



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 9/08 (2019.08); A61K 39/395 (2019.08); A61K 47/26 (2019.08); C07K 16/22 (2019.08); A61P 35/00 (2019.08)

(21)(22) Заявка: 2017112703, 15.09.2015

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
15.09.2015

Дата регистрации:  
30.10.2019

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
15.09.2014 US 62/050,739

(43) Дата публикации заявки: 17.10.2018 Бюл. № 29

(45) Опубликовано: 30.10.2019 Бюл. № 31

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на  
национальной фазе: 17.04.2017

(86) Заявка РСТ:  
US 2015/050278 (15.09.2015)

(87) Публикация заявки РСТ:  
WO 2016/044334 (24.03.2016)

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

(72) Автор(ы):

ЛЕ Лан (US),  
КОННОЛЛИ Брайан (US)

(73) Патентообладатель(и):

ДЖЕНЕНТЕК, ИНК. (US)

(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: RU 2426554 C2, 20.08.2011. WO  
2013063510 A1, 02.05.2013. WO 2011029892 A2,  
17.03.2011.

## (54) СОСТАВЫ НА ОСНОВЕ АНТИТЕЛ

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к фармации, в частности к стабильным водным фармацевтическим составам, содержащим терапевтическое антитело, трегалозу и буфер. Состав содержит моноклональное антитело, трегалозу и буфер, где массовое соотношение указанного моноклонального антитела и указанной трегалозы в составе больше или равно 0,49 и меньше или равно 1,47, где рН состава составляет от 5,5 до 7,0, где состав хранят при -20°C или -40°C по меньшей мере 6 месяцев и где

моноклональное антитело связывается с VEGF. Также раскрыто изделие для лечения ангиогенного нарушения у пациента. Группа изобретений также относится к способам уменьшения агрегации терапевтического моноклонального антитела. Группа изобретений позволяет получить стабильные водные фармацевтические составы, которые показывают низкую агрегацию белка и низкую кристаллизацию трегалозы при длительном замороженном хранении. 9 н. и 67 з.п. ф-лы, 8 ил.,

R U 2 7 0 4 6 1 1 C 2

R U 2 7 0 4 6 1 1 C 2



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

*A61K 9/08* (2006.01)*A61K 39/395* (2006.01)*A61K 47/26* (2006.01)*C07K 16/22* (2006.01)*A61P 35/00* (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

*A61K 9/08* (2019.08); *A61K 39/395* (2019.08); *A61K 47/26* (2019.08); *C07K 16/22* (2019.08); *A61P 35/00* (2019.08)

(21)(22) Application: **2017112703, 15.09.2015**

(24) Effective date for property rights:  
**15.09.2015**

Registration date:  
**30.10.2019**

Priority:

(30) Convention priority:  
**15.09.2014 US 62/050,739**

(43) Application published: **17.10.2018 Bull. № 29**(45) Date of publication: **30.10.2019 Bull. № 31**(85) Commencement of national phase: **17.04.2017**

(86) PCT application:  
**US 2015/050278 (15.09.2015)**

(87) PCT publication:  
**WO 2016/044334 (24.03.2016)**

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

(72) Inventor(s):

**LE, Lan (US),  
CONNOLLY, Brian (US)**

(73) Proprietor(s):

**GENENTECH, INC. (US)**

(54) **ANTIBODY-BASED FORMULATIONS**

(57) Abstract:

FIELD: medicine; pharmaceuticals.

SUBSTANCE: group of inventions relates to pharmacy, particularly to stable aqueous pharmaceutical compositions containing a therapeutic antibody, trehalose and a buffer. Composition comprises a monoclonal antibody, trehalose and a buffer, wherein the weight ratio of said monoclonal antibody and said trehalose in the composition is greater than or equal to 0.49 and less than or equal to 1.47, where the pH of the composition ranges from 5.5 to 7.0, where the composition is stored at -20 °C or -40 °C for at least

6 months and where the monoclonal antibody binds to VEGF. Also disclosed is an article for treating angiogenic disorder in a patient. Group of inventions also relates to methods for reducing aggregation of therapeutic monoclonal antibody.

EFFECT: group of inventions enables to obtain stable aqueous pharmaceutical compositions which show low protein aggregation and low crystallisation of trehalose in prolonged frozen storage.

76 cl, 8 dwg, 3 tbl, 5 ex

## ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] В данной заявке заявляется приоритет по предварительной заявке на выдачу патента США с серийным номером 62/050739, поданной 15 сентября 2014 г., которая включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

## ПРЕДСТАВЛЕНИЕ СПИСКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ В ТЕКСТОВОМ ФАЙЛЕ ФОРМАТА ASCII

[0002] Содержание следующего представления в текстовом файле формата ASCII включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме: машиночитаемая форма (CRF) списка последовательностей (название файла: 146392028240SEQLIST.txt, дата регистрации: 3 сентября 2015 г., размер: 29 КБ).

Область изобретения

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

## УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0004] За последние годы с достижениями в области биотехнологии стало возможным получение различных белков для фармацевтической промышленности с использованием методов рекомбинантной ДНК. Ввиду того, что белки больше и сложнее, чем традиционные органические и неорганические лекарственные вещества (например, обладающие различными функциональными группами помимо сложных структур), получение состава на основе таких белков связано с особыми проблемами. Чтобы входящий с состав белок оставался биологически активным, необходимо обеспечить сохранение нативной конформации по крайней мере его основной аминокислотной цепи, тем самым обеспечивая защиту различных функциональных групп белка от деградации. Пути деградации в случае белков могут включать химическую нестабильность (например, любой процесс, который включает модификацию белка путем образования связи или расщепления, в результате чего образуется новое химическое соединение) или физическую нестабильность (например, изменения в структуре белка более высокого порядка). Химическая нестабильность может происходить в результате дезамидирования, рацемизации, гидролиза, окисления, реакций β-элиминации и дисульфидного обмена. Физическая нестабильность может происходить, например, в результате денатурации, агрегации, преципитации или адсорбции. Тремя наиболее распространенными путями деградации белков являются агрегация, дезамидирование и окисление белков. Cleland et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 10(4):307-377 (1993).

