной ДНК фагового генома, отбор на основе функциональных свойств антитела приводит также к селекции гена, кодирующего антитело, которое проявляет указанные свойства. Таким образом, фаг имитирует некоторые из свойств В-клетки. Фаговый дисплей может быть предпринят в различных форматах, рассматриваемых, например, в обзоре Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3: 564-571 (1993). Для фагового дисплея может быть использовано несколько источников сегментов V-гена. Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991) выделили другого

типа матрицу анти-оксазолоновых антител из малой произвольно выбранной комбинаторной библиотеки V-генов, полученных из селезенки иммунизированных мышей. Может быть создан репертуар V-генов из неиммунизированных людей-доноров, и могут быть выделены антитела против другого типа матрицы антигенов (включая собственные антигены), в основном согласно технологиям, описанным Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1991), или Griffith et al., *EMBO J.* 12: 725-734 (1993). См. также патенты США №№ 5565332 и 5573905.

Как описано выше, человеческие антитела могут быть получены также посредством активированных *in vitro* В-клеток (См. патенты США 5567610 и 5229275).

#### Фрагменты антител

В определенных обстоятельствах может оказаться более выгодным применение фрагментов антител, чем полноразмерных антител. Фрагменты меньшей длины способствуют более быстрому клиренсу и могут обеспечить лучший доступ к солидным опухолям.

Для получения фрагментов антител были разработаны различные технологии. Традиционно такие фрагменты получают посредством протеолитической обработки 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 теперь такие фрагменты могут быть получены непосредственно в рекомбинантных клетках-хозяевах. Можно добиться экспрессии и секреции Fab-, Fv- и ScFv-фрагментов антител из *E. coli*, что позволяет осуществить несложное продуцирование больших количеств таких фрагментов. Фрагменты антител могут быть выделены из обсуждаемых здесь фаговых библиотек антител. Альтернативно Fab'-SH-фрагменты могут быть непосредственно получены из *E. coli* и химически связаны, с образованием F(ab')<sub>2</sub>-фрагментов (Carter et al., *Bio/Technology* 10: 163-167 (1992)). Согласно другому подходу, F(ab')<sub>2</sub>-фрагменты могут быть выделены непосредственно из культуры рекомбинантных клеток-хозяев. Fab- и F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент с увеличенным временем полужизни *in vivo*, содержащий остатки связывания эпитопа с salvage-рецептором, описаны в патенте США № 5869046. Другие технологии для продуцирования фрагментов антител известны практикующим в данной области специалистам. В других воплощениях выбранным антителом является одноцепочечный Fv-фрагмент (scFv). См. WO 93/16185; патент США № 5571894; и патент США № 5587458. Только Fv и sFv являются фрагментами с интактными объединенными участками, которые лишены константных областей; таким образом, они подходят для редуцированного неспецифического связывания во время использования в системе *in vivo*. Белки слияния sFv могут быть сконструированы таким образом, чтобы полученный в результате эффекторный белок был слит либо с аминоконцом, либо с карбокси-концом sFv. См. *Antibody Engineering*, ed. Borrebaeck, выше. Фрагментом антитела может быть также "линейное антитело", например, как описано в патенте США 5641870. Такие линейные фрагменты антител могут быть моноспецифическими или биспецифическими.

#### Другие модификации аминокислотных последовательностей

Рассмотрена модификация (модификации) аминокислотной последовательности описанных здесь CD20-связывающих антител. Например, может потребоваться улучшение аффинности связывания и/или других биологических свойств антитела. Варианты аминокислотной последовательности анти-CD20-антитела получают путем введения соответствующих изменений нуклеотидов в нуклеиновую кислоту анти-CD20-антитела или путем пептидного синтеза. Такие модификации включают, например,

делеции и/или вставки, и/или замены остатков в аминокислотных последовательностях анти-CD20-антитела. Производят любую комбинацию делеции, вставки и замены для получения конечной конструкции, при условии, что указанная конечная конструкция обладает требуемыми характеристиками. Изменения аминокислот могут изменять также и посттрансляционные процессы анти-CD20-антитела, такие как изменение количества или положения участков гликозилирования.

Применяемый способ идентификации определенных остатков или областей анти-CD20-антитела, которые являются предпочтительными для мутагенеза местами локализации, называют “аланинсканирующим мутагенезом”, описанным Cunningham и Wells, *Science*, 244: 1081-1085 (1989). Здесь идентифицированы остаток или группа остатков-мишеней (например, заряженных остатков, таких как arg, asp, his, lys и glu) и заменены нейтральной или отрицательно заряженной аминокислотой (наиболее предпочтительно, аланином или полиаланином), с тем, чтобы воздействовать на взаимодействие указанных аминокислот с CD20-антигеном. Затем аминокислоты в тех положениях, которые обнаруживают функциональную чувствительность к указанным заменам, корректируют путем введения дополнительных аминокислот в непосредственной близости от таких положений или путем замены другими вариантами аминокислот в тех же самых положениях. Таким образом, хотя участок для внесения изменения в аминокислотную последовательность определен заранее, характер мутации как таковой необязательно должен быть предопределен. Например, для анализа характеристических свойств мутации в конкретном положении проводят аланинсканирующий или неспецифический мутагенез в кодоне-мишени или на участке-мишени, и экспрессируемые варианты анти-CD20-антител подвергают скринингу на предмет обнаружения требуемой активности.

Вставки аминокислотной последовательности включают аминокислотные и/или карбокси-концевые слияния, варьирующие по длине от одного остатка до полипептидов, содержащих сто или более остатков, а также вставки отдельных или множественных аминокислотных остатков внутри последовательности. Примеры концевых вставок включают анти-CD20-антитело с N-концевым метиониловым остатком или антитело, слитое с цитотоксическим полипептидом. Другие варианты вставок молекул анти-CD20-антитела включают слияние N-конца или C-конца анти-CD20-антитела с ферментом (например, с ADEPT) или с полипептидом, который увеличивает период полужизни указанного антитела в сыворотке.

Другим типом варианта является вариант аминокислотной замены. Такие варианты содержат замену по меньшей мере одного аминокислотного остатка в молекуле анти-CD20-антитела другим остатком. Участки, представляющие наибольший интерес для инсерционного мутагенеза, включают гипервариабельные участки, но рассматриваются также и изменения в области FR. Консервативные замены приведены ниже в таблице под заголовком «предпочтительные замены». Если такие замены приводят к изменениям в биологической активности, в таком случае можно вводить более существенные замены, называемые в таблице «типовыми заменами», и полученные продукты подвергать скринингу.

ТАБЛИЦА 2  
Аминокислотные замены

Исходный остаток	Типовые замены	Предпочтительные замены
Ala (A)	val; leu; ile	Val
Arg (R)	lys; gin; asn	Lys
Asn (N)	gln; his; asp, lys; arg	Gln
Asp (D)	glu; asn	Glu

Cys (C)	ser; ala	Ser
Gln (Q)	asn; glu	Asn
Glu (E)	asp; gln	Asp
Gly(G)	ala	Ala

5	His (H)	asn; gln; lys; arg	Arg
	Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; норлейцин	Leu
	Leu (L)	норлейцин; ile; val; met; ala; phe	Ile
	Lys (K)	arg; gln; asn	Arg
	Met (M)	leu; phe; ile	Leu
	Phe(F)	leu; val; ile; ala; tyr	Tyr
10	Pro (P)	ala	Ala
	Ser(S)	thr	Thr
	Thr (T)	ser	Ser
	Trp (W)	tyr; phe	Tyr
	Tyr(Y)	trp; phe; thr; ser	Phe
	Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; норлейцин	Leu

15 Существенные модификации в биологических свойствах антитела выполняют путем выбора замен, которые существенно отличаются их влиянием на поддержание (а) структуры полипептидного остова в области замены, например, складчатой или спиральной конформации, (b) заряда или гидрофобности молекулы на участке-мишени или (с) размера боковой цепи. Образующиеся природным образом остатки можно

20 разделить на группы на основе общих свойств их боковых цепей:

- (1) гидрофобные: норлейцин, met, ala, val, leu, ile;
- (2) нейтральные гидрофильные: cys, ser, thr;
- (3) кислотные: asp, glu;
- (4) основные: asn, gln, his, lys, arg;
- 25 (5) остатки, которые влияют на ориентацию цепи: gly, pro; и
- (6) ароматические: trp, tyr, phe.

Неконсервативные замены стимулируют замещение члена одного из указанных классов членом другого класса.

30 Любой остаток цистеина, не участвующий в поддержании правильной конформации анти-CD20-антитела, также может быть замещен, обычно серином, для улучшения окислительной стабильности молекулы и предотвращения aberrантного перекрестного сшивания. И наоборот, в молекулу антитела может быть добавлена цистеиновая связь (связи) для улучшения стабильности антитела (в частности, когда оно является

35 фрагментом антитела, таким как Fv-фрагмент).  
Особенно предпочтительный тип замещенного варианта включает в себя замену одного или нескольких остатков гипервариабельной области исходного антитела (например, гуманизированного или человеческого антитела). Обычно полученный вариант (варианты), выбранный для дальнейшей разработки, будет иметь улучшенные биологические свойства по сравнению с исходным антителом, из которого он был

40 получен. Удобный путь для создания таких содержащих замены вариантов включает созревание аффинности с использованием фагового диплея. Вкратце, несколько участков гипервариабельной области (например, 6-7 участков) подвергают мутагенезу для получения всех возможных аминокислотных замен на каждом участке. Полученные таким образом варианты антител отображают моновалентным образом из частиц

45 нитчатого фага в виде слияний с продуктом M13 гена III, упакованным внутри каждой частицы. Затем указанные проявляемые фагом варианты подвергают, как описано в настоящей заявке, скринингу на предмет определения их биологической активности (например, аффинности связывания). Для идентификации таких участков

гипервариабельной области, которые могут быть участками-кандидатами на модификацию, может быть предпринят аланинсканирующий мутагенез для идентификации остатков гипервариабельной области, вносящих значительный вклад в связывание антигена. Альтернативно или дополнительно, может быть полезен анализ кристаллической структуры комплекса антиген-антитело для идентификации точек контакта между антителом и человеческим CD20. Такие контактные остатки и соседствующие с ними остатки, в соответствии с разработанными здесь технологиями, являются кандидатами для замены. Сразу же после получения таких вариантов полученную панель вариантов подвергают, как здесь описано, скринингу, и антитела с наилучшими свойствами, проявленными в одном или нескольких релевантных анализах, могут быть отобраны для дальнейшей разработки.

Другой тип аминокислотного варианта антитела изменяет исходный характер гликозилирования антитела. Под изменением подразумевается делеция одного или нескольких углеводных фрагментов, обнаруживаемых в молекуле антитела, и/или добавление одного или нескольких участков гликозилирования, которых нет в указанном антителе.

Гликозилирование антител является обычно либо N-связанным, либо O-связанным. N-связанное гликозилирование относится к присоединению углеводного фрагмента к боковой цепи аспарагинового остатка. Трипептидные последовательности аспарагин-Х-серин и аспарагин-Х-треонин, где Х является любой аминокислотой, за исключением пролина, являются распознаваемыми последовательностями при ферментативном присоединении углеводного фрагмента к боковой цепи аспарагина. Таким образом, присутствие любой из указанных трипептидных последовательностей в полипептиде создает потенциальный участок гликозилирования. O-связанное гликозилирование относится к присоединению одного из сахаров, N-ацетилгалактозамина, галактозы или ксилозы, к гидроксикаминокислоте, наиболее часто к серину или треонину, хотя могут быть использованы также и 5-гидроксипролин или 5-гидроксилизин.

Добавление к антителу участков гликозилирования удобно осуществлять путем изменения аминокислотной последовательности таким образом, чтобы она содержала одну или несколько описанных выше трипептидных последовательностей (для N-связанных участков гликозилирования). Такое изменение может быть осуществлено также путем добавления или замены одного или нескольких остатков серина или треонина к последовательности исходного антитела (для O-связанных участков гликозилирования).

Молекулы нуклеиновых кислот, кодирующих аминокислотную последовательность вариантов анти-CD20-антитела, получают различными способами, известными в данной области. Такие способы включают, но не ограничены перечисленным, выделение из природного источника (в случае природным образом возникающих вариантов аминокислотных последовательностей) или получение путем олигонуклеотид-опосредованного (или сайт-направленного) мутагенеза, ПЦР-мутагенеза и кассетного мутагенеза ранее полученного варианта или невариантной версии анти-CD20-антитела.

Может потребоваться модификация антитела согласно изобретению в отношении эффекторной функции, например, такая, в результате которой повысится антиген-зависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (ADCC) и/или комплемент-зависимая цитотоксичность (CDC) антитела. Этого можно достичь путем введения одной или нескольких аминокислотных замен в Fc-область антитела. Альтернативно или дополнительно, в Fc-область может быть введен цистеиновый остаток (остатки), создавая таким образом возможность для образования в этой области межцепочечной

дисульфидной связи. Созданное таким образом гомодимерное антитело может иметь улучшенную способность к интернализации и/или повышенной комплемент-опосредованной киллерной активности и антитело-зависимой клеточной цитотоксичности (ADCC). См. Caron et al., *J. Exp Med.* 176: 1191-1195 (1992) и Shopes, B. *J. Immunol.* 148: 2918-2922 (1992). Гомодимерные антитела с повышенной противоопухолевой активностью также могут быть получены с помощью гетеробифункциональных кросс-линкеров, как описано у Wolff et al., *Cancer Research* 53: 2560-2565 (1993). Альтернативно может быть сконструировано антитело, которое имеет двойные Fc-области и может, таким образом, обеспечить повышенные комплемент-опосредованный лизис и способность к ADCC. См. Stevenson et al. *Anti-Cancer Drug Design* 3: 219-230 (1989).

#### Терапевтические применения

Описанные способы и композиции, включающие гуманизированные CD20-связывающие антитела 2H7 согласно изобретению, используются для лечения ряда злокачественных и незлокачественных заболеваний, включая CD20-положительные В-клеточные формы рака, такие как В-клеточные лимфомы и лейкомии, а также аутоиммунных заболеваний. Стволовые клетки (предшественники В-клеток) в костном мозге лишены антигена CD20, что позволяет здоровым В-клеткам после такой обработки регенерировать и в течение нескольких месяцев восстанавливать нормальный уровень.

CD20-положительными В-клеточными формами рака являются такие, при которых имеет место аномальная пролиферация CD20-положительных В-клеток, которые экспрессируют на своей поверхности антиген CD20. CD20-положительные В-клеточные неоплазмы включают CD20-положительную болезнь Ходжкина, включая лимфоцит-доминирующую болезнь Ходжкина (LPHD); неходжкинскую лимфому (НХЛ); лимфомы из клеток центра фолликула (FCC); острую лимфоцитарную лейкомию (ALL); хроническую лимфоцитарную лейкомию (ХЛЛ); волосатоклеточную лейкомию.

Используемый здесь термин "неходжкинская лимфома", или "НХЛ", относится к раку лимфатической системы, которая отлична от лимфом Ходжкина. Обычно лимфомы Ходжкина можно отличить от неходжкинских лимфом по наличию клеток Рид-Штернберга при лимфомах Ходжкина и отсутствию указанных клеток при неходжкинских лимфомах. Примеры неходжкинских лимфом, охватываемые используемым здесь термином, включают любую, которая была бы идентифицирована, как таковая, специалистом в данной области (например, онкологом или патоморфологом), в соответствии с классификационными схемами, известными в данной области, такими как схема REAL (Revised European-American Lymphoma), как описано в Цветовом Атласе по Клинической Гематологии (3-е издание), A. Victor Hoffbrand and John E. Pettit (eds.) (Harcourt Publishers Ltd., 2000). См., в частности, перечни на фиг. 11.57, 11.58 и 11.59. Более конкретные примеры включают, но не ограничены перечисленным, рецидивирующую или рефрактерную НХЛ, НХЛ фронтальной линии низкой степени, НХЛ стадии III/IV, устойчивую к химиотерапии НХЛ, лимфобластную лейкомию и/или лимфому из В-клеток-предшественников, лимфому из малых лимфоцитов (SL), В-клеточную хроническую лимфоцитарную лейкомию и/или пролимфоцитарную лейкомию и/или лимфому из малых лимфоцитов, В-клеточную пролимфоцитарную лимфому, иммуноцитому и/или лимфоплазмоцитарную лимфому, лимфоплазмоцитарную лимфому, В-клеточную лимфому маргинальной зоны, лимфому маргинальной зоны селезенки, внеузловую MALT-лимфому маргинальной зоны, узловую лимфому маргинальной зоны, волосатоклеточную лейкомию, плазмоцитому и/или миелому плазматических клеток, низкоуровневую/фолликулярную лимфому, промежуточной степени/

фолликулярную НХЛ, лимфому клеток мантийной ткани, лимфому из клеток центра фолликула (фолликулярную), промежуточной степени диффузную НХЛ, диффузную В-крупноклеточную лимфому, агрессивную НХЛ (включая агрессивную НХЛ фронтальной линии и агрессивную рецидивирующую НХЛ), НХЛ, рецидивирующую после или рефрактерную в отношении аутологичной трансплантации стволовых клеток, первичную медиастинальную В-крупноклеточную лимфому, первичную выпотную лимфому, иммунобластную НХЛ высокой степени, лимфобластную НХЛ высокой степени, НХЛ высокой степени из малых клеток с нерасщепленным ядром, массивное поражение при лимфогранулематозе, лимфому Беркитта, крупноклеточный лейкоз из клеток-предшественников (периферических) гранулярных лимфоцитов, фунгоидный микоз и/или синдром Сезари, кожные (накожные) лимфомы, анапластическую крупноклеточную лимфому, ангиоцентрическую лимфому.

В специфических воплощениях фармацевтические композиции, содержащие гуманизированные CD20-связывающие антитела и их функциональные фрагменты, используются для лечения неходжкинской лимфомы (НХЛ), лимфоцит-доминирующей болезни Ходжкина (LPHD), мелкоклеточной В-лимфоцитарной лимфомы (SLL) и хронической лимфоцитарной лейкемии (ХЛЛ), включая рецидивы указанных заболеваний.

Индолентная лимфома является медленно растущей лимфомой, неизлечимым заболеванием, при котором средний срок выживаемости пациентов составляет от шести до 10 лет после нескольких периодов ремиссии и рецидивов. В одном из воплощений гуманизированные CD20-связывающие антитела или их функциональные фрагменты используют для лечения НХЛ, включая рецидивирующую индолентную НХЛ и не поддающуюся лечению ритуксимабом индолентную НХЛ. Среди пациентов с рецидивирующей индолентной НХЛ могут быть пациенты, чувствительные к действию ритуксимаба, которые ранее прошли один курс лечения ритуксимабом и были чувствительными к его действию в течение >6 месяцев.

Представленные здесь гуманизированные антитела 2H7 или их функциональные фрагменты используются для лечения, осуществляемого единственным этим терапевтическим агентом (монотерапия), например, при рецидивирующей или рефрактерной, низкой степени или фолликулярной, CD20-положительной В-клеточной НХЛ, или же могут быть назначены пациентам в сочетании с другими лекарственными средствами в режиме мультитерапии.

Гуманизированные антитела 2H7 или их функциональные фрагменты согласно изобретению могут быть использованы в качестве терапии первой линии. Настоящее изобретение предполагает также применение указанных антител для лечения пациентов с CD20-положительными В-клеточными неоплазмами, которые не чувствительны к лечению или проявляют неадекватную реакцию на лечение любым каким-нибудь из следующих лекарственных средств: ритуксимаб (Genentech); ибритумомаб тиуксетан (Zevalin<sup>(TM)</sup>, Biogen Idec); тозитумомаб (Bexxar<sup>(TM)</sup>, GlaxoSmithKline); HuMAX-CD20<sup>(TM)</sup> (GenMab); IMMU-106 (которое является гуманизированным анти-CD20-антителом, известным также как hA20 или 90Y-hLL2, Immunomedics); AME-133 (Applied Molecular Evolution/Eli Lilly); гемтузумаб озогамицин (Mylotarg<sup>(TM)</sup>, гуманизированное анти-CD33-антитело, Wyeth/PDL); алемтузумаб (Campath<sup>(TM)</sup>, анти-CD52-антитело, Schering Plough/Genzyme); эпратузумаб (IMMU-103<sup>(TM)</sup>, гуманизированное анти-CD22-антитело, Immunomedics), или же тех пациентов, у которых возникают рецидивы после лечения указанными лекарственными средствами.

Кроме того, в настоящем изобретении предложен способ лечения пациентов с ХЛЛ, включая тех, для которых неэффективна терапия флударабином, гуманизированными антителами 2H7 согласно изобретению.

Здесь под "аутоиммунным заболеванием" подразумевается заболевание или расстройство, возникающее в собственных тканях индивидуума и направленное против них, или их косегрегация или манифестация, или возникающее в результате этого состояние. Примеры аутоиммунных заболеваний или расстройств включают, но не ограничиваются перечисленным, артрит (ревматоидный артрит, такой как острый артрит, хронический ревматоидный артрит, подагрический артрит, острый подагрический артрит, хронический воспалительный артрит, дегенеративный артрит, инфекционный артрит, артрит Лайма, пролиферативный артрит, псориатический артрит, вертебральный артрит и ювенильный ревматоидный артрит, остеоартрит, прогрессивный хронический артрит, деформирующий артрит, первичный хронический полиартрит, реактивный артрит и анкилозирующий спондилит), воспалительные гиперпролиферативные заболевания кожи, псориаз, такой как пятнистый псориаз, каплевидный псориаз, пустулезный псориаз и псориаз ногтей, атопию, включая такие атопические заболевания, как сенная лихорадка, синдром Джоба, дерматит, включая контактный дерматит, хронический контактный дерматит, аллергический дерматит, аллергический контактный дерматит, герпетический дерматит и атопический дерматит, X-сцепленный гипер-IgM-синдром, крапивницу, такую как хроническая аллергическая крапивница и хроническая идиопатическая крапивница, включая хроническую аутоиммунную крапивницу, полимиозит/дерматомиозит, ювенильный дерматомиозит, токсический эпидермальный некролиз, склеродермию (включая системную склеродермию), склероз, такой как системный склероз, множественный (рассеянный) склероз (MS), такой как спинально-оптический рассеянный склероз, первично-прогрессирующий рассеянный склероз (PPMS) и возвратно-ремиттирующий рассеянный склероз (RRMS), прогрессирующий системный склероз, атеросклероз, артериосклероз, диссеминирующий склероз и атаксический склероз, воспалительное заболевание кишечника (IBD) (например, болезнь Крона, опосредованные аутоиммунным процессом желудочно-кишечные заболевания, колит, такой как язвенный колит, микроскопический колит, коллагенозный колит, полипозный колит, некротизирующий энтероколит и трансмуральный колит, и аутоиммунное воспалительное заболевание кишечника), гангренозную пиодермию, узловатую эритему, первичный склерозирующий холангит, эписклерит), респираторный дистресс-синдром, включая респираторный дистресс-синдром взрослых или острый респираторный дистресс-синдром (ARDS), менингит, полное или частичное воспаление сосудистой оболочки глаза, воспаление радужной оболочки, хороидит, аутоиммунное гематологическое расстройство, ревматоидный спондилит, внезапная потеря слуха, IgE-опосредованные заболевания, такие как анафилаксия и аллергический и атопический ринит, энцефалит, такой как энцефалит Расмуссена и лимбический энцефалит и/или энцефалит ствола мозга, увеит, такой как передний увеит, острый передний увеит, гранулематозный увеит, негранулематозный увеит, факоантигенный увеит, задний увеит или аутоиммунный увеит, гломерулонефрит (GN) с нефротическим синдромом или без него, такой как хронический или острый гломерулонефрит, такой как первичный GN, иммуно-опосредованный GN, мембранозный GN (мембранозная нефропатия), идиопатический мембранозный GN или идиопатическая мембранозная нефропатия, мембрано- или мембранозный пролиферативный GN (MPGN), включая тип I и тип II, и быстро прогрессирующий GN, аллергические состояния и реакции, аллергическую



реакцию, экзему, включая аллергическую или атопическую экзему, астму, такую как бронхиальная астма, астма бронхиальная и аутоиммунная астма, состояния, включая Т-клеточную инфильтрацию и хронические воспалительные реакции, иммунные реакции против чужеродных антигенов, таких как эмбриональные группы крови А-В-О в

5 процессе беременности, хроническое пульмональное воспалительное заболевание, аутоиммунный миокардит, нарушение адгезии лейкоцитов, системную красную волчанку (СКВ) или системную эритематозную волчанку, такую как кожная СКВ, подострая кожная красная волчанка, неонатальный волчаночный синдром (NLE), диссеминирующая красная волчанка, волчанка (включая нефрит, церебрит,

10 педиатрическую, непочечную, экстраренальную, дискоидную алопецию), ювенильный сахарный диабет (I типа), включая педиатрический инсулино-зависимый сахарный диабет (IDDM), сахарный диабет зрелого возраста (диабет II типа), аутоиммунный диабет, идиопатический несахарный диабет, иммунные ответы, ассоциированные с острой гиперчувствительностью и гиперчувствительностью замедленного типа,

15 опосредованные цитокинами и Т-лимфоцитами, туберкулез, саркоидоз, гранулематоз, включая лимфоматоидный гранулематоз, гранулематоз Вегенера, агранулоцитоз, васкулиты, включая васкулит (включая васкулит крупных кровеносных сосудов (включая ревматическую полимиалгию и гигантоклеточный артериит (артериит Такаэсу)), васкулит средних кровеносных сосудов (включая болезнь Кавасаки и

20 узелковый полиартериит/узелковый периартериит), микроскопический полиартериит, васкулит ЦНС, некротизирующий, кожный или гиперчувствительный васкулит, системный некротизирующий васкулит и ANCA-ассоциированный васкулит, такой как васкулит или синдром Черга-Страусса (CSS)), темпоральный артериит, апластическую анемию, аутоиммунную апластическую анемию, положительную анемию Кумбса,

25 анемию Даймонда-Блекфена, гемолитическую анемию или иммунную гемолитическую анемию, включая аутоиммунную гемолитическую анемию (АИНА) пернициозную анемию (anemia perniciousa), болезнь Аддисона, истинную эритроцитарную анемию или аплазию (PRCA), дефицит фактора VIII, гемофилию А, аутоиммунную нейтропению, панцитопению, лейкопению, заболевания, включающие лейкоцитарный диapedез,

30 воспалительные расстройства ЦНС, синдром множественного поражения органов, например, на фоне септицемии, травмы или геморрагии, заболевания, опосредованные комплексом антиген-антитело, болезнь антител против клубочковой базальной мембраны, болезнь антител против клубочковой базальной мембраны, антифосфолипидный синдром, аллергический неврит, болезнь Бехета или Бехчета,

35 синдром Кастлемана, синдром Гудпасчера, синдрома Рейно, синдрома Шегрена, синдром Стивенса-Джонсона, пемфигоид, такой как буллезный пемфигоид и кожный пемфигоид, пузырчатку (включая обыкновенную пузырчатку, эксфолиативную пузырчатку, пемфигоид слизистых оболочек и эритематозную пузырчатку), аутоиммунные полиэндокринопатии, болезнь или синдром Рейтера, волчаночный

40 нефрит, опосредованный антителами нефрит, оптиконевромиелит, полиневропатии, хроническую невропатию, такую как IgM-полиневропатии или IgM-опосредованная невропатия, тромбоцитопению (например, развивающуюся у пациентов с инфарктом миокарда), включая тромботическую тромбоцитопеническую пурпуру (ТТР), посттрансфузионную пурпуру (РТР), индуцированную гепарином тромбоцитопению

45 и аутоиммунную или иммуно-опосредованную тромбоцитопению, такую как идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура (ИТР), включая хроническую или острую ИТР, аутоиммунное заболевание яичек и яичников, включая аутоиммунный орхит и оофорит, первичный гипотиреоз гипопаратиреоз, аутоиммунные эндокринные

заболевания, включая тиреоидит, такой как аутоиммунный тиреоидит, болезнь Хашимото, хронический тиреоидит (тиреоидит Хашимото) или подострый тиреоидит, аутоиммунное заболевание щитовидной железы, идиопатический гипотиреоз, диффузный токсический зоб, полигландулярные синдромы, такие как аутоиммунные

5 полигландулярные синдромы (или полигландулярные эндокринопатические синдромы), паранеопластические синдромы, включая неврологические паранеопластические синдромы, такие как миастенический синдром Ламберта-Итона или синдром Ламберта-Итона, синдром скованного человека или синдром мышечной скованности, энцефаломиелит, такой как аллергический энцефаломиелит, или *encephalomyelitis allergica*,

10 и экспериментальный аллергический энцефаломиелит (ЕАЕ), миастению гравис, такую как ассоциированную с тимомой миастению гравис, мозжечковую дегенерацию, нейромиотомию, опсиклонус-синдром или опсиклонус-миоклонус-синдром (OMS), и сенсорную невропатию, многоочаговую двигательную невропатию, синдром Шихана, аутоиммунный гепатит, хронический гепатит, волчаночный гепатит, гигантоклеточный

15 гепатит, хронический активный гепатит или аутоиммунный хронический активный гепатит, лимфоидный интерстициальный пневмонит (LIP), облитерирующий бронхиолит (не посттрансплантационный), в отличие от NSIP, синдром Гийена-Барре, болезнь Бергера (IgA-нефропатия), идиопатическую IgA-нефропатию, линейный IgA-зависимый дерматоз, первичный билиарный цирроз, пневмоцирроз, аутоиммунный

20 энтеропатический синдром, глютенчувствительную целиакию, целиакию, целиакию-спру (глютенная энтеропатия), рефрактерные трофические афты, идиопатические афты, криоглобулинемию, амиотрофический латеральный склероз (ALS; болезнь Лимфатический узел Герига), болезнь коронарных артерий, ушное аутоиммунное заболевание, такое как аутоиммунное заболевание внутреннего уха (AIED),

25 аутоиммунное ухудшение слуха, опсиклонус-миоклонус-синдром (OMS), полихондрию, такую как рефрактерная или рецидивирующая полихондрия, легочно-альвеолярный протеиноз, амилоидоз, склерит, незлокачественный лимфоцитоз, первичный лимфоцитоз, который включает моноклональный В-клеточный лимфоцитоз (например, доброкачественная моноклональная гаммопатия и моноклональная гаммопатия

30 неопределенного генеза, MGUS), периферическую невропатию, паранеопластический синдром, каналопатии, такие как эпилепсия, мигрень, аритмия, мышечные расстройства, глухота, слепота, пароксизмальный паралич, и каналопатии ЦНС, аутизм, воспалительную миопатию, фокальный сегментарный гломерулосклероз (FSGS), эндокринную офтальмопатию, увеоретинит, хориоретинит, аутоиммунное расстройство

35 печени, фибромиалгию, множественную эндокринную недостаточность, синдром Шмидта, адреналит, атрофию желудка, пресенильную деменцию, демиелинизирующие заболевания, такие как аутоиммунные демиелинизирующие заболевания и хроническая воспалительная демиелинизирующая полиневропатия, диабетическую нефропатию, синдром Дресслера, гнездную алопецию, CREST-синдром (кальциноз, феномен Рейно,

40 нарушение моторики пищевода, склеродактилия и телангиэктазия), мужское и женское аутоиммунное бесплодие, смешанное поражение соединительной ткани, болезнь Чагаса, ревматическую атаку, привычный выкидыш, легкое фермера, полиморфную эритему, посткардиотомный синдром, синдром Кушинга, легочную аллергию птицеводов, аллергический гранулематозный ангиит, доброкачественный лимфоцитарный ангиит,

45 синдром Альпорта, альвеолит, такой как аллергический альвеолит и фиброзирующий альвеолит, интерстициальное заболевание легких, трансфузионную реакцию, лепру, малярию, лейшманиоз, кипаносомоз, шистосомоз, аскаридоз, аспергиллез, синдром Самптера, синдром Каплана, лихорадка денге, эндокардит, эндомиокардиальный

фиброз, диффузный интерстициальный легочный фиброз, интерстициальный фиброз  
 легких, легочный фиброз, идиопатический легочный фиброз, кистозный фиброз,  
 эндофтальмит, erythema elevatum et diutinum, гемолитическую болезнь новорожденных,  
 эозинофильный фациит, синдром Шулмана, синдром Фелти, flariasis, циклит, такой  
 5 как хронический циклит, гетерохронический циклит, иридоциклит (острый или  
 хронический), или Fuch's cyclitis, болезнь Шенлейн-Геноха, инфекцию вируса  
 иммунодефицита человека (ВИЧ), инфекцию ЕСНО-вируса, кардиомиопатию, болезнь  
 Альцгеймера, инфекцию парвовируса, инфекцию вируса краснухи, поствакцинационный  
 10 синдром, врожденную инфекцию краснухи, инфекцию вируса Эпштейна-Барр, свинку,  
 синдром Эвана, аутоиммунную недостаточность гонад, хорею Сиденгама,  
 постстрептококковый нефрит, thromboangitis obliterans, тиреотоксикоз, сухотку спинного  
 мозга, хориоидит, гигантоклеточную полимиалгию, эндокринную офтальмопатию,  
 хронический гиперчувствительный пневмонит, кератоконъюнктивит sicca, эпидемический  
 15 кератоконъюнктивит, синдром идиопатического нефрита, нефропатию с минимальными  
 изменениями, доброкачественное семейное и ишемически-реперфузионное повреждение,  
 аутоиммунное заболевание сетчатки, воспаление сустава, бронхит, хроническое  
 обструктивное заболевание дыхательных путей, силикоз, афту, афтозный стоматит,  
 артериосклеротические расстройства, аспермиогенез, аутоиммунный гемолиз, болезнь  
 Бека, криоглобулинемию, контрактуру Дюпюитрена, факоанафилактический  
 20 эндофтальмит, аллергический энтерит, лепроматозную узелковую эритему,  
 идиопатический лицевой паралич, синдром хронической усталости, ревматизм (febris  
 rheumatica), синдром Хамман-Рича, сенсоневральную потерю слуха, пароксизмальную  
 гемоглобинурию, гипогонадизм, регионарный илеит, лейкопению, инфекционный  
 мононуклеоз, поперечный миелит, первичную идиопатическую микседему, нефроз,  
 25 симптоматическое воспаление глаз, гранулематозный орхит, панкреатит, острый  
 полирадикулоневрит, гангренозную пиодермию, тиреоидит Кервена, приобретенную  
 атрофию селезенки, мужское аутоиммунное бесплодие, незлокачественную тимому,  
 витилиго, тяжелый комбинированный иммунодефицит и заболевания, ассоциированные  
 с вирусом Эпштейна-Барр, синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД),  
 30 паразитарные заболевания, такие как лейшмания, синдром токсического шока, пищевое  
 отравление, состояния, при которых имеет место инфильтрация Т-клеток, дефицит  
 адгезии лейкоцитов, иммунный ответ, ассоциированный с острым  
 гиперчувствительностью и с гиперчувствительностью замедленного типа,  
 опосредованной цитокинами и Т-лимфоцитами, заболевания, при которых имеет место  
 35 диапедез лейкоцитов, синдром множественного повреждения органов, заболевания,  
 опосредованные комплексами антиген-антитело, болезнь антител против базальной  
 мембраны гломерул, аллергический неврит, аутоиммунные полиэндокринопатии,  
 оофорит, первичную микседему, аутоиммунный атрофический гастрит, симпатическую  
 офтальмию, ревматические заболевания, смешанное заболевание соединительной ткани,  
 40 нефротический синдром, инсулит, полиэндокринную недостаточность, периферическую  
 нейропатию, аутоиммунный полигландулярный синдром I типа, идиопатический  
 гипопаратиреоз у взрослых (АОИ), тотальную алопецию, дилатационную  
 кардиомиопатию, приобретенный буллезный эпидермолиз (ЕВА), гемохроматоз,  
 миокардит, нефротический синдром, первичный склерозирующий холангит, гнойный  
 45 или негнойный синусит, острый или хронический синусит, решетчатый, фронтальный,  
 максиллярный или сфеноидальный синусит, расстройство, связанное с эозинофилами,  
 такое как эозинофилия, эозинофильный инфильтрат легкого, синдром эозинофилии-  
 миалгии, синдром Леффлера, хроническую эозинофильную пневмонию, легочную

тропическую эозинофилию, бронхопневмонический аспергиллез, аспергиллому или гранулемы, содержащие эозинофилы, анафилаксию, серонегативную спондилоартропатию, полиэндокринное аутоиммунное заболевание, склерозирующий холангит, склерит, эписклерит, хронический кандидоз, поражающий кожу и слизистые оболочки, синдром Брутона, транзиторную гипогаммаглобулинемию новорожденных, синдром Вискотта-Олдрича, атаксию-телеангиэктазию, аутоиммунные расстройства, ассоциированные с коллагеновой болезнью, ревматизм, неврологическое заболевание, лимфаденит, ишемически-реперфузионное расстройство, снижение реакции кровяного давления, сосудистую дисфункцию, ангиэктазию, повреждение ткани, сердечно-сосудистую ишемию, гиперальгезию, ишемию головного мозга и болезнь, сопровождаемую васкуляризацией, расстройства, связанные с аллергическими реакциями, гломерулонефриты, реперфузионное повреждение, реперфузионное повреждение миокарда или других тканей, дерматозы с острым воспалительным компонентом, острый гнойный менингит или другие воспалительные заболевания центральной нервной системы, воспалительные заболевания глаза и глазницы, синдромы, ассоциированные с трансфузией гранулоцитов, индуцированную цитокинами токсичность, опасное острое заболевание, хроническое трудноизлечимое заболевание, пиелит, цирроз легкого, диабетическую ретинопатию, диабетическое нарушение крупных артерий, внутриартериальную гиперплазию, пептическую язву, вальвулит и эндометриоз.