[0005] Белки, используемые в фармацевтической промышленности, включают антитела. Были разработаны стабильные водные составы фармацевтических препаратов антител. См., например, WO 2011/084750. В данной области все еще существует потребность в стабильном водном фармацевтическом составе, содержащем антитело, как, например, антитело к VEGF и антитело к CD20, который уменьшает образование димеров, растворимых агрегатов и твердых частиц.

## СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0006] В одном аспекте настоящее изобретение относится к стабильному водному фармацевтическому составу, причем состав содержит моноклональное антитело, трегалозу и буфер, при этом массовое соотношение моноклонального антитела и трегалозы в составе больше, чем или равно 0,41 и меньше, чем 1,65, и при этом состав имеет pH от около 5,5 до около 7,0. В некоторых вариантах реализации изобретения массовое соотношение моноклонального антитела и трегалозы составляет от 0,49 до 1,47. В некоторых вариантах реализации изобретения массовое соотношение

моноклонального антитела и трегалозы составляет от 0,41 до 0,73. В некоторых вариантах реализации изобретения массовое соотношение моноклонального антитела и трегалозы составляет от 0,73 до 1,47. В некоторых вариантах реализации изобретения используется любое массовое соотношение моноклонального антитела и трегалозы из 0,41, 0,45, 0,50, 0,55, 0,60, 0,65, 0,70, 0,75, 0,80, 0,85, 0,90, 0,95, 1,00, 1,05, 1,10, 1,15, 1,20, 1,25, 1,30, 1,35, 1,40, 1,45, 1,50, 1,55, 1,60 и 1,64, в том числе все промежуточные значения. В некоторых вариантах реализации изобретения количество моноклонального антитела в составе составляет от около 25 мг/мл до около 100 мг/мл. В некоторых вариантах реализации изобретения количество моноклонального антитела в составе составляет от около 45 мг/мл до около 55 мг/мл. В некоторых вариантах реализации изобретения количество моноклонального антитела в составе составляет от около 35 мг/мл до около 75 мг/мл. В некоторых вариантах реализации изобретения трегалоза содержится в составе в количестве от около 45 мМ до около 634 мМ. В некоторых вариантах реализации изобретения трегалоза содержится в составе в количестве от около 50 мМ до около 600 мМ. В некоторых вариантах реализации изобретения трегалоза содержится в составе в количестве от около 150 мМ до около 400 мМ. В некоторых вариантах реализации изобретения трегалоза содержится в составе в количестве от около 45 мМ до около 135 мМ. В некоторых вариантах реализации изобретения трегалоза содержится в составе в количестве от около 180 мМ до около 634 мМ. В некоторых вариантах реализации изобретения буфер содержится в количестве от около 15 мМ до около 100 мМ. В некоторых вариантах реализации изобретения буфер содержится в количестве от около 35 мМ до около 100 мМ. В некоторых вариантах реализации буфер содержит гистидин (например, ацетат гистидина, гидрохлорид гистидина) или фосфат (например, фосфат натрия).

[0007] В другом аспекте настоящее изобретение относится к стабильным водным фармацевтическим составам, содержащим (а) моноклональное антитело в количестве от около 25 мг/мл до около 100 мг/мл; (b) трегалозу в количестве от около 45 до около 634 мМ; и (с) фосфат натрия в количестве большем, чем 35 мМ до около 100 мМ, причем указанный состав имеет рН от около 5,5 до около 7,0, и при этом массовое соотношение указанного моноклонального антитела и указанной трегалозы в составе больше, чем или равно 0,41 и меньше, чем 1,65, и опционально поверхностно-активное вещество. В некоторых вариантах реализации изобретения массовое соотношение моноклонального антитела и трегалозы в составе составляет от 0,41 до 0,73. В некоторых вариантах реализации изобретения массовое соотношение моноклонального антитела и трегалозы составляет от 0,73 до 1,47. В некоторых вариантах реализации изобретения массовое соотношение моноклонального антитела и трегалозы составляет от 0,49 до 1,47. В некоторых вариантах реализации изобретения используется любое массовое соотношение моноклонального антитела и трегалозы из 0,41, 0,45, 0,50, 0,55, 0,60, 0,65, 0,70, 0,75, 0,80, 0,85, 0,90, 0,95, 1,00, 1,05, 1,10, 1,15, 1,20, 1,25, 1,30, 1,35, 1,40, 1,45, 1,50, 1,55, 1,60 и 1,64, в том числе все промежуточные значения.

[0008] В другом аспекте настоящее изобретение относится к стабильному водному фармацевтическому составу, причем состав содержит (а) антитело (например, моноклональное антитело) в количестве меньше, чем или равно около 100 мг/мл; и (b) трегалозу в количестве от около 150 мМ до около 400 мМ, причем указанный состав имеет рН от около 5,5 до около 7,0, и при этом массовое соотношение указанного моноклонального антитела и указанной трегалозы в составе больше, чем или равно 0,41 и меньше, чем 1,65. В некоторых вариантах реализации изобретения состав предназначен для подкожного введения. В некоторых вариантах реализации изобретения

состав предназначен для интраокулярного введения. В некоторых вариантах реализации изобретения состав является изотоническим. В некоторых вариантах реализации изобретения состав имеет осмоляльность более чем около 240 мосмоль/кг.

5 [0009] В другом аспекте настоящее изобретение относится к стабильному водному фармацевтическому составу, причем состав содержит (а) антитело (например, моноклональное антитело) в количестве меньше, чем или равно около 100 мг/мл; и (b) трегалозу в количестве от около 50 мМ до около 600 мМ, причем указанный состав имеет рН от около 5,5 до около 7,0, и при этом массовое соотношение указанного моноклонального антитела и указанной трегалозы в составе больше, чем или равно  
10 0,41 и меньше, чем 1,65. В некоторых вариантах реализации изобретения состав предназначен для внутривенного введения.