В специфических воплощениях фармацевтические композиции, содержащие гуманизированные антитела 2H7 и их функциональные фрагменты, используют для лечения ревматоидного артрита и ювенильного ревматоидного артрита, системной красной волчанки (СКВ), включая волчаночный нефрит, гранулематоза Вегенера, воспалительного заболевания кишечника, язвенного колита, идиопатической тромбоцитопенической пурпуры (ИТП), тромботической тромбоцитопенической пурпуры (ТТП), аутоиммунной тромбоцитопении, рассеянного склероза, включая возвратно-ремиттирующий множественный склероз, псориаза, IgA-нефропатии, IgM-полиневропатий, миастении гравис, ANCA-ассоциированного васкулита, сахарного диабета, синдрома Рейно, синдрома Шегрена, оптиконевромиелита (NMO) и гломерулонефрита.

"Лечение" или "обработка", или "облегчение" относятся к терапевтической обработке, при которой у субъекта замедляется (ослабляется), если не вылечивается, намеченное патологическое состояние или расстройство или предотвращается рецидив такого состояния. Считается, что субъекта успешно "лечили" от аутоиммунного заболевания или от CD20-положительной В-клеточной неоплазии, если после получения терапевтического количества гуманизированного CD20-связывающего антитела согласно изобретению в соответствии со способами согласно изобретению у указанного субъекта обнаруживается наблюдаемое и/или измеримое уменьшение или исчезновение одного или нескольких признаков и симптомов конкретного заболевания. Например, в случае рака, это значительное снижение количества раковых клеток или отсутствие раковых клеток; уменьшение размера опухоли; ингибирование (то есть замедление до некоторой степени, а преимущественно, остановка) метастазирования опухоли; ингибирование до некоторой степени опухолевого роста; удлинение продолжительности ремиссии, замедление темпов прогрессирования заболевания и/или облегчение до некоторой степени одного или нескольких симптомов, ассоциированных с конкретным раком; снижение заболеваемости и смертности, а также обеспечение улучшения качества жизни. Улучшение признаков и симптомов заболевания может также быть отмечено самим пациентом. При лечении может быть достигнут полноценный ответ, определяемый

исчезновением всех признаков рака, или частичный ответ, при котором уменьшается размер опухоли, предпочтительно более чем на 50 процентов, более предпочтительно на 75%. Пациент также считается перенесшим успешное лечение, если в результате удается стабилизировать заболевание. По одному из критериев, с помощью антитела h2N7 согласно изобретению достигается более чем 95% истощение В-клеток периферической крови, и уровень В-клеток возвращается к количеству, составляющему до 25% базового уровня. В предпочтительных воплощениях лечение указанными антителами согласно изобретению эффективно в плане достижения у пациентов с раком отсутствия прогрессии раковой опухоли в течение 4 месяцев после лечения,

предпочтительно в течение 6 месяцев, более предпочтительно в течение одного года, и даже более предпочтительно в течение 2 или более лет после лечения. Указанные параметры, отражающие успешность лечения и улучшение статуса заболевания, нетрудно определить с помощью обычно применяемых процедур, известных практикующим врачам, имеющим соответствующую квалификацию в данной области.

«Терапевтически эффективное количество» относится к количеству антитела или лекарственного средства, эффективному для «лечения» заболевания или нарушения у субъекта. В случае рака терапевтически эффективное количество лекарственного средства может снизить количество раковых клеток; уменьшить размеры опухоли; подавить (то есть замедлить до некоторой степени, а предпочтительно остановить) метастазирование опухоли; ингибировать до некоторой степени рост опухоли; и/или ослабить до некоторой степени один или несколько симптомов, ассоциированных с раком. См. предшествующее определение «лечения». В случае аутоиммунного заболевания терапевтически эффективное количество антитела или другого лекарственного средства является эффективным для уменьшения признаков и симптомов заболевания.

Параметры для оценки эффективности или успешности лечения неоплазмы известны практикующим врачам-специалистам по соответствующим заболеваниям. Обычно врач-специалист будет пытаться обнаружить уменьшение признаков и симптомов специфического заболевания. Параметры могут включать средний временной период прогрессии заболевания, временной период в состоянии ремиссии, в стадии заболевания.

В следующих ссылках приведено описание лимфом и ХЛЛ, их диагностики, лечения и стандартных медицинских манипуляций для определения эффективности лечения. Canellos G. P., Lister, T. A., Sklar J. L.: *The Lymphomas*. W.B.Saunders Company, Philadelphia, 1998; van Besien K. and Cabanillas, F.: *Clinical Manifestations, Staging and Treatment of Non-Hodgkin's Lymphoma*, Chap. 70, pp 1293-1338, in: *Hematology, Basic Principles and Practice*, 3rd ed. Hoffman et al. (editors). Churchill Livingstone, Philadelphia, 2000; и Rai, K. and Patel, D.: *Chronic Lymphocytic Leukemia*, Chap. 72, pp 1350-1362, in: *Hematology, Basic Principles and Practice*, 3rd ed. Hoffman et al. (editors). Churchill Livingstone, Philadelphia, 2000.

Параметры для оценки эффективности или успешности лечения аутоиммунного заболевания или связанного с аутоиммунными реакциями заболевания хорошо знакомы практикующим врачам-специалистам по лечению соответствующих заболеваний. Обычно врач-специалист будет пытаться обнаружить уменьшение признаков и симптомов специфического заболевания. Последующий материал приведен в качестве примеров.

В одном из воплощений фармацевтические композиции, содержащие гуманизированные антитела 2H7, используются для лечения ревматоидного артрита.

РА является изнурительным аутоиммунным заболеванием, которое поражает более двух миллионов американцев и мешает повседневной деятельности страдающих им

пациентов. РА возникает, когда собственная иммунная система организма неадекватным образом атакует суставную ткань и вызывает хроническое воспаление, которое разрушает здоровую ткань и повреждает суставы изнутри. Симптомы включают воспаление суставов, их распухание, тугоподвижность и боль. Кроме того, поскольку ревматоидный артрит является системным заболеванием, он может оказывать влияние и на другие ткани, такие как легкие, глаза и костный мозг. Заболевание это неизлечимо. Способы лечения включают применение различных стероидных и нестероидных противовоспалительных лекарственных средств, иммуносупрессивных агентов, базовых противоревматических лекарственных средств, модифицирующих течение болезни (DMARD), и биопрепаратов. Однако у многих пациентов продолжают проявляться неадекватные реакции на лечение.

Антитела могут быть использованы в качестве терапии первой линии у пациентов с ранним РА (то есть не подвергавшимся лечению метотрексатом (MTX)) и в качестве монотерапии или в сочетании, например, с MTX или циклофосфамидом, или в качестве сопроводительного лечения. Или же указанные антитела могут быть использованы в качестве терапии второй линии у пациентов, не восприимчивых к лечению препаратами DMARD и/или MTX, и в качестве монотерапии или в сочетании, например, с MTX.

Гуманизированные CD20-связывающие антитела применимы для предотвращения и контролирования процесса поражения суставов, для отсрочивания структурных нарушений, снижения боли, ассоциированной с воспалением при РА, и они обычно уменьшают признаки и симптомы ревматоидного артрита, при его формах от умеренной до тяжелой. Пациента с РА можно лечить гуманизированным анти-CD20-антителом до, после или одновременно с лечением другими лекарственными средствами, используемыми при лечении РА (см. комбинированную терапию, ниже). В одном из воплощений пациентов, которым прежде не помогали базовые противоревматические лекарственные средства, модифицирующие течение болезни, и/или у которых наблюдалась неадекватная реакция на индивидуальное введение метотрексата, лечат гуманизированным CD20-связывающим антителом согласно изобретению. В одном из воплощений такого лечения пациентов подвергают 17-дневному режиму лечения, при котором им вводят индивидуально гуманизированное CD20-связывающее антитело (в/в инфузии Ig в дни 1 и 15); CD20-связывающее антитело плюс циклофосфамид (в/в инфузии по 750 мг в дни 3 и 17); или CD20-связывающее антитело плюс метотрексат.

Поскольку в организме в процессе РА продуцируется фактор некроза опухоли альфа (TNF $\alpha$ ), для лечения данного заболевания используются ингибиторы TNF $\alpha$ . Однако ингибиторы TNF $\alpha$ , такие как этанерцепт (ENBREL®), инфликсимаб (REMICADE®) и адалимумаб (HUMIRA<sup>TM</sup>), могут вызывать отрицательные побочные эффекты, такие как инфекция, сердечная недостаточность и демиелинизация. Следовательно, в одном из воплощений гуманизированные CD20-связывающие антитела или их биологически функциональные фрагменты используют, например, в качестве терапии первой линии для лечения пациентов с РА для снижения риска таких отрицательных побочных эффектов, вызываемых лекарственными средствами, ингибирующими TNF $\alpha$ , или для лечения пациентов, которые считаются, в соответствии с их прежним опытом, склонными к развитию токсичности, например, кардиотоксичности. Гуманизированные CD20-связывающие антитела или их биологически функциональные фрагменты используют также в способе лечения субъекта, страдающего от РА, который уже принимал лечение ингибитором TNF $\alpha$ , но оказался нечувствительным к такому воздействию, проявлял неадекватную реакцию на воздействие ингибитором TNF $\alpha$  (пациенты TNF-IR), или у которого имел место рецидив болезни через некоторое время в процессе ответа, или

же такого, которого относят к числу тех, для которых вероятность ответа на лечение под действием ингибитора TNF $\alpha$  маловероятно. В одном из воплощений пациентов TNF-IR предварительно, до начала лечения ингибитором TNF $\alpha$ , лечат малыми дозами, такими как дозы ниже 100 мг.

5 Один из способов оценки эффективности лечения при РА основан на критериях Американской коллегии ревматологии (ACR), согласно которым, помимо прочего, оценивают процент улучшения в плане болезненности и отечности суставов. Пациентов с РА можно оценивать, например, в соответствии с критерием ACR-20 (20-процентное улучшение) по сравнению с нелеченными антителом пациентами (например, с базовым  
10 уровнем перед лечением) или по сравнению с нелеченными плацебо. Другие пути оценки эффективности лечения антителом включают рентгенографическую оценку, такую как рентгенографическая оценка по Шарпу, используемая для оценки структурных повреждений, таких как эрозия кости и сужение суставной щели. Пациентов можно также оценивать по предотвращению или улучшению состояния нетрудоспособности  
15 на основе анкеты по оценке состояния здоровья [HAQ], по шкале AIMS, SF-36 в периоды в процессе или после лечения. Критерий ACR-20 может включать 20%-ое улучшение как в отношении количественной оценки смягчения боли (болезненности) сустава, так и в отношении по меньшей мере 3 из 5 дополнительных критериев:

1. оценка боли у пациента по визуальной аналоговой шкале (VAS, visual analog scale),
- 20 2. глобальная оценка активности заболевания у пациента (VAS),
3. глобальная оценка активности заболевания лечащим врачом (VAS),
4. собственная оценка пациента нетрудоспособности, определяемой согласно анкете по оценке состояния здоровья (HAQ), и
5. реактанты острой фазы, CRP или ESR.

25 ACR-50 и ACR-70 определяются аналогичным образом. Предпочтительно, чтобы пациенту вводили количество CD20-связывающего антитела по изобретению, эффективное для достижения оценок по меньшей мере по шкале ACR-20, предпочтительно по меньшей мере по шкале ACR-30, более предпочтительно по меньшей мере по шкале ACR-50, и даже еще более предпочтительно по меньшей мере по шкале  
30 ACR-70, а наиболее предпочтительно по меньшей мере по шкале ACR-75 и выше.

Псориатический артрит имеет уникальные и отличительные радиографические признаки. В случае псориатического артрита эрозия суставов и сужение суставной щели могут быть также оценены по шкале Шарпа. Гуманизированные CD20-связывающие антитела согласно изобретению могут быть использованы для предотвращения  
35 повреждения суставов, а также для уменьшения признаков заболевания и симптомов расстройства.

Еще одним аспектом настоящего изобретения является способ лечения СКВ или волчаночного нефрита путем введения субъекту, страдающему от указанного расстройства, фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное  
40 количество гуманизированного CD20-связывающего антитела согласно изобретению. Оценочные шкалы SLEDAI обеспечивают возможность количественного определения активности заболевания. Шкала SLEDAI представляет собой взвешенный индекс 24 клинических и лабораторных параметров, известных для установления корреляции с активностью заболевания, в числовом интервале от 0 до 103. См. Bryan Gescuk & John  
45 Davis, "Novel therapeutic agent for systemic lupus erythematosus" in *Current Opinion in Rheumatology* 2002, 14: 515-521. Другие методы оценки включают BILAG-оценку. Считается, что антитела к двухцепочечной ДНК вызывают воспалительную гиперемию почек и другие проявления волчанки. В отношении пациентов, подвергающихся лечению

антителом, может быть осуществлен мониторинг на время воспалительной гиперемии почек, которая определяется как значительное, воспроизводимое повышение уровня креатинина в сыворотке, белка в моче или крови в моче. Альтернативно или дополнительно, может быть осуществлен мониторинг пациентов на предмет определения

5 уровней антинуклеарных антител и антител против двухцепочечной ДНК. Лечение СКВ включает применение высоких доз кортикостероидов и/или циклофосфамида (HDCC). Здесь успешное лечение волчанки должно будет снижать воспалительную гиперемию, то есть уменьшать степень тяжести и/или временной интервал до следующего проявления воспалительной гиперемии.

10 Спондилоартриты представляют собой группу расстройств суставов, включая анкилозирующий спондилит, псориатический артрит и болезнь Крона. Успешность лечения может быть определена согласно утверждению пациента и глобальной оценке лечащего врача с использованием измерительных приборов.

Что касается васкулита, приблизительно у 75% пациентов с системными васкулитами

15 определяются антитела против цитоплазмы нейтрофилов, и такие пациенты группируются в одно из трех состояний, поражающих сосуды малого/среднего размера: гранулематоз Вегенера (WG), микроскопический полиангиит (МРА) и синдром Черджа-Стросс (CSS), объединяемых под названием ANCA-ассоциированного васкулита (AAV).

Эффективность лечения псориаза устанавливали путем мониторинга изменений в

20 клинических признаках и симптомах данного заболевания, включая изменения в глобальной оценке лечащего врача (PGA) и площади распространения псориаза, а также по индексу площади и тяжести псориаза (PASI), оценке симптомов псориаза (PSA, Psoriasis Symptom Assessment) по сравнению с исходным состоянием. Пациентов с псориазом, которых лечат гуманизированным CD20-связывающим антителом согласно

25 изобретению, таким как hu2H7.v511, можно периодически в процессе лечения подвергать количественной оценке в соответствии с визуальной аналоговой шкалой, используемой для определения степени зуда, испытываемого в конкретные моменты времени.

Пациенты могут испытывать реакцию на инфузию или связанные с инфузией симптомы при первом вливании им терапевтического антитела. Таким симптомами

30 варьируют по степени тяжести и обычно бывают обратимыми при медицинском вмешательстве. Таким симптомами включают, но не ограничиваются перечисленным, характерную для гриппозного состояния лихорадку, озноб/дрожь, тошноту, аллергическую сыпь, головную боль, бронхоспазм, ангионевротический отек. Было бы желательно в отношении способов лечения данного заболевания способами согласно

35 изобретению, чтобы такие реакции на инфузию были минимизированы. Для облегчения или минимизации таких побочных эффектов пациенты могут получать первоначальную адаптивную дозу или вызывающую толерантность дозу (дозы) антитела, с последующей терапевтически эффективной дозой. Адаптивная доза (дозы) будут ниже, чем терапевтически эффективная доза, чтобы подготовить пациента к тому, чтобы он

40 перенес более высокие дозировки.

### ***Введение дозировок***

В зависимости от показаний к лечению и факторов, относящихся к введению дозировок, хорошо известных лечащему врачу, антитела согласно изобретению будут

45 вводиться в дозировках, которые будут эффективны для лечения при указанных показаниях, при этом с минимизацией токсичности и побочных эффектов. Требуемая дозировка может зависеть от конкретного заболевания и тяжести заболевания, от стадии заболевания, уровня требуемой модуляции В-клеток, а также от других факторов, известных врачам-специалистам в данной области.



Для лечения аутоиммунного заболевания может возникнуть необходимость модуляции степени истощения В-клеток, в зависимости от конкретного заболевания и/или от тяжести состояния индивидуального пациента, путем коррекции дозировки гуманизированного антитела 2H7. Истощение В-клеток может, но не обязательно должно, быть полным. Или же полное истощение В-клеток может быть желательным при первоначальном лечении, но в ходе дальнейшего лечения дозировка может быть откорректирована таким образом, чтобы достигалось лишь частичное истощение. В одном из воплощений истощение В-клеток составляет по меньшей мере 20%, то есть остается 80% или менее CD20-положительных В-клеток по сравнению с исходным уровнем, наблюдавшимся до лечения. В других воплощениях истощение В-клеток составляет 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% или более. Предпочтительно, чтобы истощение В-клеток было достаточным для прекращения прогрессии заболевания, более предпочтительно для облегчения признаков и симптомов конкретного заболевания под действием лечения, еще более предпочтительно для излечения заболевания.

Антитела согласно изобретению можно вводить с разной частотой, например, еженедельно, раз в две недели, ежемесячно и т.д. Например, частотой введения дозировок может быть однократное введение дозировки каждые шесть месяцев, или же можно вводить каждые шесть месяцев по две дозировки, разделенные двухнедельным интервалом. Объем раствора антитела для инъекции может варьировать приблизительно от примерно 0,1 до примерно 3 мл на инъекцию, более предпочтительно приблизительно от 0,5 мл до примерно 1,5 мл на инъекцию. Суммарное количество гуманизированного антитела 2H7, вводимого в составе одной инъекции, может составлять приблизительно до 150 мг на инъекцию. Для достижения требуемой дозировки можно использовать многократные инъекции.

Пациентов с аутоиммунным заболеванием или со злокачественным В-клеточным заболеванием, в отношении которых один или несколько общепринятых вариантов лечения оказались неэффективными, плохо переносимыми или противопоказанными, можно лечить, используя любую из схем дозирования согласно изобретению. Например, в настоящем изобретении предусмотрены описанные здесь способы лечения для пациентов с РА, у которых была обнаружена неадекватная реакция на лечение под действием ингибитора фактора некроза опухоли (TNF) или на лечение под действием базовых противоревматических лекарственных средств, модифицирующих течение болезни (DMARD).

"Хроническое" введение относится к введению средства (средств) в непрерывном режиме, в отличие от острого режима, с тем, чтобы в течение длительного времени поддерживать первоначальный терапевтический эффект (активность). "Прерывистое" введение относится к лечению, которое предполагает не постоянный режим введения без перерыва, а скорее введение на циклической основе.

#### ***Комбинированная терапия***

При лечении описанных выше В-клеточных неоплазм пациента можно лечить гуманизированными антителами 2H7 согласно изобретению в сочетании с одним или несколькими терапевтическими средствами, такими как химиотерапевтическое средство по схеме комбинированного лекарственного лечения. Гуманизированное антитело 2H7 можно вводить одновременно, последовательно или в качестве альтернативы введения химиотерапевтического средства, или же после того как будет выявлена ареактивность пациента в отношении других методов лечения. Стандартная химиотерапия при лечении лимфомы может включать циклофосфамид, цитарабин, мелфалан и митоксантрон плюс мелфалан. СНОР является одной из наиболее распространенных схем

химиотерапевтического воздействия при лечении неходжкинской лимфомы. В схеме лечения СНОР используются следующие лекарственные средства: циклофосфамид (с торговым наименованием цитоксан, неозар); адриамицин (доксорубицин/ гидроксидоксорубицин); винкристин (онковин); и преднизолон (иногда называемый дельтазоном или оразоном). В особых воплощениях CD20-связывающее антитело вводят пациенту, в случае необходимости, в сочетании с одним или несколькими из следующих терапевтических средств: доксорубицин, циклофосфамид, винкристин и преднизолон. В специфических воплощениях пациента, страдающего лимфомой (такой как неходжкинская лимфома), лечат гуманизированным антителом 2H7 согласно изобретению в сочетании с СНОР-терапией (циклофосфамид, доксорубицин, винкристин и преднизолон). В другом воплощении ракового пациента можно лечить гуманизированным CD20-связывающим антителом 2H7 согласно изобретению в сочетании с CVP (циклофосфамид, винкристин и преднизолон). В специфическом воплощении пациенту, страдающему CD20-положительной НХЛ, вводят гуманизированное антитело 2H7.v511 или v114 в сочетании с CVP, например, каждые 3 недели на протяжении 8 циклов. В специфическом воплощении лечения ХЛЛ, антитело hu2H7.v511 вводят в сочетании с химиотерапией с использованием одного или двух средств, флударабина и цитоксана, или же обоих этих средств.

"Химиотерапевтическим средством" является химическое соединение, используемое при лечении рака. Примеры химиотерапевтических средств включают алкилирующие средства, такие как тиотепа и ЦИТОКСАН® (циклофосфамид); алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодоба, карбоквон, метуредоба и уредоба; этиленимины и метиламеламины, включая альтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилтиофосфорамид и триметилломеламин; TLK 286 (TELCYTA<sup>TM</sup>); ацетогенины (в частности, буллатацин и буллатацинон); дельта-9-тетрагидроканнабинол (дронабинол, MARINOL®); бета-лапахон; лапахол; колхицины; бетулиновую кислоту; камптотецин (включая синтетический аналог топотекан); (HUSCAMTIN®), CPT-11 (иринотекан, CAMPTOSAR®), ацетилкамптотецин, скополектин и 9-аминокамптотецин); бриостатин; каллистатин; CC-1065 (включая его синтетические аналоги адозелезин, карцезелин и бицезелин); подофиллотоксин; подофиллиновую кислоту; тенипозид; криптофицины (в частности, криптофицин-1 и криптофицин-8); доластатин; дуокармицин (включая синтетические аналоги, KW-2189 и CB1-TM1); элеутеробин; панкреатистатин; саркодиктиин; спонгистатин; азотистый иприт, такой как хлорамбуцил, хлорнафазин, холофосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлорэтамин, мехлорэтаминоксида гидрохлорид, мелфалан, новембихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урациловый иприт; нитрозомочевинны, такие как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин и ранимустин; бисфосфонаты, такие как клодронат; антибиотики, такие как энедииновые антибиотики (например, калихеамицин, в частности, калихеамицин гамма-11 и калихеамицин омега-11 (см., например, Agnew, *Chem Intl. Ed. Engl.*, 33: 183-186 (1994))); и антрациклины, такие как аннамицин, AD 32, алкарубицин, даунорубицин, дексразоксан, DX-52-1, эпирубицин, GPX-100, идарубицин, KRN5500, меногарил, динемидин, включая динемидин А, эсперамицин, хромофор неокарциностатина и родственные ему хромофоры хромопротеиновых энедииновых антибиотиков, аклациномизины, актиномицин, аутрамицин, азазерин, блеомицины, кактиномицин, карабицин, карминомицин, карцинофилин, хромомицины, дактиномицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, АДРИАМИЦИН® доксорубицин (включая морфолино-доксорубицин, цианоморфолино-

доксорубицин, 2-пирролино-доксорубицин, липосомальный доксорубицин и дезоксидоксорубицин), эзорубицин, марцелломицин, митомицины, такие как митомицин С, микофеноловую кислоту, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, потфиروмицин, пуромицин, квеламицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, циностафин, зорубицин; фолиевую кислоту и ее аналоги, такие как деноптерин, птероптерин и триметрексат; пуриновые аналоги, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн и тиогуанин; пиримидиновые аналоги, такие как анцитабин, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, еноцитабин и флоксуридин; андрогены, такие как калустерон, дромостанолон пропионат, эпитиостанол, мепитиостанол и тестостерон; ингибиторы гормонов надпочечников, такие как аминоклутетимид, митотан и трилостан; корректирующую добавку к фолиевой кислоте, такую как фолиевая кислота (лейковорин); ацеглатон; анти-неопластические лекарственные средства с антифолатной активностью, такие как ALIMTA<sup>(R)</sup>, LY231514 пеметрексед, ингибиторы дигидрофолатредуктазы, такие как метотрексат, антиметаболиты, такие как 5-фторурацил (5-FU), и их аналоги, такие как UFT, S-1 и капецитабин, и ингибиторы тимидилатсинтазы и глицинамид-рибонуклеотидформилтрансферазы, такие как ралтитрексед (TOMUDEX<sup>(TM)</sup>, TDX); ингибиторы дигидропиримидиндегидрогеназы, такие как енилурацил; альдофосфамид-гликозид; аминоклевулиновую кислоту; амсакрин; бестрабуцил; бизантрин; эдатрексат; дефофамин; демеколцин; диазиквон; элфонитин; эллиптиниум ацетат; эпотилон, этоглуцид; нитрат галлия; гидроксимочевину; лентинан; лониданин; майтанзиноиды, такие как майтанзин и ансамитоцины; митогуазон; митоксантрон; мопиданмол; нитраэрин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; лозоксантрон; 2-этилгидразид; прокарбазин; PSK®-полисахаридный комплекс (JHS Natural Products, Eugene, OR); разоксан; ризоксин; сизофиран; спирогерманий; теназоновую кислоту; триазикивон; 2,2',2"-трихлортриэтиламин; трихотечены (в частности, токсин Т-2, верракурин А, рорицин А и ангуидин); уретан; виндесин (ELDISINE®, FILDESIN®); дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид ("Ara-C"); циклофосфамид; тиотепа; таксоиды, например, TAXOL® (паклитаксел) (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), не содержащий кремофора ABAXANE<sup>(TM)</sup>, композиция паклитаксела со сконструированными наночастицами альбумина (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois), и TAXOTERE® доксетаксел (Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France); хлорамбуцил; GEMZAR® (гемцитабин); 6-тиогуанин; меркаптопурин; платину; аналоги платины или аналоги на основе платины, такие как цисплатин, оксалиплатин и карбоплатин; винбластин (VELBAN®); этопозид (VP-16); ифосфамид; митоксантрон; винкристин (ONCOVIN®); алакалоид барвинка; винорелбин (NAVELBINE®); новантрон; эдатрексат; дауномицин; аминоклутетин; кселода; ибандронат; ингибитор топоизомеразы RFS 2000; дифторметилорнитин (DMFO); ретиноиды, такие как ретиноевая кислота; фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из перечисленных выше веществ; а также комбинации двух или нескольких из указанных выше веществ, таких как CNOP, аббревиатура, означающая комбинированную терапию циклофосфамидом, доксорубицином, винкристином и преднизолоном, а также FOLFOX, аббревиатура, означающая схему лечения оксалиплатином (ELOXATIN<sup>(TM)</sup>) в сочетании с 5-FU и лейковорином.

Указанное определение охватывает также противогормональные средства, которые действуют в качестве регуляторов или ингибиторов действия гормонов на опухоли,

такие как анти-эстрогены и селективные модуляторы эстрогенных рецепторов (SERM), включая, например, тамоксифен (включая NOLVADEX® тамоксифен), ралоксифен, дролоксифен, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон и FARESTON® торемифен; ингибиторы ароматазы, которые ингибируют фермент ароматазу, регулирующие продуцирование эстрогена с надпочечниками, такие, например, как 4(5)-имидазолы, аминоклутетимид, MEGASE® мегестролацетат, AROMASIN® экземестан, форместан, фадрозол, RIVISOR® ворозол, FEMARA® летрозол и ARIMIDEX® анастрозол; а также анти-андрогены, такие как флутамид, нилутамид, бикалутамид, лейпролид и гозерелин; а также троксацитабин (1,3-диоксолановый аналог цитозинового нуклеозида); антисмысловые олигонуклеотиды, в частности, те, которые ингибируют экспрессию генов в сигнальных путях, вовлеченных в aberrantную пролиферацию клеток, такие, например, как PKC-альфа, Raf и H-Ras, и рецептор эпидермального фактора роста (EGF-R); вакцины, такие как генно-терапевтические вакцины, например, вакцина ALLOVECTIN®, вакцина LEUVECTIN® и вакцина VAXID®; rIL-2 PROLEUKIN®; ингибитор топоизомеразы 1 LURTOTECAN®; gmRH ABARELIX®; а также фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из перечисленных выше веществ.

Кроме того, антитела hu2H7 и их функциональные фрагменты могут быть использованы для лечения CD20-экспрессирующих В-клеточных неоплазм (например, НХЛ), в сочетании со средством против опухолевого ангиогенеза, таким как антагонист фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF). "Средство против ангиогенеза" или "ингибитор ангиогенеза" относится к низкомолекулярному веществу, полинуклеотиду, полипептиду, изолированному белку, рекомбинантному белку, антителу или их конъюгатам или слитым с ними белкам, которые ингибируют ангиогенез, васкулогенез или нежелательную проницаемость сосудов, либо напрямую, либо опосредованно. Например, средство против ангиогенеза, согласно приведенному выше определению, является антителом или другим антагонистом ангиогенного средства, например, антителами против VEGF, антителами против рецепторов VEGF, низкомолекулярными веществами, которые блокируют передачу сигналов VEGF-рецепторов (например, PTK787/ZK2284, SU 6668). "Антагонист VEGF" относится к молекуле, способной к нейтрализации, блокированию, ингибированию, отмене, уменьшению или созданию помех для активностей VEGF, включая его связывание с одним или несколькими рецепторами VEGF. В одном из воплощений пациента, страдающего от такой В-клеточной неоплазмы, лечат антителом 2H7.v511 или 2H7.v114 в сочетании с Avastin® (бевацизумаб; Genentech). Анти-VEGF-антитело "бевацизумаб (BV)", известное также как "rhuMAb VEGF" или "Avastin®", является рекомбинантным гуманизированным моноклональным антителом против VEGF, вырабатываемым в соответствии с тем, как описано Presta с соавторами, *Cancer Res.* 57: 4593-4599 (1997).

Антитела hu2H7 и их функциональные фрагменты применимы в способе лечения В-клеточных неоплазм экспрессирующих CD20, в сочетании с цитокином, членом семейства TNF, таким как лиганд Аро-2 (Аро2L), называемым также TRAIL. Полная длина нативной последовательности человеческого лиганда Аро-2 составляет 281 аминокислотный остаток, трансмембранного белка типа II из семейства факторов некроза опухоли из разряда цитокинов. Было обнаружено, что растворимые формы лиганда Аро-2, такие, которые содержат внеклеточный домен (ECD) или его часть, обладают различными активностями, включая апоптотическую активность в раковых клетках млекопитающих. Аро2L/TRAIL (описанный в международных заявках WO 97/01633 и WO 97/25428)

является растворимым человеческим белком, который представляет собой фрагмент ECD, содержащий аминокислоты 114-281 полноразмерного белка Aро-2L.

При лечении описанных выше аутоиммунных заболеваний или связанных с аутоиммунными заболеваниями состояний у пациентов их можно лечить одним или несколькими антителами hu2H7 в сочетании со вторым терапевтическим средством, таким как иммуносупрессивное средство, например, по схеме многократного приема лекарственного средства. Антитело hu2H7 можно вводить одновременно, последовательно или в качестве альтернативы введения иммуносупрессивного средства, или же в случае ареактивности пациента в отношении других методов лечения.

Иммуносупрессивное средство может быть введено в той же дозе или же в меньших дозировках, нежели те, которые являются общепринятыми в данной области. Предпочтение, отдаваемое тому или иному дополнительному иммуносупрессивному средству, будет зависеть от многих факторов, включая подвергаемый лечению тип расстройства, а также историю болезни пациента.

Используемый здесь термин "иммуносупрессивное средство" для добавочной терапии относится к веществам, которые вызывают супрессию или маскировку иммунной системы пациента. Такие средства включают вещества, которые вызывают супрессию продуцирования цитокинов, подавление или торможение экспрессии собственных антигенов, или же которые маскируют антигены МНС. Примеры таких средств включают стероиды, такие как глюкокортикостероиды, например, преднизон, метилпреднизолон и дексаметазон; 2-амино-6-арил-5-замещенные пиримидины (см. патент США № 4665077); азатиоприн (или, при наличии побочной реакции на азатиоприн, циклофосфамид); бромкриптин; глутаральдегид (который маскирует антигены МНС, как описано в патенте США № 4120649); антиидиотипические антитела против антигенов МНС и фрагментов МНС; циклоспорин А; антагонисты цитокина или цитокинового рецептора, включая антитела против  $\gamma$ -интерферона,  $\beta$ - или  $\alpha$ -интерферона; антитела против фактора некроза опухоли  $\alpha$ ; антитела против фактора некроза опухоли  $\beta$ ; антитела против интерлейкина-2 и антитела против рецептора IL-2; антитела против L3T4; гетерологичный антилимфоцитарный глобулин; анти-пан-Т-клеточные антитела, предпочтительно антитела против CD3 или CD4/CD4a; растворимый пептид, содержащий LFA-3-связывающий домен (WO 90/08187, дата публикации 26.07.1990); стрептокиназу; TGF-бета; стрептодорназу; РНК или ДНК из организма хозяина; FK506; RS-61443; дезоксиспергуалин; рапамицин; Т-клеточный рецептор (патент США № 5114721); фрагменты Т-клеточного рецептора (Offner et al., *Science*, 251: 430-432 (1991); WO 90/11294 и WO 91/01133); а также антитела против Т-клеточного рецептора (EP 340109), такие как T10B9.