[0010] В некоторых вариантах реализации изобретения моноклональное антитело в составе, описанном в данном документе, содержится в количестве от около 30 мг/мл до около 90 мг/мл, от около 35 мг/мл до около 85 мг/мл, от около 35 мг/мл до 75 мг/  
15 мл, от около 40 мг/мл до около 80 мг/мл, от около 45 до около 70 мг/мл или от около 45 мг/мл до около 55 мг/мл. В некоторых вариантах реализации изобретения моноклональное антитело в составе содержится в количестве около 25 мг/мл, около 30 мг/мл, около 35 мг/мл, около 40 мг/мл, около 45 мг/мл, около 50 мг/мл, около 55 мг/мл, около 60 мг/мл, около 65 мг/мл, около 70 мг/мл, около 75 мг/мл, около 80 мг/мл,  
20 около 85 мг/мл, около 90 мг/мл, около 95 мг/мл или около 100 мг/мл, в том числе все промежуточные значения. В некоторых вариантах реализации изобретения моноклональное антитело в составе содержится в количестве около 45 мг/мл, около 50 мг/мл или 55 мг/мл.

[0011] В некоторых вариантах реализации изобретения состав, описанный в данном документе, содержит трегалозу в количестве от около 45 мМ до около 600 мМ, от  
25 около 45 мМ до около 550 мМ, от около 45 мМ до около 500 мМ, от около 45 мМ до около 450 мМ, от около 45 мМ до около 400 мМ, от около 45 мМ до около 350 мМ, от около 45 мМ до около 300 мМ, от около 45 мМ до около 250 мМ, от около 45 мМ до около 200 мМ, от около 45 мМ до около 180 мМ, от около 45 мМ до около 150 мМ,  
30 от около 45 мМ до около 140 мМ, от около 45 мМ до около 135 мМ, от около 45 мМ до около 130 мМ, от около 45 мМ до около 120 мМ, от около 45 мМ до около 110 мМ, от около 45 мМ до около 100 мМ, от около 180 мМ до около 634 мМ, от около 50 мМ до около 600 мМ или от около 150 мМ до около 400 мМ. В некоторых вариантах реализации изобретения трегалоза содержится в составе в количестве около 45 мМ,  
35 около 50 мМ, около 60 мМ, около 70 мМ, около 80 мМ, около 90 мМ, около 100 мМ, около 110 мМ, около 120 мМ, около 130 мМ, около 135 мМ, около 140 мМ, около 150 мМ, около 180 мМ, около 200 мМ, около 250 мМ, около 300 мМ, около 350 мМ, около 400 мМ, около 450 мМ, около 500 мМ, около 550 мМ, около 600 мМ, около 610 мМ, около 620 мМ, около 630 мМ или около 634 мМ, в том числе все промежуточные значения. В некоторых вариантах реализации изобретения состав содержит фосфат (например, фосфат натрия) в качестве буфера. В некоторых вариантах реализации изобретения фосфатный буфер (например, фосфат натрия) в составе содержится в количестве от около 15 мМ до около 30 мМ, от около 20 мМ до 30 мМ, от около 22 мМ до около 28 мМ, больше чем 35 мМ до около 100 мМ, от около 40 мМ до около  
45 100 мМ, от около 45 мМ до около 90 мМ, от около 50 мМ до около 75 мМ или от около 15 мМ до около 100 мМ. В некоторых вариантах реализации изобретения фосфат (например, фосфат натрия) в составе содержится в количестве около 15 мМ, около 20 мМ, около 22 мМ, около 25 мМ, около 28 мМ, около 30 мМ, около 35 мМ, около 36

мМ, около 40 мМ, около 45 мМ, около 50 мМ, около 51 мМ, около 55 мМ, около 60 мМ, около 65 мМ, около 70 мМ, около 75 мМ, около 80 мМ, около 85 мМ, около 90 мМ, около 95 мМ или около 100 мМ, в том числе все промежуточные значения. В некоторых вариантах реализации изобретения состав содержит гистидин (как, например, L-гистидин) в качестве буфера. В некоторых вариантах реализации изобретения гистидин в составе содержится в количестве от около 15 мМ до около 30 мМ, от около 20 мМ до 30 мМ, от около 22 мМ до около 28 мМ, больше чем 35 мМ до около 100 мМ, от около 40 мМ до около 100 мМ, от около 45 мМ до около 90 мМ, от около 50 мМ до около 75 мМ или от около 15 мМ до около 100 мМ. В некоторых вариантах реализации изобретения гистидин в составе содержится в количестве около 15 мМ, около 20 мМ, около 22 мМ, около 25 мМ, около 28 мМ, около 30 мМ, около 35 мМ, около 36 мМ, около 40 мМ, около 45 мМ, около 50 мМ, около 51 мМ, около 55 мМ, около 60 мМ, около 65 мМ, около 70 мМ, около 75 мМ, около 80 мМ, около 85 мМ, около 90 мМ, около 95 мМ или около 100 мМ, в том числе все промежуточные значения.

[0012] В некоторых вариантах реализации изобретения состав, описанный в данном документе, содержит поверхностно-активное вещество. В некоторых вариантах реализации изобретения поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат (как, например, полисорбат 20) или полоксамер (как, например, полоксамер 188). В некоторых вариантах реализации изобретения концентрация поверхностно-активного вещества составляет от около 0,01% до около 0,1%, от около 0,01% до около 0,05% или от около 0,02% до около 0,04%. В некоторых вариантах реализации изобретения концентрация поверхностно-активного вещества составляет около 0,01%, около 0,02%, около 0,03%, около 0,04%, около 0,05% или около 0,1%, в том числе все промежуточные значения.

[0013] В некоторых вариантах реализации изобретения состав, описанный в данном документе, имеет pH от около 5,5 до около 6,5, от около 5,8 до около 6,8, от около 5,9 до около 6,5, от около 6,0 до около 6,5, от около 6,0 до около 6,4 или от около 6,0 до около 6,2. В некоторых вариантах реализации изобретения состав имеет pH около 5,6, около 5,8, около 5,9, около 6,0, около 6,2, около 6,4, около 6,5, около 6,8 или около 7,0, в том числе все промежуточные значения.