Для лечения ревматоидного артрита пациентам можно вводить CD20-связывающее антитело согласно изобретению в сочетании с одним или несколькими из следующих лекарственных средств: DMARD (базовые противоревматические лекарственные средства, модифицирующие течение болезни (например, метотрексат), NSAИ или NSAID (нестероидные противовоспалительные средства), средства, которые вызывают иммуносупрессию (например, азатиоприн; микофенолат мофетила (CellCept®; Roche)), анальгетики, глюкокортикостероиды, циклофосфамид, HUMIRA<sup>TM</sup> (адалимумаб; Abbott Laboratories), ARAVA® (лефлуномид), REMICADE® (инфликсимаб; Centocor Inc., of Malvern, Pa), ENBREL® (этанерцепт; Immunex, WA), ACTEMRA® (тоцилизумаб; Roche, Switzerland), ингибиторы COX-2. Средствами DMARD, обычно используемыми при лечении РА, являются гидроксихлорохин, сульфазалазин, метотрексат, лефлуномид, этанерцепт, инфликсимаб, азатиоприн, D-пеницилламин, золото (перорально), золото

(внутримышечно), миноциклин, циклоспорин, иммуноадсорбционный стафилококковый протеин А.

Адалимуаб является человеческим моноклональным антителом, которое связывается с TNF $\alpha$ . Инфликсимаб является химерным (мышь/человек) моноклональным антителом, которое связывается с TNF $\alpha$ . Для лечения РА и болезни Крона предписаны иммуносупрессивные средства. Инфликсимаб сопряжен с фатальными реакциями, такими как сердечная недостаточность и инфекции, включая туберкулез, а также демиелинизацию, приводящую к рассеянному склерозу. Актема (тоцилизумаб) является гуманизированным антителом против человеческого рецептора интерлейкина-6 (IL-6).

Этанерцепт является "иммуноадгезиновым" слитым белком, состоящим из внеклеточной лиганд-связывающей области человеческого рецептора фактора некроза опухоли (TNFR) в 75 кДа (p75), связанной с Fc-областью человеческого IgG1. Этанерцепт (ENBREL®) является инъектируемым лекарственным средством, одобренным в США для лечения активного РА. Этанерцепт связывается с TNF $\alpha$  и служит для удаления большей части TNF $\alpha$  из суставов и крови, предупреждая, таким образом, развитие под действием TNF $\alpha$  воспаления и других симптомов ревматоидного артрита. Данное лекарственное средство ассоциировано с отрицательными побочными эффектами, такими как опасные инфекции и сепсис, расстройства нервной системы, такие как рассеянный склероз (РС). См., [www.remicade-infliximab.com/pages/enbrel\\_embrel.html](http://www.remicade-infliximab.com/pages/enbrel_embrel.html), например.

В отношении традиционного лечения РА см., например, "Guidelines for the management of rheumatoid arthritis" Arthritis & Rheumatism 46(2): 328-346 (February, 2002). В специфическом воплощении пациентов с РА лечат антителом hu2H7 против CD20, согласно изобретению, в сочетании с метотрексатом (MTX). Примерной дозировкой MTX является доза приблизительно от 7,5 до 25 мг/кг/неделя MTX можно вводить перорально и подкожно.

В одном из примеров, пациенты получают также сопутствующее лечение MTX (10-25 мг/нед. перорально (р.о.) или парентерально), одновременно со схемой лечения кортикостероидами, состоящей из метилпреднизолона, 100 мг в/в, за 30 минут до инфузий CD20-антитела, и преднизона, 60 мг р.о., в дни 2-7, 30 мг р.о. в дни 8-14, с возвратом к исходной дозе к 16-му дню. Пациенты могут также получать фолат (5 мг/нед.), вводимый либо в виде однократной дозы, либо в виде дробных доз. Пациенты необязательно продолжают получать в течение периода лечения любой из сопутствующих кортикостероидов (10-25 мг/день преднизона или его эквивалента).

Для лечения анкилозирующего спондилита, псориатического артрита и болезни Крона пациента можно лечить CD20-связывающим антителом согласно изобретению в сочетании, например, с ремикадом® (инфликсимаб; Centocor Inc., Malvern, Pa.), ENBREL® (этанерцепт; Immunex, WA).

Лечение СКВ включает комбинацию антитела против CD20 с высокими дозами кортикостероидов и/или циклофосфамида (HDCC). Пациентов, страдающих СКВ, ААV и NMO, можно лечить антителом 2H7 согласно изобретению в сочетании с любым из следующих лекарственных средств: кортикостероидами, NSAID, анальгетиками, ингибиторами COX-2, глюкокортикостероидами, обычно применяемыми DMARD (например, метотрексатом, сульфазалазином, гидроксихлорохином, лефлуномидом), биологическими DMARD, такими как анти-Blys (например, белимумабом), анти-IL6R, например, тоцилизумабом; CTLA4-Ig (абатацептом), (анти-CD22, например, эспратумабом), иммуносупрессорными средствами (например, азатиоприном; микофенолатом мофетила (CellCept®; Roche)), а также цитотоксическими средствами

(например, циклофосфамидом).

Для лечения псориаза пациентам можно вводить гуманизированное антитело 2H7 в сочетании с вариантами местного лечения, такими как местное применение стероидов, антралина, кальципотриена, клобетазола и тазаротена, или в сочетании с метотрексатом, ретиноидами, циклоспорином, PUVA- и UVB-терапиями. В одном из воплощений пациентов с псориазом лечат гуманизированным антителом 2H7, вводимым последовательно или одновременно с циклоспорином.

Для минимизации токсичности традиционную системную терапию можно проводить в режиме циклического, последовательного, комбинаторного или прерывистого лечения или же в сочетанных режимах с применением более низких дозировок и композиций CD20-связывающего антитела hu2H7 в представленных дозировках.

#### **Изделия производства и наборы**

Другим воплощением настоящего изобретения является изделие производства, содержащее композицию согласно изобретению, применимую для лечения аутоиммунных заболеваний и связанных с ними состояний и CD20-положительных злокачественных новообразований, таких как неходжкинская лимфома. Указанное изделие производства включает в себя контейнер и этикетку или вкладыш, вложенный в указанный контейнер или ассоциированный с ним. Подходящие контейнеры включают, например, флаконы, ампулы, шприцы и т.д. Контейнеры могут быть сделаны из различных материалов, таких как стекло или пластик. По меньшей мере одним из активных агентов в указанном составе или композиции является антитело hu2H7 согласно изобретению, причем указанное антитело находится в контейнере, таком как шприц, в количестве, необходимом для доставки описанной выше уменьшенной дозы. Концентрация hu2H7 будет составлять от 10 мг/мл до 200 мг/мл, она может составлять от 30 до 150 мг/мл или от 100 до 150 мг/мл. На этикетке или вкладыше в упаковку указано, что композиция используется для лечения конкретного состояния. Кроме того, этикетка или вкладыш в упаковку содержат инструкции в отношении введения указанной композиции антитела пациенту.

Вкладыш в упаковку относится к инструкциям, обычно вкладываемым в коммерческие упаковки лекарственных продуктов, которые содержат информацию относительно показаний, применения, введения, противопоказаний и/или предостережений, касающихся применения таких лекарственных продуктов. В одном из воплощений на вкладыше в упаковку указано, что композиция используется для лечения неходжкинской лимфомы.

Кроме того, указанное изделие производства может дополнительно содержать второй контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый буфер, такой как вода для инъекций (WFI), бактериостатичная вода для инъекций (BWFI), забуференный фосфатом физиологический раствор, раствор Рингера, хлористый натрий (0,9%) и раствор декстрозы. Оно может дополнительно содержать другие материалы, необходимые с коммерческой и потребительской точек зрения, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы и шприцы.

#### **Экспериментальные примеры**

##### **Пример 1**

##### **Исходная композиция для подкожного введения антитела rhuMab 2H7**

Композиция для подкожного введения с высокой концентрацией антитела (150 мг/мл) была разработана для rhuMab 2H7. Данная композиция содержит 150 мг/мл 2H7, 30 мМ ацетата натрия, 7% дигидрата трегалозы и 0,03% полисорбата-20 при pH 5,3. Указанная композиция стабильна в течение длительного периода при хранении в

выпускаемом флаконе в рекомендуемых условиях. Введение указанной композиции посредством подкожных инъекций макакам-крабоедам привела к тяжелому воспалению в месте инъекции и низкой биодоступности ( $\approx 30\%$ ). У этих животных наблюдали макрофагальные инфильтраты, от слабого до умеренного, в подкожном слое. Причина раздражения была отнесена за счет материала чужеродного организма (то есть тестируемого материала 2Н7). Тестирование указанной композиции в условиях, которые имитировали то, что подвергалось действию указанного продукта в месте инъекции, подтвердило, что данный белок существенно агрегировал при физиологических условиях (фиг. 1), подтверждая результаты воспаления, наблюдаемые у макак-крабоедов.

Наблюдаемое осаждение может быть сопоставимо с эффектом высаливания, происходящего в результате смещения области рН.

## Пример 2

### Способ диализа *in vitro* для тестирования агрегации макромолекул при подкожной инъекции в физиологических условиях

Способ диализа *in vitro* был разработан для тестирования способности различных эксципиентов уменьшать агрегацию 2Н7 в физиологических условиях, неожиданно обнаруживаемую при подкожной инъекции. Модифицированный раствор PBS ("среда высвобождения") был разработан для этой модели с целью имитации интерстициальной жидкости. Такая система *in vitro* была использована для оценки эффекта сахаров, полимеров, поверхностно-активных веществ и аминокислот в отношении замедления агрегации 2Н7. Композиции-кандидаты, которые обеспечивали улучшенное высвобождение продуктов *in vitro*, были затем тестированы *in vivo* (крысиная модель подкожной инъекции; см. пример 3) с целью определения того, соответствует ли указанное улучшение уменьшению воспаления *in vivo*.

Организация модели диализа *in vitro* приведена на фиг. 2. 250-миллилитровые стеклянные сосуды заполняли 220 мл среды высвобождения (167 мМ натрия, 140 мМ хлорида, 17 мМ фосфата, 4 мМ калия) при 37°C. Диализную трубку длиной в 6 см (Spectra, с уровнем отсечки по мол. массе (MWCO) в 1 млн. дальтон, диализная трубка PVDF диаметром в 12 мм) замачивали в очищенной воде. Один конец диализной трубки зажимали, и трубку заполняли приблизительно 1 мл тестируемого образца (2Н7 с тестируемым эксципиентом). Излишний воздух удаляли, и противоположный конец трубки прижимали к уплотнительному клапану сосуда. Заполненный мешочек вносили в 250-миллилитровый стеклянный сосуд, содержащий среду высвобождения, и сосуд помещали в условия при 37°C с непрерывным перемешиванием. Через 2,5, 6, 12, 24, 33 и 48 часов отбирали по 500 мкл образцов среды высвобождения. Мутность образцов и количество белка, присутствующего в среде высвобождения, измеряли путем УФ-фотометрического сканирования. Кроме того, среду высвобождения и раствор, находящийся внутри диализной трубки, подвергали визуальному осмотру на предмет осаждения.

При изучении агрегации тестируемый эксципиент считался приемлемым, если

- кумулятивное высвобождение 2Н7 с тестируемым эксципиентом было выше, чем в отрицательном контроле (исходная композиция 2Н7 - 150 мг/мл 2Н7, 30 мМ ацетата натрия; 7% дигидрата трегалозы; 0,03% полисорбата-20, при рН 5,3), что указывало на улучшенные характеристики 2Н7;

- положительный контроль (rhuMAb против CD11a, также известное под названием Raptiva<sup>TM</sup>, гуманизированное CD11a-антитело, вводимое подкожно), не вызывал преципитации и высвобождался в большей степени, чем отрицательный контроль;
- преципитация 2Н7 уменьшалась или исчезала;



- мутность среды высвобождения уменьшалась.

Композиции-кандидаты, которые соответствовали критериям приемлемости, затем тестировали на крысиной модели *in vivo* с целью определения того, коррелирует ли задержка агрегации *in vitro* с уменьшением воспаления *in vivo*.

### Результаты *in vitro*:

Типичный профиль высвобождения при исследовании контролей в способе диализа *in vitro* показан на фиг. 3. Контроли для этой модели выбирали с целью установления границ в случаях высвобождения белка, который не очень охотно агрегирует (rhuMAb CD11a), и высвобождения белка, который в физиологических условиях обычно агрегирует (исходный белок 2H7). Область между этими двумя кривыми высвобождения является мерой относительной способности тестируемого эксципиента задерживать агрегацию по сравнению с указанными контролями.

Кумулятивное высвобождение исходной композиции 2H7 является низким (<30%). Повышенную мутность среды высвобождения наблюдали при высвобождении 2H7 из диализного мешка в среду высвобождения, что указывает на то, что высвобождаемый материал агрегирует в данной среде. В течение 24 часов внутри диализного мешочка наблюдали обширную флоркуляцию, с соответствующим резким снижением концентрации 2H7 от 150 мг/мл в начале исследования до 4-5 мг/мл в конце 48-часового периода исследования. Все эти наблюдения указывают на то, что 2H7 с легкостью агрегирует при физиологических условиях. Такое поведение не наблюдается, если исходную композицию 2H7 хранить в стеклянной ампуле при 37°C.

В отличие от этого, rhuMAb CD11a быстро высвобождался из диализного мешочка в среду высвобождения. Среда высвобождения оставалась прозрачной в течение всего периода исследования, и внутри диализного мешочка не наблюдалось никакой флоркуляции, что свидетельствует о том, что rhuMAb CD11a при физиологических условиях не агрегирует и является адекватным контролем для данной модели. В таблице 3 обобщены результаты по проценту высвобождения белка, мутности среды высвобождения и наличию флоркуляции.

ТАБЛИЦА 3				
Контроль	Время (часы)	% кумулятивного высвобождения белка	Мутность среды высвобождения ОП 350 нм	Флоркуляция внутри диализного мешочка
rhuMAb CD11a	0	0	0,001	Нет
	48	83	0,03	Нет
Исходный 2H7	0	0	0,02	Нет
	48	28	0,37	Да

### Пример 3

#### Крысиная модель подкожной инъекции *in vivo* для тестирования агрегации макромолекул

Крысиная модель подкожной инъекции является подходящей моделью, основанной на сходстве в характере подкожного воспаления. Воспалительная реакция крыс, получивших исходную композицию 2H7, была сопоставима с воспалительной реакцией, наблюдаемой у макак-крабоедов (см. пример 1). Иммуногистохимическое окрашивание на предмет обнаружения человеческого иммуноглобулина было положительным на участках кожи крыс, соответствующих месту инъектирования 2H7, что указывает на присутствие или продолжающуюся персистенцию антитела на участках воспаления, что подтверждает теорию того, что преципитация тестируемого вещества вызывает воспаление в месте инъекции.

Анализ методом скрининга крыс *in vivo* проводили следующим образом:

Каждую тестируемую или контрольную композицию (0,25 мл) вводили подкожно.

Животных вскрывали через 72 часа после введения дозировки. На кожных срезах в местах инъекций производили поперечные срезы, которые фиксировали в формалине, и гистологически определяли эффект тестируемого эксципиента в отношении снижения воспаления. Количественный показатель воспаления оценивали по гистологическим

5 срезам следующим образом:

+/-: минимальное/легкое воспаление;

1: слабое воспаление;

2: умеренное;

3: сильное.

10 Наличие гранулемы определяли патологоанатомически. Делали срез ткани на месте инъекции, окрашивали его и изучали в световом микроскопе на предмет наличия или отсутствия гранулемы.

Критериями приемлемости для крысиной модели *in vivo* были следующие: (1) воспаление, сравнимое с таковым в случае rhuMAb CD11a (отрицательный контроль),

15 и (2) отсутствие гранулемы на месте инъекции.

#### Пример 4

#### Способность поверхностно-активных веществ и других добавок уменьшать агрегацию 2H7

Поверхностно-активные вещества обычно используют для задержки агрегации макромолекул. Способность поверхностно-активных веществ уменьшать агрегацию и флуклюацию 2H7 оценивали с использованием модели *in vitro*, описанной в примере 2. Тестируемые поверхностно-активные вещества охватывали область гидрофильно-липофильных балансов (HLB). Добавление полисорбата-20, полоксамера и

20 поверхностно-активных веществ Span 20 и 80 не вызывали существенного улучшения высвобождения 2H7 по сравнению с исходной композицией 2H7. Некоторое улучшение в высвобождении 2H7 *in vitro* наблюдали в присутствии полисорбата-80, однако все

25 остальные протестированные поверхностно-активные вещества существенного улучшения в высвобождении 2H7 не вызывали (см. таблицу 4). При этом, однако, во всех случаях наблюдалась флуклюация внутри диализного мешочка (таблица 4). Таким

30 образом, несмотря на то, что обычно поверхностно-активные вещества используются для уменьшения агрегации белка, в используемой в данном случае модели *in vitro* они оказались неэффективны для задержки агрегации 2H7.

ТАБЛИЦА 4

Поверхностно-активное вещество + 2H7	% высвобождаемого белка (T=48 час)	HLB	Флуклюация внутри диализного мешка
Исходный 2H7 (контроль)	31	Нет данных	Да
10% полоксамера	15	>28	Да
0,2% полисорбата-80	59	15	Да
0,05% Span 20	24	8,6	Да
0,02% Span 20	24	8,6	Да
0,05% Span 80	33	4,3	Да
0,02% Span 80	33	4,3	Да
rhuMAb CD11a (контроль)	100	Нет данных	Нет

Оценивали также влияние добавления декстрана (полисахарид), ПЭГ-4000 (полимер), аргинина (аминокислота) и гамма-циклодекстрина на задержку агрегации и флуклюацию, и полученные результаты обобщены в таблицах 5-7. Ни одна из указанных добавок

45 сколько-нибудь существенного улучшения не вызывала.

ТАБЛИЦА 5

Тестируемый материал + 2Н7	% высвобождаемого белка (Т=48 час)	Флокуляция внутри диализного мешка
Исходный 2Н7 (контроль)	58	Отсутствие мутности PBS
10% декстрана в 70 кДа	47	Отсутствие мутности PBS
10% декстрана в 2000 кДа	38	Наличие (1/2) мутности PBS
rhuMAb CD11a (контроль)	89	Нет

ТАБЛИЦА 6

Тестируемый материал + 2Н7	% высвобождаемого белка (Т=48 час)	Флокуляция внутри диализного мешка
Исходный 2Н7 (контроль)	22	Да
200 мМ аргининглутамата	35	Да (1/2)
100 мМ аргининсукцината	36	Да
100 мМ аргининсукцината и 10% НР-гамма	25	Да
10% ПЭГ-4000	28	Да
rhuMAb CD11a (контроль)	61	Нет

ТАБЛИЦА 7

Тестируемый материал + 2Н7	% высвобождаемого белка (Т=48 час)	Флокуляция внутри диализного мешка
Исходный 2Н7 (контроль)	13	Да
5% гамма-циклодекстрина	20	Да
10% гамма-циклодекстрина	2	Да
rhuMAb CD11a (контроль)	76	Нет

### Пример 5

#### Влияние циклодекстринов на агрегацию 2Н7

Тестировали влияние циклодекстринов на агрегацию 2Н7 в модели *in vitro*.

Используемыми материалами были следующие:

- Сульфобутиловый эфир бета-циклодекстрина, натриевая соль, Cydex, Inc., Captisol Research Grade

- Гидроксипропил-гамма-циклодекстрин, Cyclodextrin Technologies Development, Inc., Trappsol Pharmaceutical Grade

- Гидроксипропил-бета-циклодекстрин, Cyclodextrin Technologies Development, Inc., Trappsol Pharmaceutical Grade

Первоначальные исследования проводили с использованием 2-9% сульфобутилового эфира (SBE) и 5-20% гидроксипропил-гамма (НР-гамма)-циклодекстринов. Обе добавки: SBE (фиг. 4) и НР-гамма-циклодекстрины (фиг. 5) - существенно улучшили *in vitro* высвобождение 100 мг/мл 2Н7 по сравнению с исходной контрольной композицией 2Н7 (фиг. 3, таблица 3). Меньшую степень флокуляции наблюдали в диализном мешочке в составе композиций с SBE, однако, по мере выхода белка в внешнюю среду, раствор снаружи диализного мешка становился все более и более опалесцирующим. Композиции НР-гамма были более эффективны в отношении уменьшения агрегации. Наблюдалась лишь небольшая степень флокуляции внутри диализного мешка, а раствор снаружи мешка оставался прозрачным в течение всего периода исследования. В итоге добавление циклодекстринов помогало ингибировать агрегацию 2Н7 при физиологических условиях.

Исходя из этих обнадеживающих результатов, оценивали гидроксипропил-бета (НР-бета)-циклодекстрин на модели диализа *in vitro* с тем, чтобы определить влияние различных групп замещения на агрегационное поведение 2Н7. Оценивали область концентраций от 5% до 20% НР-бета-циклодекстрина (фиг. 6). Процент высвобождаемого белка был улучшен по сравнению с исходной композицией 2Н7, однако он был меньше, чем в случае rhuMAb CD11a в контроле. Среда высвобождения становилась опалесцирующей по мере выхода в нее белка, и внутри диализного мешка после 24 часов инкубации при 37°C появлялась флокуляция. Добавление НР-бета-циклодекстрина было эффективным в плане уменьшения степени агрегации 2Н7, однако качественно

он представлялся менее эффективным, чем НР-гамма-циклодекстрин (фиг. 5).

С целью определения возможности получения аддитивного эффекта в уменьшении степени агрегации 2Н7 оценивали эффект комбинации НР-гамма-циклодекстрина и аргининсукцината. Тестировали четыре разных соотношения аргининсукцината и НР-гамма-циклодекстрина со 100 мг/мл 2Н7 (фиг. 7). Улучшение в высвобождении 2Н7 по сравнению с исходной композицией 2Н7 в контроле наблюдали во всех тестируемых группах. Композиции из 100 мМ аргининсукцината/10% НР-гамма-циклодекстрина и 50 мМ аргининсукцината/15% НР-гамма-циклодекстрина характеризовались появлением наименьшей степени мутности при их высвобождении в среду и меньшей степенью флуксуляции внутри диализного мешка по сравнению с исходной композицией 2Н7 в контроле.

### Пример 6

#### Влияние циклодекстринов на воспаление в крысиной модели подкожной инъекции *in vivo*

Композиции антитела, содержащие НР-гамма- и НР-бета- циклодекстрины, проявили значительно более улучшенные свойства при их дальнейшем тестировании на крысиной модели подкожной инъекции *in vivo*. Целью данной работы являлось определение того, повлияет ли устранение агрегации 2Н7 *in vitro* при физиологических условиях на уменьшение воспаления в месте инъекции. Критериями успешности на животной модели были следующие признаки: (1) сопоставимо низкое с контролем rhuMAb CD11a воспаление в тестируемой пробе, и (2) отсутствие гранулемы в месте инъекции.

Суммарные результаты гистопатологических исследований композиций НР-бета-циклодекстрина представлены в таблице 8. Отрицательный контроль, rhuMAb CD11a, вызывал минимальное подкожное воспаление. Исходную композицию со 150 мг/мл 2Н7, вызывающую от умеренного до сильного (2-3+) воспаления в месте инъекции, использовали в качестве положительного контроля. Добавление НР-бета-циклодекстрина существенно уменьшало воспаление в месте инъекции. Оптимальная концентрация, составляющая 15 или 30% НР-бета-циклодекстрина со 100 мг/мл 2Н7 способствовала существенному уменьшению воспаления в месте инъекции до слабого (1+). Повышение концентрации циклодекстрина приводило к снижению повышенного воспаления, наблюдаемого при более высоких концентрациях белка 2Н7. Добавление 30% НР-бета-циклодекстрина к более высоким концентрациям 2Н7 (150 мг/мл) существенно снижало степень наблюдаемого воспаления от умеренного до сильного (2-3+) до степени слабого воспаления (1+). Более низкие концентрации НР-бета-циклодекстрина (5% и 15%) такого эффекта не оказывали.

ТАБЛИЦА 8

Композиция	Животное	Гистологическая оценка	Комментарии
150 мг/мл rhuMAb CD11a	1	+/-	Фолликулярный фоллит
	2	+/-	
	3	+/-	
100 мг/мл 2Н7+15% НР-бета	1	1+	Без комментариев
	2	1+	
	3	+/-	
100 мг/мл 2Н7+30% НР-бета	1	1+	Обширное фокальное воспаление
	2	1+	
	3	1+	
150 мг/мл 2Н7+5% НР-бета	1	3+	Обширное фокальное воспаление с некрозом
	2	2-3+	
	3	2-3+	
150 мг/мл 2Н7+15% НР-бета	1	2+	Обширное фокальное воспаление с дегенерацией нейтрофилов
	2	2-3+	
	3	2+	

150 мг/мл 2Н7+30% НР-бета	1	1+	Обширное фокальное воспаление
	2	1+	
	3	1+	
30% наполнителя НР-бета	1	+/-	Обширное фокальное воспаление (животные 2 и 3)
	2	1-2+	
	3	1+	
Исходная композиция из 150 мг/мл 2Н7	1	2-3+	Обширное фокальное воспаление с некрозом
	2	2-3+	
	3	2-3+	
Оценочные градации воспаления: WNL = в пределах нормы (within normal limits) +/- = минимальное/легкое 1+ = слабое 2+ = умеренное 3+ = сильное			

Суммарные результаты гистопатологических исследований композиций НР-гамма-циклодекстрина представлены в таблице 9. Уменьшение с уровня от умеренного до сильного (2-3+) воспаления до уровня от слабого до умеренного (<2+) воспаления наблюдали при добавлении 10% НР-гамма-циклодекстрина к 2Н7. Существенного воспалительного ответа при добавлении наполнителя НР-гамма не обнаруживали.

ТАБЛИЦА 9

Композиция	Животное	Гистологическая оценка	Комментарии
150 мг/мл rhuMAb CD11a	1	+/-	Фолликулярный фоллит
	2	+/-	
	3	+/-	
100 мг/мл 2Н7+10% НР-гамма	1	1-2+	Без комментариев
	2	+/-	
	3	+/-	
100 мг/мл 2Н7+10% НР-гамма	4	1-2+	Обширное фокальное воспаление
	5	1+	
	6	1+	
125 мг/мл 2Н7+10% НР-гамма	1	2+	Без комментариев
	2	1-2+	
	3	2+	
150 мг/мл 2Н7 + 10% НР-гамма	1	2+	Обширное фокальное воспаление
	2	1-2+	
	3	2+	
10% наполнителя НР-гамма	1	1+	Обширное фокальное воспаление; периваскулярное воспаление
	2	+/-	
	3	+/-	
10% наполнителя НР-гамма	4	WNL	Без комментариев
	5	+/-	
	6	WNL	
Исходная композиция из 150 мг/мл 2Н76	1	2-3+	Обширное фокальное воспаление с некрозом
	2	2-3+	
	3	2-3+	

Оценочные градации воспаления:  
WNL = в пределах нормы (within normal limits)  
+/- = минимальное/легкое  
1+ = слабое  
2+ = умеренное  
3+ = сильное

### Заключения:

Таким образом, добавление сульфобутилэфира (SBE), гидроксипропил-бета (НР-бета) и гидроксипропил-гамма (НР-гамма) циклодекстринов оказалось эффективным в отношении существенного уменьшения агрегации 2Н7 и уменьшения флокуляции 2Н7 при физиологических условиях. Результаты с циклодекстрином и 2Н7 были необъяснимы с точки зрения исторического применения циклодекстрина и, следовательно, иллюстрируют новизну и изобретательский уровень подхода. Поверхностно-активные вещества, традиционно применяемые для уменьшения агрегации белков, были оценены также на предложенной авторами изобретения модели *in vitro*, но ни одно из них не было эффективно в отношении замедления агрегации 2Н7. Полимеры (например,

декстран) и аминокислоты (например, аргинин) также были протестированы, но они тоже не вызывали существенного уменьшения агрегации белков.

Уменьшение агрегации 2Н7 в настоящем изобретении, в конечном счете, приводило к уменьшению воспаления в месте инъекции у животных, которым инъецировали 2Н7.

5 При введении композиций 2Н7, которые включали НР-бета- и НР-гамма-циклодекстрины, воспаление уменьшалось от сильного (исходный 2Н7) до уровня от слабого до умеренного. Уменьшение способности белка к агрегации в этих условиях может потенциально приводить к повышению биодоступности. Наконец, авторы изобретения успешно разработали и продемонстрировали применимость модели диализа *in vitro*  
10 для количественной оценки способности эксципиента уменьшать агрегацию белка.

#### Список литературы:

Цитируемые в настоящей заявке ссылки, включая патенты, опубликованные заявки и другие публикации, включены в настоящее описание в виде ссылок.

В осуществлении настоящего изобретения используются, если специально не указано  
15 иное, общеупотребимые и подобные им технологии молекулярной биологии, которые не выходят за рамки компетенции специалистов в данной области. Такие технологии полностью разъяснены в литературе. См., например, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989); Current Protocols in Molecular Biology (F. Ausubel et al., eds., 1987 выше); Essential Molecular  
20 Biology (T. Brown ed., IRL Press 1991); Gene Expression Technology (Goeddel ed., Academic Press 1991); Methods for Cloning and Analysis of Eukaryotic Genes (A. Bothwell et al. eds., Bartlett Publ. 1990); Gene Transfer and Expression (M. Kriegler, Stockton Press 1990); Recombinant DNA Methodology II (R. Wu et al. eds., Academic Press 1995); PCR: A Practical Approach (M. McPherson et al., IRL Press at Oxford University Press 1991); Oligonucleotide  
25 Synthesis (M. Gait ed., 1984); Cell Culture for Biochemists (R. Adams ed., Elsevier Science Publishers 1990); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J. Miller & M. Calos eds., 1987); Mammalian Cell Biotechnology (M. Butler ed., 1991); Animal Cell Culture (J. Pollard et al eds., Humana Press 1990); Culture of Animal Cells, 2<sup>nd</sup> Ed. (R. Freshney et al. eds., Alan R. Liss 1987); Flow Cytometry and Sorting (M. Melamed et al. eds., Wiley-Liss 1990); the series Methods  
30 in Enzymology (Academic Press, Inc.); Wirth M. and Hauser H. (1993); Immunochemistry in Practice, 3rd edition, A. Johnstone & R. Thorpe, Blackwell Science, Cambridge, MA, 1996; Techniques in Immunocytochemistry, (G. Bullock & P. Petrusz eds., Academic Press 1982, 1983, 1985, 1989); Handbook of Experimental Immunology, (D. Weir & C. Blackwell, eds.); Current Protocols in Immunology (J. Coligan et al. eds. 1991); Immunoassay (E. P. Diamandis & T. K.  
35 Christopoulos, eds., Academic Press, Inc., 1996); Goding (1986) Monoclonal Antibodies: Principles and Practice (2d ed) Academic Press, New York; Ed Harlow and David Lane, Antibodies A laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1988; Antibody Engineering, 2<sup>nd</sup> edition (C. Borrebaeck, ed., Oxford University Press, 1995); and the series Annual Review of Immunology; the series Advances in Immunology.  
40

#### Формула изобретения

1. Способ минимизации воспаления в месте инъекции в процессе подкожного введения анти-CD20-антитела в концентрации, составляющей от 100 мг/мл до 200 мг/мл, предусматривающий добавление к композиции, содержащей указанную макромолекулу,  
45 от 2% до 30% циклодекстрина.

2. Способ по п. 1, в котором циклодекстрин выбран из группы, состоящей из НР-бета-циклодекстрина, НР-гамма-циклодекстрина и SBE-циклодекстрина.

3. Способ по п. 2, в котором указанная композиция содержит от 5% до 30% НР-бета-

циклодекстрина или НР-гамма-циклодекстрина.

4. Способ по п. 3, в котором указанная композиция содержит от 5% до 30% НР-бета-циклодекстрина.

5. Способ по п. 3, в котором указанная композиция содержит от 5% до 20% НР-гамма-циклодекстрина.

6. Способ по п. 5, в котором указанная композиция дополнительно содержит от 50 мМ до 200 мМ аргининсукцината.

7. Способ по п. 2, в котором указанная композиция содержит от 2% до 9% SBE-циклодекстрина.

8. Способ по п. 1, в котором указанное антитело является терапевтическим антителом.

9. Способ по п. 1, в котором указанное антитело является диагностическим антителом.

10. Способ по п. 9, в котором указанное антитело содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-15.

11. Способ по п. 9, в котором указанное антитело содержит вариабельный домен легкой цепи SEQ ID NO: 1 и вариабельный домен тяжелой цепи SEQ ID NO: 2.

12. Способ по п. 9, в котором указанное антитело содержит вариабельный домен легкой цепи SEQ ID NO: 3 и вариабельный домен тяжелой цепи SEQ ID NO: 4.

13. Способ по п. 9, в котором указанное антитело содержит вариабельный домен легкой цепи SEQ ID NO: 3 и вариабельный домен тяжелой цепи SEQ ID NO: 5.

14. Способ по п. 9, в котором указанное антитело содержит полноразмерную легкую цепь SEQ ID NO: 6 и полноразмерную тяжелую цепь SEQ ID NO: 7.

15. Способ по п. 9, в котором указанное антитело содержит полноразмерную легкую цепь SEQ ID NO: 6 и полноразмерную тяжелую цепь SEQ ID NO: 8.

16. Способ по п. 9, в котором указанное антитело содержит полноразмерную легкую цепь SEQ ID NO: 6 и полноразмерную тяжелую цепь SEQ ID NO: 15.

17. Способ по п. 9, в котором указанное антитело содержит полноразмерную легкую цепь SEQ ID NO: 9 и полноразмерную тяжелую цепь SEQ ID NO: 10.

18. Способ по п. 9, в котором указанное антитело содержит полноразмерную легкую цепь SEQ ID NO: 9 и полноразмерную тяжелую цепь SEQ ID NO: 11.

19. Способ по п. 9, в котором указанное антитело содержит полноразмерную легкую цепь SEQ ID NO: 9 и полноразмерную тяжелую цепь SEQ ID NO: 12.

20. Способ по п. 9, в котором указанное антитело содержит полноразмерную легкую цепь SEQ ID NO: 9 и полноразмерную тяжелую цепь SEQ ID NO: 13.

21. Способ по п. 9, в котором указанное антитело содержит полноразмерную легкую цепь SEQ ID NO: 9 и полноразмерную тяжелую цепь SEQ ID NO: 14.

22. Фармацевтическая композиция для подкожного введения антитела, содержащая анти-CD20-антитело в концентрации в диапазоне от 100 мг/мл до 200 мг/мл и от 2% до 30% циклодекстрина.

23. Композиция по п. 22, в которой циклодекстрин выбран из группы, состоящей из НР-бета-циклодекстрина, НР-гамма-циклодекстрина и SBE-циклодекстрина.

24. Композиция по п. 23, где указанная композиция содержит от 5% до 30% НР-бета-циклодекстрина или НР-гамма-циклодекстрина.

25. Композиция по п. 24, где указанная композиция содержит от 5% до 30% НР-бета-циклодекстрина.