[0014] В некоторых вариантах реализации изобретения моноклональное антитело в составе, описанном в данном документе, предварительно не подвергают лиофилизации. В некоторых вариантах реализации изобретения моноклональное антитело представляет собой полноразмерное антитело. В некоторых вариантах реализации изобретения моноклональное антитело представляет собой антитело IgG1, IgG2 или IgG4. В некоторых вариантах реализации изобретения моноклональное антитело представляет собой гуманизированное антитело, химерное антитело или человеческое антитело. В некоторых вариантах реализации изобретения моноклональное антитело представляет собой фрагмент антитела, содержащий антигенсвязывающий участок. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагмент антитела представляет собой Fab- или F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент. В некоторых вариантах реализации изобретения моноклональное антитело связывает VEGF. В некоторых вариантах реализации изобретения моноклональное антитело представляет собой бевацизумаб. В некоторых вариантах реализации изобретения моноклональное антитело подвержено агрегации.

[0015] В некоторых вариантах реализации изобретения моноклональное антитело в составе, описанном в данном документе, предварительно не подвергают лиофилизации. В некоторых вариантах реализации изобретения моноклональное антитело представляет собой полноразмерное антитело. В некоторых вариантах реализации изобретения

моноклональное антитело представляет собой антитело IgG1, IgG2 или IgG4. В некоторых вариантах реализации изобретения моноклональное антитело представляет собой гуманизированное антитело, химерное антитело или человеческое антитело. В некоторых вариантах реализации изобретения моноклональное антитело представляет собой фрагмент антитела, содержащий антигенсвязывающий участок. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагмент антитела представляет собой Fab- или F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент. В некоторых вариантах реализации изобретения моноклональное антитело связывает CD20. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело, что связывает CD20, представляет собой гуманизированное антитело B-Ly1, описанное в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело, что связывает CD20, представляет собой антитело, содержащее аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID NO:3 до SEQ ID NO:19, и аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO:20. В некоторых вариантах реализации изобретения моноклональное антитело представляет собой обинутузумаб. В некоторых вариантах реализации изобретения моноклональное антитело подвержено агрегации.

[0016] В некоторых вариантах реализации изобретения состав стабилен при -20°C в течение по меньшей мере около 6 месяцев, по меньшей мере около 12 месяцев, по меньшей мере около 15 месяцев, по меньшей мере около 18 месяцев, по меньшей мере около 19 месяцев, по меньшей мере около 20 месяцев или по меньшей мере около 2 лет. В некоторых вариантах реализации изобретения состав является стерильным. В некоторых вариантах реализации изобретения состав предназначен для введения субъекту. В некоторых вариантах реализации изобретения состав предназначен для внутривенного (IV), подкожного (SQ), интраокулярного (IO) или внутримышечного (IM) введения.

[0017] В другом аспекте настоящее изобретение относится к изделию, содержащему емкость для хранения стабильного водного фармацевтического состава, описанного в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения состав содержит моноклональное антитело, трегалозу и буфер, причем массовое соотношение указанного моноклонального антитела и указанной трегалозы в составе больше, чем или равно 0,41 и меньше, чем 1,65, и при этом состав имеет pH от около 5,5 до около 7,0. В некоторых вариантах реализации изобретения состав содержит (а) моноклональное антитело в количестве от около 25 мг/мл до около 100 мг/мл; (b) трегалозу в количестве от около 45 до около 634 мМ; и (с) фосфат натрия в количестве больше, чем 35 мМ до около 100 мМ, причем указанный состав имеет pH от около 5,5 до около 7,0, и при этом массовое соотношение указанного моноклонального антитела и указанной трегалозы в составе больше, чем или равно 0,41 и меньше, чем 1,6, и опционально поверхностно-активное вещество. В некоторых вариантах реализации изобретения массовое соотношение моноклонального антитела и трегалозы в составе составляет от 0,41 до 0,73. В некоторых вариантах реализации изобретения массовое соотношение моноклонального антитела и трегалозы составляет от 0,73 до 1,47. В некоторых вариантах реализации изобретения массовое соотношение моноклонального антитела и трегалозы составляет от 0,49 до 1,47. В некоторых вариантах реализации изобретения используется любое массовое соотношение моноклонального антитела и трегалозы из 0,41, 0,45, 0,50, 0,55, 0,60, 0,65, 0,70, 0,75, 0,80, 0,85, 0,90, 0,95, 1,00, 1,05, 1,10, 1,15, 1,20, 1,25, 1,30, 1,35, 1,40, 1,45, 1,50, 1,55, 1,60 и 1,64, в том числе все промежуточные значения.

[0018] В некоторых вариантах реализации изобретения моноклональное антитело в составе содержится в количестве от около 30 мг/мл до около 90 мг/мл, от около 35 мг/



мл до около 85 мг/мл, от около 35 мг/мл до 75 мг/мл, от около 40 мг/мл до около 80 мг/мл, от около 45 до около 70 мг/мл или от около 45 мг/мл до около 55 мг/мл. В некоторых вариантах реализации изобретения моноклональное антитело в составе содержится в количестве около 25 мг/мл, около 30 мг/мл, около 35 мг/мл, около 40 мг/мл, около 45 мг/мл, около 50 мг/мл, около 55 мг/мл, около 60 мг/мл, около 65 мг/мл, около 70 мг/мл, около 75 мг/мл, около 80 мг/мл, около 85 мг/мл, около 90 мг/мл, около 95 мг/мл или около 100 мг/мл, в том числе все промежуточные значения. В некоторых вариантах реализации изобретения моноклональное антитело в составе содержится в количестве около 45 мг/мл, около 50 мг/мл или 55 мг/мл.