26. Композиция по п. 24, где указанная композиция содержит от 5% до 20% НР-гамма-циклодекстрина.

27. Композиция по п. 26, где указанная композиция дополнительно содержит от 50 мМ до 200 мМ аргининсукцината.

28. Композиция по п. 23, содержащая от 2% до 9% SBE-циклодекстрина.

29. Композиция по п. 22, в которой указанное антитело присутствует в концентрации, составляющей от 100 мг/мл до 150 мг/мл.

30. Композиция по п. 24, содержащая гуманизированное антитело 2H7 в концентрации  
5 100 мг/мл и от 15% до 30% HP-бета-циклодекстрина.

31. Композиция по п. 24, содержащая гуманизированное антитело 2H7 в концентрации 150 мг/мл и 30% HP-бета-циклодекстрина.

32. Композиция по п. 24, содержащая гуманизированное антитело 2H7 в концентрации 150 мг/мл и 10% HP-гамма-циклодекстрина.

10 33. Композиция по п. 32, где указанная композиция дополнительно содержит от 50 мМ до 200 мМ аргининсукцината.

34. Композиция по п. 33, в которой указанное гуманизированное антитело 2H7 содержит:

15     вариабельный домен легкой цепи SEQ ID NO: 1, вариабельный домен тяжелой цепи SEQ ID NO: 2;

        вариабельный домен легкой цепи SEQ ID NO: 3, вариабельный домен тяжелой цепи SEQ ID NO: 4;

        вариабельный домен легкой цепи SEQ ID NO: 3, вариабельный домен тяжелой цепи SEQ ID NO: 5;

20     полноразмерную легкую цепь SEQ ID NO: 6 и полноразмерную тяжелую цепь SEQ ID NO: 7;

        полноразмерную легкую цепь SEQ ID NO: 6 и полноразмерную тяжелую цепь SEQ ID NO: 8;

25     полноразмерную легкую цепь SEQ ID NO: 9 и полноразмерную тяжелую цепь SEQ ID NO: 10;

        полноразмерную легкую цепь SEQ ID NO: 9 и полноразмерную тяжелую цепь SEQ ID NO: 11;

        полноразмерную легкую цепь SEQ ID NO: 9 и полноразмерную тяжелую цепь SEQ ID NO: 12;

30     полноразмерную легкую цепь SEQ ID NO: 9 и полноразмерную тяжелую цепь SEQ ID NO: 13;

        полноразмерную легкую цепь SEQ ID NO: 9 и полноразмерную тяжелую цепь SEQ ID NO: 14; или

35     полноразмерную легкую цепь SEQ ID NO: 6 и полноразмерную тяжелую цепь SEQ ID NO: 15.

35. Композиция по п. 33, дополнительно содержащая 30 мМ ацетата натрия, 5% дигидрата трегалозы и 0,03% полисорбата-20 при pH 5,3.

36. Композиция по п. 35, в которой указанное гуманизированное антитело 2H7 содержит:

40     вариабельный домен легкой цепи SEQ ID NO: 1, вариабельный домен тяжелой цепи SEQ ID NO: 2;

        вариабельный домен легкой цепи SEQ ID NO: 3, вариабельный домен тяжелой цепи SEQ ID NO: 4;

45     вариабельный домен легкой цепи SEQ ID NO: 3, вариабельный домен тяжелой цепи SEQ ID NO: 5;

        полноразмерную легкую цепь SEQ ID NO: 6 и полноразмерную тяжелую цепь SEQ ID NO: 7;

        полноразмерную легкую цепь SEQ ID NO: 6 и полноразмерную тяжелую цепь SEQ



ID NO: 8;

полноразмерную легкую цепь SEQ ID NO: 9 и полноразмерную тяжелую цепь SEQ ID NO: 10;

5 полноразмерную легкую цепь SEQ ID NO: 9 и полноразмерную тяжелую цепь SEQ ID NO: 11;

полноразмерную легкую цепь SEQ ID NO: 9 и полноразмерную тяжелую цепь SEQ ID NO: 12;

полноразмерную легкую цепь SEQ ID NO: 9 и полноразмерную тяжелую цепь SEQ ID NO: 13;

10 полноразмерную легкую цепь SEQ ID NO: 9 и полноразмерную тяжелую цепь SEQ ID NO: 14; или

полноразмерную легкую цепь SEQ ID NO: 6 и полноразмерную тяжелую цепь SEQ ID NO: 15.

37. Композиция по п. 24, где указанная композиция содержит гуманизированное антитело 2H7 в концентрации, составляющей от 100 мг/мл до 150 мг/мл, от 15% до 30% HP-гамма-циклодекстрина и от 50 мМ до 100 мМ аргининсукцината, где гуманизированное антитело 2H7 содержит:

вариабельный домен легкой цепи SEQ ID NO: 1, вариабельный домен тяжелой цепи SEQ ID NO: 2;

20 вариабельный домен легкой цепи SEQ ID NO: 3, вариабельный домен тяжелой цепи SEQ ID NO: 4;

вариабельный домен легкой цепи SEQ ID NO: 3, вариабельный домен тяжелой цепи SEQ ID NO: 5;

25 полноразмерную легкую цепь SEQ ID NO: 6 и полноразмерную тяжелую цепь SEQ ID NO: 7;

полноразмерную легкую цепь SEQ ID NO: 6 и полноразмерную тяжелую цепь SEQ ID NO: 8;

полноразмерную легкую цепь SEQ ID NO: 9 и полноразмерную тяжелую цепь SEQ ID NO: 10;

30 полноразмерную легкую цепь SEQ ID NO: 9 и полноразмерную тяжелую цепь SEQ ID NO: 11;

полноразмерную легкую цепь SEQ ID NO: 9 и полноразмерную тяжелую цепь SEQ ID NO: 12;

35 полноразмерную легкую цепь SEQ ID NO: 9 и полноразмерную тяжелую цепь SEQ ID NO: 13;

полноразмерную легкую цепь SEQ ID NO: 9 и полноразмерную тяжелую цепь SEQ ID NO: 14; или

полноразмерную легкую цепь SEQ ID NO: 6 и полноразмерную тяжелую цепь SEQ ID NO: 15.

40 38. Способ лечения CD20-положительного В-клеточного рака,

предусматривающий введение пациенту с раком терапевтически эффективного количества гуманизированного антитела 2H7 в концентрации, составляющей от 100 мг/мл до 200 мг/мл в составе фармацевтической композиции, содержащей от 2% до 30% циклодекстрина, где циклодекстрин выбран из группы, состоящей из HP-бета-циклодекстрина, HP-гамма-циклодекстрина и SBE-циклодекстрина.

45 39. Способ по п. 38, где CD20-положительный В-клеточный рак является В-клеточной лимфомой или лейкозией.

40. Способ по п. 39, где CD20-положительный В-клеточный рак выбран из группы,

состоящей из неходжкинской лимфомы (НХЛ), рецидивирующей рефрактерной НХЛ и резистентной к ритуксимабу рефрактерной НХЛ, лимфоцит-доминирующей болезни Ходжкина (LPHD), мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы (SLL) и хронической лимфоцитарной лейкемии (ХЛЛ).

- 5 41. Способ по п. 38, где гуманизированное антитело 2H7 содержит:  
вариабельный домен легкой цепи SEQ ID NO: 1, вариабельный домен тяжелой цепи SEQ ID NO: 2;  
вариабельный домен легкой цепи SEQ ID NO: 3, вариабельный домен тяжелой цепи SEQ ID NO: 4;
  - 10 вариабельный домен легкой цепи SEQ ID NO: 3, вариабельный домен тяжелой цепи SEQ ID NO: 5;  
полноразмерную легкую цепь SEQ ID NO: 6 и полноразмерную тяжелую цепь SEQ ID NO: 7;  
полноразмерную легкую цепь SEQ ID NO: 6 и полноразмерную тяжелую цепь SEQ ID NO: 8;
  - 15 полноразмерную легкую цепь SEQ ID NO: 9 и полноразмерную тяжелую цепь SEQ ID NO: 10;  
полноразмерную легкую цепь SEQ ID NO: 9 и полноразмерную тяжелую цепь SEQ ID NO: 11;
  - 20 полноразмерную легкую цепь SEQ ID NO: 9 и полноразмерную тяжелую цепь SEQ ID NO: 12;  
полноразмерную легкую цепь SEQ ID NO: 9 и полноразмерную тяжелую цепь SEQ ID NO: 13;  
полноразмерную легкую цепь SEQ ID NO: 9 и полноразмерную тяжелую цепь SEQ ID NO: 14; или
  - 25 полноразмерную легкую цепь SEQ ID NO: 6 и полноразмерную тяжелую цепь SEQ ID NO: 15.
42. Способ лечения аутоиммунного заболевания,  
предусматривающий введение пациенту с аутоиммунным заболеванием
  - 30 терапевтически эффективного количества гуманизированного антитела 2H7 в концентрации, составляющей от 100 мг/мл до 200 мг/мл в составе фармацевтической композиции, содержащей от 2% до 30% циклодекстрина, где циклодекстрин выбран из группы, состоящей из НР-бета-циклодекстрина, НР-гамма-циклодекстрина и SBE-циклодекстрина.
- 35 43. Способ по п. 42, где аутоиммунное заболевание выбрано из группы, состоящей из ревматоидного артрита (РА) и ювенильного ревматоидного артрита, включая неадекватно реагирующего на метотрексат (Мtx)- и неадекватно реагирующего на антагонист TNF $\alpha$ , системной эритематозной волчанки (СКВ), включая волчаночный нефрит, рассеянного склероза (РС), включая возвратно-ремиттирующий
  - 40 рассеянный склероз (RRMS), гранулематоза Вегенера, воспалительного заболевания кишечника, язвенного колита, идиопатической тромбоцитопенической пурпуры (ИТП), тромботической тромбоцитопенической пурпуры (ТТП), аутоиммунной тромбоцитопении, множественного склероза, псориаза, IgA- нефропатии, IgM-полиневропатий, миастении гравис, ANCA- ассоциированного васкулита, сахарного
  - 45 диабета, синдрома Рейно, синдрома Шегрена, оптиконевромиелита (NMO) и гломерулонефрита.
44. Способ по п. 42, где гуманизированное антитело 2H7 содержит:  
вариабельный домен легкой цепи SEQ ID NO: 1, вариабельный домен тяжелой цепи

SEQ ID NO: 2;

вариабельный домен легкой цепи SEQ ID NO: 3, вариабельный домен тяжелой цепи  
SEQ ID NO: 4;

вариабельный домен легкой цепи SEQ ID NO: 3, вариабельный домен тяжелой цепи  
5 SEQ ID NO: 5;

полноразмерную легкую цепь SEQ ID NO: 6 и полноразмерную тяжелую цепь SEQ  
ID NO: 7;

полноразмерную легкую цепь SEQ ID NO: 6 и полноразмерную тяжелую цепь SEQ  
ID NO: 8;

10 полноразмерную легкую цепь SEQ ID NO: 9 и полноразмерную тяжелую цепь SEQ  
ID NO: 10;

полноразмерную легкую цепь SEQ ID NO: 9 и полноразмерную тяжелую цепь SEQ  
ID NO: 11;

полноразмерную легкую цепь SEQ ID NO: 9 и полноразмерную тяжелую цепь SEQ  
15 ID NO: 12;

полноразмерную легкую цепь SEQ ID NO: 9 и полноразмерную тяжелую цепь SEQ  
ID NO: 13;

полноразмерную легкую цепь SEQ ID NO: 9 и полноразмерную тяжелую цепь SEQ  
ID NO: 14; или

20 полноразмерную легкую цепь SEQ ID NO: 6 и полноразмерную тяжелую цепь SEQ  
ID NO: 15.

45. Способ улучшения или поддерживания растворимости или минимизирования  
преципитации анти-CD20-антитела в водных композициях для подкожного введения  
при их введении в место инъекции у пациента, предусматривающий добавление к водной  
25 композиции для подкожного введения антитела в концентрации, составляющей от 100  
мг/мл до 200 мг/мл и от 2% до 30% циклодекстрина, где циклодекстрин выбран из  
группы, состоящей из HP-бета-циклодекстрина, HP-гамма-циклодекстрина и SBE-  
циклодекстрина.

46. Способ по п. 45, где указанное анти-CD20-антитело содержит:

30 вариабельный домен легкой цепи SEQ ID NO: 1, вариабельный домен тяжелой цепи  
SEQ ID NO: 2;

вариабельный домен легкой цепи SEQ ID NO: 3, вариабельный домен тяжелой цепи  
SEQ ID NO: 4;

вариабельный домен легкой цепи SEQ ID NO: 3, вариабельный домен тяжелой цепи  
35 SEQ ID NO: 5;

полноразмерную легкую цепь SEQ ID NO: 6 и полноразмерную тяжелую цепь SEQ  
ID NO: 7;

полноразмерную легкую цепь SEQ ID NO: 6 и полноразмерную тяжелую цепь SEQ  
ID NO: 8;

40 полноразмерную легкую цепь SEQ ID NO: 9 и полноразмерную тяжелую цепь SEQ  
ID NO: 10;

полноразмерную легкую цепь SEQ ID NO: 9 и полноразмерную тяжелую цепь SEQ  
ID NO: 11;

полноразмерную легкую цепь SEQ ID NO: 9 и полноразмерную тяжелую цепь SEQ  
45 ID NO: 12;

полноразмерную легкую цепь SEQ ID NO: 9 и полноразмерную тяжелую цепь SEQ  
ID NO: 13;

полноразмерную легкую цепь SEQ ID NO: 9 и полноразмерную тяжелую цепь SEQ

ID NO: 14; или

полноразмерную легкую цепь SEQ ID NO: 6 и полноразмерную тяжелую цепь SEQ ID NO: 15.

47. Способ увеличения биодоступности анти-CD20-антитела, предназначенного для подкожного введения, предусматривающий добавление к водной композиции для подкожного введения, содержащей указанное антитело, антитела в концентрации, составляющей от 100 мг/мл до 200 мг/мл и от 2% до 30% циклодекстрина, где циклодекстрин выбран из группы, состоящей из НР-бета-циклодекстрина, НР-гамма-циклодекстрина и SBE-циклодекстрина.

48. Способ по п. 47, где указанное анти-CD20- антитело содержит:

вариабельный домен легкой цепи SEQ ID NO: 1, вариабельный домен тяжелой цепи SEQ ID NO: 2;

вариабельный домен легкой цепи SEQ ID NO: 3, вариабельный домен тяжелой цепи SEQ ID NO: 4;

вариабельный домен легкой цепи SEQ ID NO: 3, вариабельный домен тяжелой цепи SEQ ID NO: 5;

полноразмерную легкую цепь SEQ ID NO: 6 и полноразмерную тяжелую цепь SEQ ID NO: 7;

полноразмерную легкую цепь SEQ ID NO: 6 и полноразмерную тяжелую цепь SEQ ID NO: 8;

полноразмерную легкую цепь SEQ ID NO: 9 и полноразмерную тяжелую цепь SEQ ID NO: 10;

полноразмерную легкую цепь SEQ ID NO: 9 и полноразмерную тяжелую цепь SEQ ID NO: 11;

полноразмерную легкую цепь SEQ ID NO: 9 и полноразмерную тяжелую цепь SEQ ID NO: 12;

полноразмерную легкую цепь SEQ ID NO: 9 и полноразмерную тяжелую цепь SEQ ID NO: 13;

полноразмерную легкую цепь SEQ ID NO: 9 и полноразмерную тяжелую цепь SEQ ID NO: 14; или полноразмерную легкую цепь SEQ ID NO: 6 и полноразмерную тяжелую цепь SEQ ID NO: 15.

## СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> GENENTECH, INC. et al.

<120> СПОСОБ И КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ УМЕНЬШЕНИЯ АГРЕГАЦИИ МАКРОМОЛЕКУЛ  
ПРИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ

<130> P2391R1 WO

<141> 2009-11-16

<150> US 61/115,441

<151> 2008-11-17

<160> 15

<210> 1

<211> 107

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность синтезирована

<400> 1

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

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

Tyr	Met	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Pro
				35					40					45

Leu	Ile	Tyr	Ala	Pro	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg
				50					55					60

Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser
				65					70					75

Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Trp
				80					85					90

Ser	Phe	Asn	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile
				95					100					105

Lys Arg

<210> 2

<211> 122

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность синтезирована

<400> 2

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

Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr
				20					25					30

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

<210> 3  
 <211> 107  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Последовательность синтезирована

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

<210> 4  
 <211> 122  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Последовательность синтезирована

<400> 4

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

Ser Ser

<210> 5  
 <211> 122  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Последовательность синтезирована

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

Ser Ser

<210> 6

<211> 213  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Последовательность синтезирована

<400> 6  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val  
 1 5 10 15  
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser  
 20 25 30  
 Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro  
 35 40 45  
 Leu Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg  
 50 55 60  
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
 65 70 75  
 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp  
 80 85 90  
 Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile  
 95 100 105  
 Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser  
 110 115 120  
 Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu  
 125 130 135  
 Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp  
 140 145 150  
 Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln  
 155 160 165  
 Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu  
 170 175 180  
 Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val  
 185 190 195  
 Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg  
 200 205 210  
 Gly Glu Cys

<210> 7  
 <211> 452  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Последовательность синтезирована

<400> 7  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly  
 1 5 10 15



RU 2 563 823 C2

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

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys  
335 340 345

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg  
350 355 360

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys  
365 370 375

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly  
380 385 390

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser  
395 400 405

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser  
410 415 420

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
425 430 435

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

Gly Lys

<210> 8

<211> 452

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность синтезирована

<400> 8

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr  
20 25 30

Ser Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
35 40 45

Glu Trp Val Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr  
50 55 60

Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser  
65 70 75

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp  
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser  
95 100 105

Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val  
110 115 120

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro  
125 130 135

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu

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

<210> 9  
 <211> 213  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Последовательность синтезирована

<400> 9  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val  
 1 5 10 15  
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser  
 20 25 30  
 Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro  
 35 40 45  
 Leu Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg  
 50 55 60  
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
 65 70 75  
 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp  
 80 85 90  
 Ala Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile  
 95 100 105  
 Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser  
 110 115 120  
 Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu  
 125 130 135  
 Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp  
 140 145 150  
 Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln  
 155 160 165  
 Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu  
 170 175 180  
 Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val  
 185 190 195  
 Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg  
 200 205 210  
 Gly Glu Cys

<210> 10  
 <211> 452  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Последовательность синтезирована

<400> 10

RU 2 563 823 C2

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	1	5	10	15
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	20	25	30	
Ser	Tyr	Asn	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	35	40	45	
Glu	Trp	Val	Gly	Ala	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asn	Gly	Ala	Thr	Ser	Tyr	50	55	60	
Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Lys	Ser	65	70	75	
Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	80	85	90	
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Val	Val	Tyr	Tyr	Ser	Ala	Ser	95	100	105	
Tyr	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	110	115	120	
Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	125	130	135	
Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	140	145	150	
Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	155	160	165	
Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	170	175	180	
Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	185	190	195	
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	200	205	210	
Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	215	220	225	
Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	230	235	240	
Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	245	250	255	
Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	260	265	270	
Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	275	280	285	
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	290	295	300	
Tyr	Asn	Ala	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	305	310	315	
Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn				

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

Gly Lys

<210> 11  
 <211> 452  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Последовательность синтезирована

<400> 11

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

RU 2 563 823 C2

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

Gly Lys

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 452

&lt;212&gt; БЕЛОК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Последовательность синтезирована

&lt;400&gt; 12

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

Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr
				20					25					30

Ser	Tyr	Asn	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu
				35					40					45

Glu	Trp	Val	Gly	Ala	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asn	Gly	Ala	Thr	Ser	Tyr
				50					55					60

Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Lys	Ser
				65					70					75

Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp
				80					85					90

Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Val	Val	Tyr	Tyr	Ser	Ala	Ser
				95					100					105

Tyr	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val
				110					115					120

Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro
				125					130					135

Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu
				140					145					150

Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser
				155					160					165

Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln
				170					175					180

Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser
				185					190					195

Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys
				200					205					210

Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys
				215					220					225

Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu
				230					235					240

Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr
				245					250					255

Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----



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

Gly Lys

<210> 13  
 <211> 452  
 <212> БЕЛОК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Последовательность синтезирована

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

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

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

Gly Lys

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

<220>  
 <223> Последовательность синтезирована

<400> 14

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

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

Gly Lys

<210> 15

<211> 452

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность синтезирована

<400> 15

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

RU 2 563 823 C2

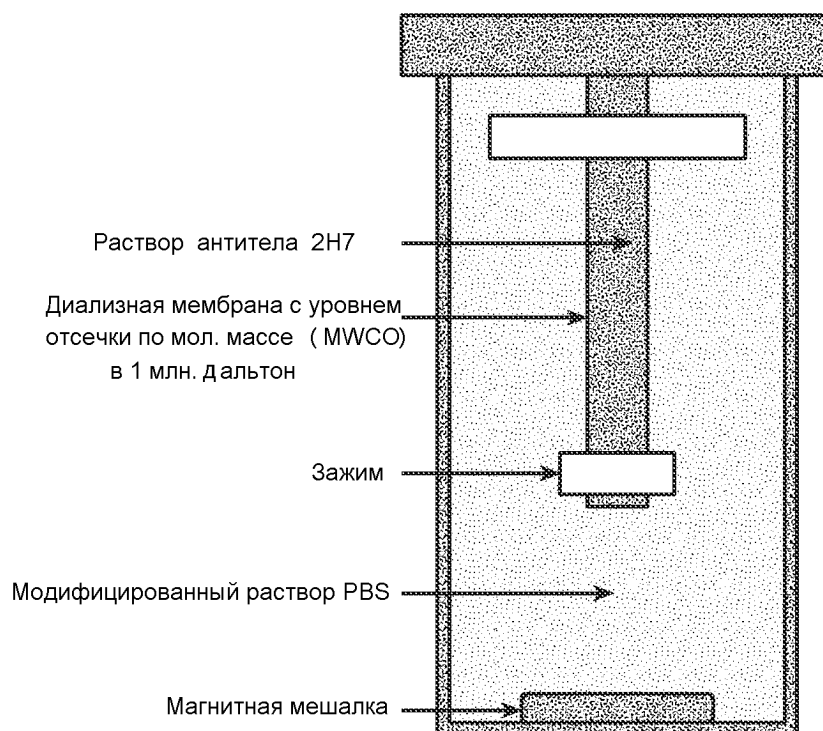
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr			
				20						25					30		
Ser	Tyr	Asn	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu			
				35						40					45		
Glu	Trp	Val	Gly	Ala	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asn	Gly	Asp	Thr	Ser	Tyr			
				50						55					60		
Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile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

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

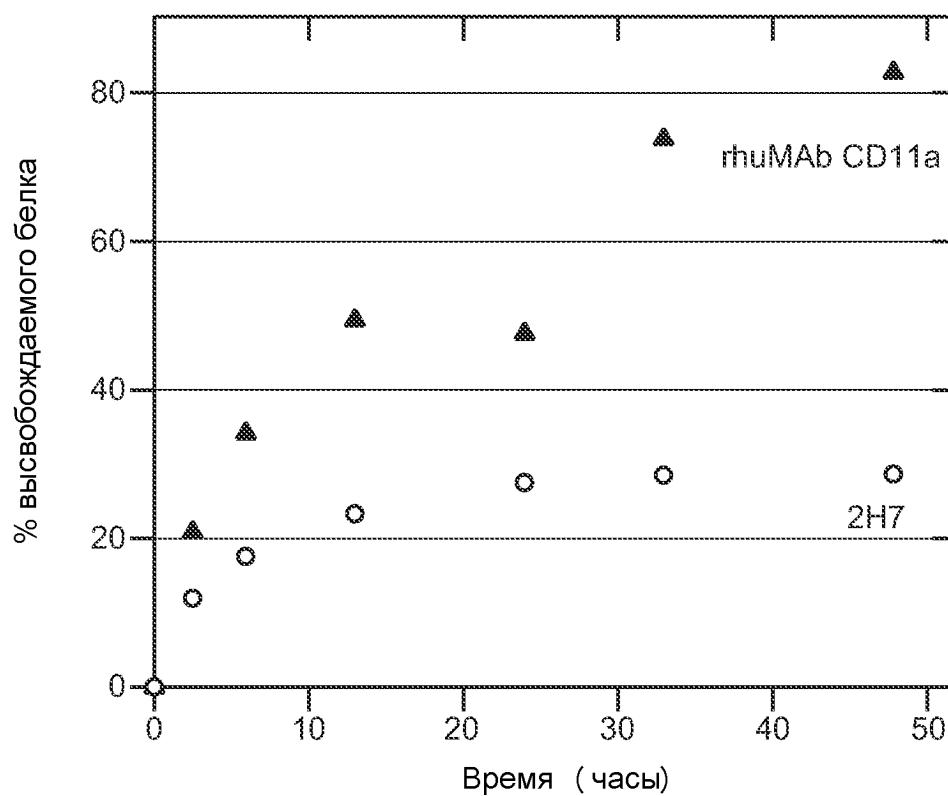
Gly Lys



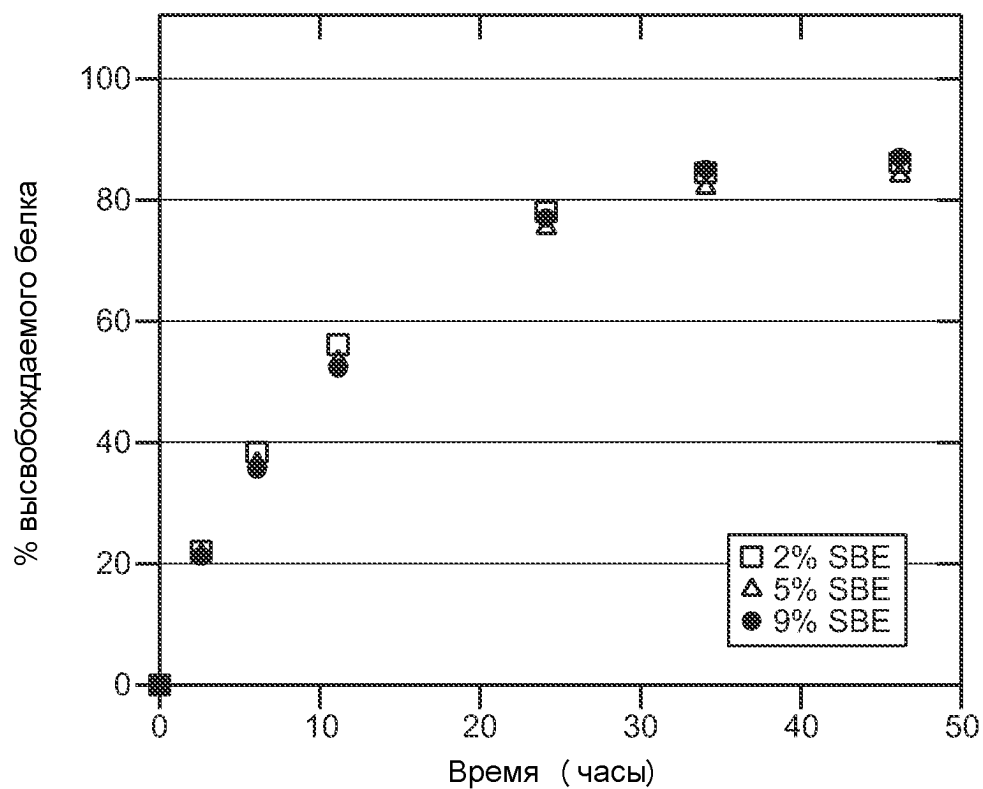
**ФИГ. 1**



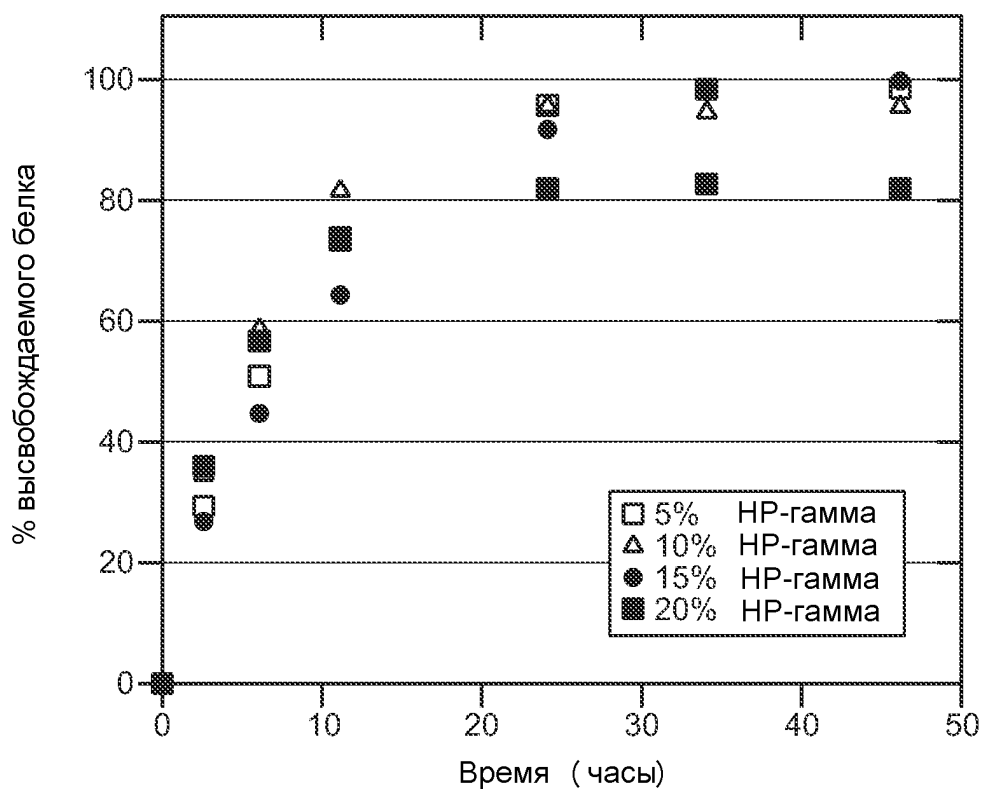
**Фиг. 2**



**Фиг. 3**

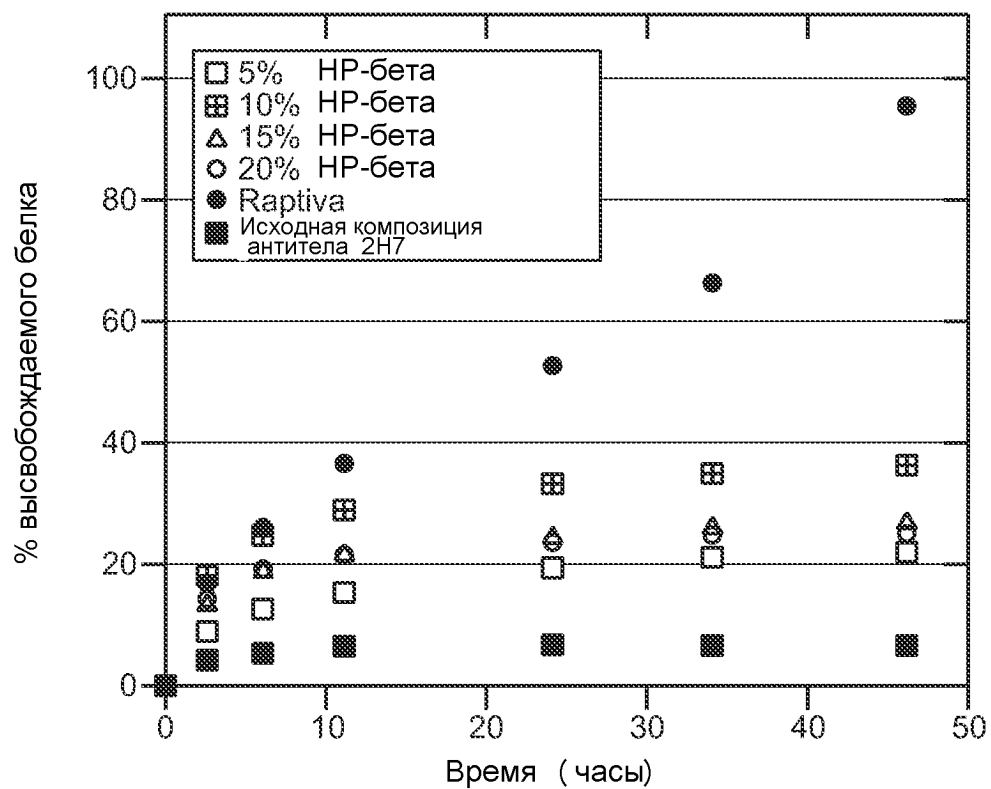


Фиг. 4

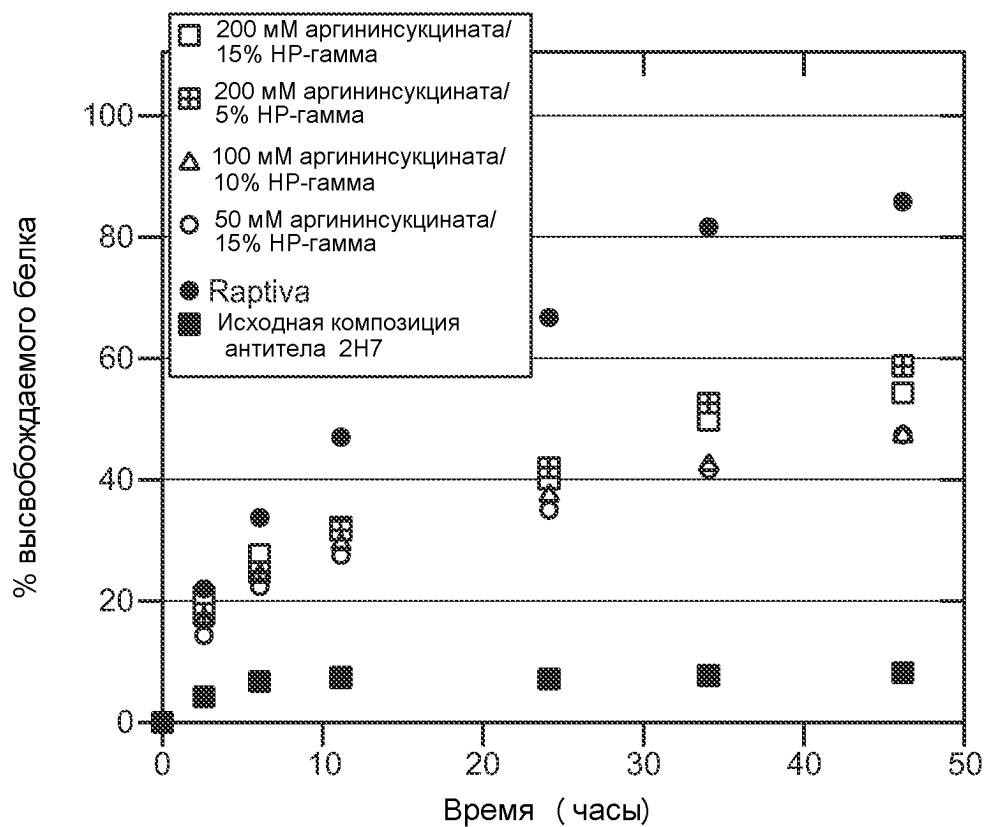


Фиг. 5





Фиг. 6



Фиг. 7