**[0019]** В некоторых вариантах реализации изобретения состав содержит трегалозу в количестве от около 45 мМ до около 600 мМ, от около 45 мМ до около 550 мМ, от около 45 мМ до около 500 мМ, от около 45 мМ до около 450 мМ, от около 45 мМ до около 400 мМ, от около 45 мМ до около 350 мМ, от около 45 мМ до около 300 мМ, от около 45 мМ до около 250 мМ, от около 45 мМ до около 200 мМ, от около 45 мМ до около 180 мМ, от около 45 мМ до около 150 мМ, от около 45 мМ до около 140 мМ, от около 45 мМ до около 135 мМ, от около 45 мМ до около 130 мМ, от около 45 мМ до около 120 мМ, от около 45 мМ до около 110 мМ, от около 45 мМ до около 100 мМ, от около 180 мМ до около 634 мМ, от около 50 мМ до около 600 мМ или от около 150 мМ до около 400 мМ. В некоторых вариантах реализации изобретения трегалоза содержится в составе в количестве около 45 мМ, около 50 мМ, около 60 мМ, около 70 мМ, около 80 мМ, около 90 мМ, около 100 мМ, около 110 мМ, около 120 мМ, около 130 мМ, около 135 мМ, около 140 мМ, около 150 мМ, около 180 мМ, около 200 мМ, около 250 мМ, около 300 мМ, около 350 мМ, около 400 мМ, около 450 мМ, около 500 мМ, около 550 мМ, около 600 мМ, около 610 мМ, около 620 мМ, около 630 мМ или около 634 мМ, в том числе все промежуточные значения. В некоторых вариантах реализации изобретения состав содержит фосфат натрия в качестве буфера. В некоторых вариантах реализации изобретения фосфат натрия в составе содержится в количестве от около 15 мМ до около 30 мМ, от около 20 мМ до 30 мМ, от около 22 мМ до около 28 мМ, больше чем 35 мМ до около 100 мМ, от около 40 мМ до около 100 мМ, от около 45 мМ до около 90 мМ, от около 50 мМ до около 75 мМ или от около 15 мМ до около 100 мМ. В некоторых вариантах реализации изобретения фосфат натрия в составе содержится в количестве около 15 мМ, около 20 мМ, около 22 мМ, около 25 мМ, около 28 мМ, около 30 мМ, около 35 мМ, около 36 мМ, около 40 мМ, около 45 мМ, около 50 мМ, около 51 мМ, около 55 мМ, около 60 мМ, около 65 мМ, около 70 мМ, около 75 мМ, около 80 мМ, около 85 мМ, около 90 мМ, около 95 мМ или около 100 мМ, в том числе все промежуточные значения. В некоторых вариантах реализации изобретения состав содержит гистидин (как, например, L-гистидин) в качестве буфера. В некоторых вариантах реализации изобретения гистидин в составе содержится в количестве от около 15 мМ до около 30 мМ, от около 20 мМ до 30 мМ, от около 22 мМ до около 28 мМ, больше чем 35 мМ до около 100 мМ, от около 40 мМ до около 100 мМ, от около 45 мМ до около 90 мМ, от около 50 мМ до около 75 мМ или от около 15 мМ до около 100 мМ. В некоторых вариантах реализации изобретения гистидин в составе содержится в количестве около 15 мМ, около 20 мМ, около 22 мМ, около 25 мМ, около 28 мМ, около 30 мМ, около 35 мМ, около 36 мМ, около 40 мМ, около 45 мМ, около 50 мМ, около 51 мМ, около 55 мМ, около 60 мМ, около 65 мМ, около 70 мМ, около 75 мМ, около 80 мМ, около 85 мМ, около 90 мМ, около 95 мМ или около 100 мМ, в том числе все промежуточные значения.

**[0020]** В некоторых вариантах реализации изобретения состав дополнительно содержит

поверхностно-активное вещество. В некоторых вариантах реализации изобретения поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат (как, например, полисорбат 20) или полоксамер (как, например, полоксамер 188). В некоторых вариантах реализации изобретения концентрация поверхностно-активного вещества составляет от около 0,01% до около 0,1%, от около 0,01% до около 0,05% или от около 0,02% до около 0,04%. В некоторых вариантах реализации изобретения концентрация поверхностно-активного вещества составляет около 0,01%, около 0,02%, около 0,03%, около 0,04%, около 0,05% или около 0,1%, в том числе все промежуточные значения.

[0021] В некоторых вариантах реализации изобретения состав имеет рН от около 5,5 до около 6,5, от около 5,8 до около 6,8, от около 5,9 до около 6,5, от около 6,0 до около 6,5, от около 6,0 до около 6,4 или от около 6,0 до около 6,2. В некоторых вариантах реализации изобретения состав имеет рН около 5,6, около 5,8, около 5,9, около 6,0, около 6,2, около 6,4, около 6,5, около 6,8 или около 7,0, в том числе все промежуточные значения.

[0022] В некоторых вариантах реализации изобретения моноклональное антитело предварительно не подвергают лиофилизации. В некоторых вариантах реализации изобретения моноклональное антитело представляет собой полноразмерное антитело. В некоторых вариантах реализации изобретения моноклональное антитело представляет собой антитело IgG1, IgG2 или IgG4. В некоторых вариантах реализации изобретения моноклональное антитело представляет собой гуманизированное антитело, химерное антитело или человеческое антитело. В некоторых вариантах реализации изобретения моноклональное антитело представляет собой фрагмент антитела, содержащий антигенсвязывающий участок. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагмент антитела представляет собой Fab- или F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент. В некоторых вариантах реализации изобретения моноклональное антитело связывает VEGF. В некоторых вариантах реализации изобретения моноклональное антитело представляет собой бевацизумаб. В некоторых вариантах реализации изобретения моноклональное антитело подвержено агрегации.

[0023] В некоторых вариантах реализации изобретения моноклональное антитело предварительно не подвергают лиофилизации. В некоторых вариантах реализации изобретения моноклональное антитело представляет собой полноразмерное антитело. В некоторых вариантах реализации изобретения моноклональное антитело представляет собой антитело IgG1, IgG2 или IgG4. В некоторых вариантах реализации изобретения моноклональное антитело представляет собой гуманизированное антитело, химерное антитело или человеческое антитело. В некоторых вариантах реализации изобретения моноклональное антитело представляет собой фрагмент антитела, содержащий антигенсвязывающий участок. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагмент антитела представляет собой Fab- или F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент. В некоторых вариантах реализации изобретения моноклональное антитело связывает CD20. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело, что связывает CD20, представляет собой гуманизированное антитело B-Ly1, описанное в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело, что связывает CD20, представляет собой антитело, содержащее аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID NO:3 до SEQ ID NO:19, и аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO:20. В некоторых вариантах реализации изобретения моноклональное антитело представляет собой обинутузумаб. В некоторых вариантах реализации изобретения моноклональное антитело подвержено агрегации.

[0024] В некоторых вариантах реализации изобретения состав стабилен при -20°C в течение по меньшей мере около 6 месяцев, по меньшей мере около 12 месяцев, по меньшей мере около 15 месяцев, по меньшей мере около 18 месяцев, по меньшей мере около 19 месяцев, по меньшей мере около 20 месяцев или по меньшей мере около 2 лет.

5 В некоторых вариантах реализации изобретения состав является стерильным. В некоторых вариантах реализации изобретения состав предназначен для введения субъекту. В некоторых вариантах реализации изобретения состав предназначен для внутривенного (IV), подкожного (SQ), интраокулярного (IO) или внутримышечного (IM) введения.

10 [0025] В некоторых вариантах реализации изобретения емкость представляет собой флакон с пробкой, которую можно проколоть иглой шприца, причем флакон содержит любой из составов, описанных в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения флакон хранят при около 2-8°C. В некоторых вариантах реализации изобретения флакон хранят при около -20°C. В некоторых вариантах реализации

15 изобретения флакон представляет собой флакон вместимостью 3 мл, 20 мл или 50 мл.

[0026] В другом аспекте настоящее изобретение относится к контейнерам из нержавеющей стали, содержащим любой из составов, описанных в данном документе, внутри контейнера. В некоторых вариантах реализации изобретения состав замораживают.

20 [0027] В другом аспекте настоящее изобретение относится к способам уменьшения агрегации терапевтического моноклонального антитела. В некоторых вариантах реализации изобретения способ включает получение препарата моноклонального антитела, содержащего трегалозу и буфер, причем массовое соотношение указанного моноклонального антитела и указанной трегалозы в составе больше, чем или равно

25 0,41 и меньше, чем 1,65, и при этом состав имеет pH от около 5,5 до около 7,0. В некоторых вариантах реализации изобретения способ включает получение препарата антитела, содержащего трегалозу в количестве от около 45 mM до около 634 mM, от около 50 mM до около 600 mM или от около 150 mM до около 400 mM, и фосфат натрия в количестве больше, чем 35 mM до около 100 mM, и причем указанный состав имеет

30 pH от около 5,5 до около 7,0, и при этом указанное моноклональное антитело составлено в количестве от около 25 мг/мл до около 100 мг/мл в составе, и при этом массовое соотношение указанного моноклонального антитела и указанной трегалозы в составе больше, чем или равно 0,41 и меньше, чем 1,65.

[0028] В некоторых вариантах реализации способа, описанного в данном документе,

35 массовое соотношение указанного моноклонального антитела и указанной трегалозы в составе больше, чем или равно 0,41 и меньше, чем 1,65. В некоторых вариантах реализации способов, описанных в данном документе, массовое соотношение моноклонального антитела и трегалозы составляет от 0,73 до 1,47. В некоторых вариантах реализации изобретения массовое соотношение моноклонального антитела

40 и трегалозы составляет от 0,49 до 1,47. В некоторых вариантах реализации изобретения используется любое массовое соотношение моноклонального антитела и трегалозы из 0,41, 0,45, 0,50, 0,55, 0,60, 0,65, 0,70, 0,75, 0,80, 0,85, 0,90, 0,95, 1,00, 1,05, 1,10, 1,15, 1,20, 1,25, 1,30, 1,35, 1,40, 1,45, 1,50, 1,55, 1,60 и 1,64, в том числе все промежуточные значения.

[0029] В некоторых вариантах реализации изобретения моноклональное антитело в

45 составе содержится в количестве от около 30 мг/мл до около 90 мг/мл, от около 35 мг/мл до около 85 мг/мл, от около 35 мг/мл до 75 мг/мл, от около 40 мг/мл до около 80 мг/мл, от около 45 до около 70 мг/мл или от около 45 мг/мл до около 55 мг/мл. В некоторых вариантах реализации изобретения моноклональное антитело в составе

содержится в количестве около 25 мг/мл, около 30 мг/мл, около 40 мг/мл, около 45 мг/мл, около 50 мг/мл, около 55 мг/мл, около 60 мг/мл, около 65 мг/мл, около 70 мг/мл, около 75 мг/мл, около 80 мг/мл, около 85 мг/мл, около 90 мг/мл, около 95 мг/мл или около 100 мг/мл, в том числе все промежуточные значения. В некоторых вариантах реализации изобретения моноклональное антитело в составе содержится в количестве

около 45 мг/мл, около 50 мг/мл или 55 мг/мл.

[0030] В некоторых вариантах реализации изобретения состав содержит трегалозу в количестве от около 45 мМ до около 600 мМ, от около 45 мМ до около 550 мМ, от около 45 мМ до около 500 мМ, от около 45 мМ до около 450 мМ, от около 45 мМ до около 400 мМ, от около 45 мМ до около 350 мМ, от около 45 мМ до около 300 мМ, от около 45 мМ до около 250 мМ, от около 45 мМ до около 200 мМ, от около 45 мМ до около 180 мМ, от около 45 мМ до около 150 мМ, от около 45 мМ до около 140 мМ, от около 45 мМ до около 135 мМ, от около 45 мМ до около 130 мМ, от около 45 мМ до около 120 мМ, от около 45 мМ до около 110 мМ, от около 45 мМ до около 100 мМ, от около 180 мМ до около 634 мМ, от около 50 мМ до около 600 мМ или от около 150 мМ до около 400 мМ. В некоторых вариантах реализации изобретения трегалоза содержится в составе в количестве около 45 мМ, около 50 мМ, около 60 мМ, около 70 мМ, около 80 мМ, около 90 мМ, около 100 мМ, около 110 мМ, около 120 мМ, около 130 мМ, около 135 мМ, около 140 мМ, около 150 мМ, около 180 мМ, около 200 мМ, около 250 мМ, около 300 мМ, около 350 мМ, около 400 мМ, около 450 мМ, около 500 мМ, около 550 мМ, около 600 мМ, около 610 мМ, около 620 мМ, около 630 мМ или около 634 мМ. В некоторых вариантах реализации изобретения состав содержит фосфат натрия в качестве буфера. В некоторых вариантах реализации изобретения фосфат натрия в составе содержится в количестве от около 15 мМ до около 30 мМ, от около 20 мМ до 30 мМ, от около 22 мМ до около 28 мМ, больше чем 35 мМ до около 100 мМ, от около 40 мМ до около 100 мМ, от около 45 мМ до около 90 мМ, от около 50 мМ до около 75 мМ или от около 15 мМ до около 100 мМ. В некоторых вариантах реализации изобретения фосфат натрия в составе содержится в количестве около 15 мМ, около 20 мМ, около 22 мМ, около 25 мМ, около 28 мМ, около 30 мМ, около 35 мМ, около 36 мМ, около 40 мМ, около 45 мМ, около 50 мМ, около 51 мМ, около 55 мМ, около 60 мМ, около 65 мМ, около 70 мМ, около 75 мМ, около 80 мМ, около 85 мМ, около 90 мМ, около 95 мМ или около 100 мМ, в том числе все промежуточные значения. В некоторых вариантах реализации изобретения состав содержит гистидин (как, например, L-гистидин) в качестве буфера. В некоторых вариантах реализации изобретения гистидин в составе содержится в количестве от около 15 мМ до около 30 мМ, от около 20 мМ до 30 мМ, от около 22 мМ до около 28 мМ, больше чем 35 мМ до около 100 мМ, от около 40 мМ до около 100 мМ, от около 45 мМ до около 90 мМ, от около 50 мМ до около 75 мМ или от около 15 мМ до около 100 мМ. В некоторых вариантах реализации изобретения гистидин в составе содержится в количестве около 15 мМ, около 20 мМ, около 22 мМ, около 25 мМ, около 28 мМ, около 30 мМ, около 35 мМ, около 36 мМ, около 40 мМ, около 45 мМ, около 50 мМ, около 51 мМ, около 55 мМ, около 60 мМ, около 65 мМ, около 70 мМ, около 75 мМ, около 80 мМ, около 85 мМ, около 90 мМ, около 95 мМ или около 100 мМ, в том числе все промежуточные значения.

[0031] В некоторых вариантах реализации изобретения состав дополнительно содержит поверхностно-активное вещество. В некоторых вариантах реализации изобретения поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат (как, например, полисорбат 20) или полуксамер (как, например, полуксамер 188). В некоторых вариантах

реализации изобретения концентрация поверхностно-активного вещества составляет от около 0,01% до около 0,1%, от около 0,01% до около 0,05% или от около 0,02% до около 0,04%. В некоторых вариантах реализации изобретения концентрация  
поверхностно-активного вещества составляет около 0,01%, около 0,02%, около 0,03%,  
около 0,04%, около 0,05% или около 0,1%, в том числе все промежуточные значения.

[0032] В некоторых вариантах реализации изобретения состав имеет рН от около 5,5 до около 6,5, от около 5,8 до около 6,8, от около 5,9 до около 6,5, от около 6,0 до около 6,5, от около 6,0 до около 6,4 или от около 6,0 до около 6,2. В некоторых вариантах реализации изобретения состав имеет рН около 5,6, около 5,8, около 5,9, около 6,0,  
около 6,2, около 6,4, около 6,5, около 6,8 или около 7,0, в том числе все промежуточные значения.

[0033] В некоторых вариантах реализации изобретения моноклональное антитело предварительно не подвергают лиофилизации. В некоторых вариантах реализации изобретения моноклональное антитело представляет собой полноразмерное антитело.  
В некоторых вариантах реализации изобретения моноклональное антитело представляет собой антитело IgG1, IgG2 или IgG4. В некоторых вариантах реализации изобретения моноклональное антитело представляет собой гуманизированное антитело, химерное антитело или человеческое антитело. В некоторых вариантах реализации изобретения моноклональное антитело представляет собой фрагмент антитела, содержащий  
антигенсвязывающий участок. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагмент антитела представляет собой Fab- или F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент. В некоторых вариантах  
реализации изобретения моноклональное антитело связывает VEGF. В некоторых вариантах реализации изобретения моноклональное антитело представляет собой  
бевацизумаб. В некоторых вариантах реализации изобретения моноклональное антитело  
подвержено агрегации.

[0034] В некоторых вариантах реализации изобретения моноклональное антитело предварительно не подвергают лиофилизации. В некоторых вариантах реализации изобретения моноклональное антитело представляет собой полноразмерное антитело.  
В некоторых вариантах реализации изобретения моноклональное антитело представляет собой антитело IgG1, IgG2 или IgG4. В некоторых вариантах реализации изобретения моноклональное антитело представляет собой гуманизированное антитело, химерное антитело или человеческое антитело. В некоторых вариантах реализации изобретения моноклональное антитело представляет собой фрагмент антитела, содержащий  
антигенсвязывающий участок. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагмент антитела представляет собой Fab- или F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент. В некоторых вариантах  
реализации изобретения моноклональное антитело связывает CD20. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело, что связывает CD20, представляет собой  
гуманизированное антитело B-Ly1, описанное в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело, что связывает CD20, представляет собой  
антитело, содержащее аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID NO:3 до SEQ ID NO:19, и аминокислотную  
последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO:20. В некоторых вариантах реализации изобретения моноклональное антитело представляет собой  
обинутузумаб. В некоторых вариантах реализации изобретения моноклональное  
антитело подвержено агрегации.

[0035] В некоторых вариантах реализации изобретения состав стабилен при -20°C в течение по меньшей мере около 6 месяцев, по меньшей мере около 12 месяцев, по меньшей мере около 15 месяцев, по меньшей мере около 18 месяцев, по меньшей мере

около 19 месяцев, по меньшей мере около 20 месяцев или по меньшей мере около 2 лет. В некоторых вариантах реализации изобретения состав является стерильным. В некоторых вариантах реализации изобретения состав предназначен для введения субъекту. В некоторых вариантах реализации изобретения состав предназначен для внутривенного (IV), подкожного (SQ), интраокулярного (IO) или внутримышечного (IM) введения.

[0036] В другом аспекте в настоящем изобретении предложены способы получения фармацевтического состава, включающие этапы, в которых: (а) получают любой из составов, описанных в данном документе; и (b) оценивают физическую стабильность, химическую стабильность или биологическую активность антитела в составе. В некоторых вариантах реализации изобретения физическую стабильность, химическую стабильность или биологическую активность антитела в составе оценивают через около 6 месяцев, около 12 месяцев, около 18 месяцев или около 24 месяца после хранения состава (например, при -20°C или -40°C).

[0037] В другом аспекте в настоящем изобретении предложены способы лечения заболевания или нарушения у субъекта, включающие введение субъекту любого из составов, описанных в данном документе, в количестве, эффективном для лечения заболевания или нарушения. В некоторых вариантах реализации изобретения состав содержит антитело, которое связывает VEGF. В некоторых вариантах реализации изобретения моноклональное антитело представляет собой бевацизумаб. В некоторых вариантах реализации изобретения заболевание представляет собой злокачественную опухоль. В некоторых вариантах реализации изобретения рак выбран из колоректального рака, рака молочной железы, рака почки и глиобластомы.

[0038] В другом аспекте в настоящем изобретении предложены способы лечения заболевания или нарушения у субъекта, включающие введение субъекту любого из составов, описанных в данном документе, в количестве, эффективном для лечения заболевания или нарушения. В некоторых вариантах реализации изобретения состав содержит антитело, которое связывает CD20. В некоторых вариантах реализации изобретения моноклональное антитело представляет собой обинутумаб. В некоторых вариантах реализации изобретения заболевание представляет собой злокачественную опухоль. В некоторых вариантах реализации изобретения злокачественная опухоль представляет собой злокачественную опухоль, клетки которой экспрессируют CD20, например, лимфому, лимфоцитарный лейкоз и множественную миелому.

[0039] Следует понимать, что один, некоторые или все из свойств различных вариантов реализации изобретения, описанных в данном документе, могут быть объединены с образованием других вариантов реализации настоящего изобретения. Эти и другие аспекты настоящего изобретения будут понятны специалисту в данной области. Эти и другие варианты реализации изобретения подробно описаны ниже.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0040] На ФИГ. 1A, 1B, 1C и 1D показана видимая кристаллизация трегалозы после индуцированной нуклеации на поверхности замороженных образцов с фармацевтически релевантными концентрациями трегалозы 0,0% (масс./об.) трегалозы (ФИГ. 1A), 2,0% (масс./об.) трегалозы (ФИГ. 1B), 4,0% (масс./об.) трегалозы (ФИГ. 1C) и 8,0% (масс./об.) трегалозы (ФИГ. 1D).

[0041] На ФИГ. 2A показана растворимость сахарозы (1), трегалозы (2) и маннита (3) в зависимости от температуры, как отмечено на Фиг. На ФИГ. 2B представлена процентная доля высокомолекулярных соединений бевацизумаба в различных составах криопротекторов до и после замораживания и индуцированной нуклеации в течение

28 суток при -20 °С, определенная методом ВЭЭХ, как отмечено на Фиг.

[0042] На ФИГ. 3А, 3В и 3С показано увеличение во времени агрегации быстрозамороженных образцов mAb1 (ФИГ. 3А), бевацизумаба (ФИГ. 3В) и mAb3 (ФИГ. 3С), которые хранились при -20°С (1), -14°С (2), и -8°С (3), как отмечено на Фиг..

[0043] На ФИГ. 4А и 4В показаны типичные полученные методом эксклюзионной хроматографии (ЭХ) хроматограммы мономера, димера и высокомолекулярных соединений mAb3 (ВМС). (ФИГ. 4А) Влияние скорости замораживания. Образцы mAb3, замороженные при медленных (1), нормальных (2) и высоких (3) скоростях замораживания (как отмечено на Фиг.) и хранившихся при -20°С в течение 12 месяцев.

Контрольный образец (хранившийся при -70 °С) показан для сравнения. (ФИГ. 4В) Влияние температуры хранения. Образцы mAb3, замороженные при высокой скорости замораживания и после хранения при -20°С (3), -14°С (2) и -8°С (1) в течение 12 месяцев, как отмечено на Фиг. Контрольный образец (хранившийся при -70 °С) показан для сравнения.

[0044] На ФИГ. 5 показаны нормализованные спектры в ближней ИК-области трех форм трегалозы, которые рассматривались в данном исследовании: аморфная трегалоза (1), ангидрид трегалозы (кристаллический) (2) и дигидрат трегалозы (кристаллический) (3), как отмечено на Фиг..

[0045] На ФИГ. 6А1-ФИГ. 6С3 показаны нормализованные спектры в ближней ИК-области (ФИГ. 6А1, 6А2 и 6А3) образцов mAb1 (ФИГ. 6В1, 6В2 и 6В3), бевацизумаба и (ФИГ. 6С1, 6С2 и 6С3) mAb3, замороженных с использованием медленных (ФИГ. 6А1, 6В1 и 6С1), нормальных (ФИГ. 6А2, 6В2 и 6С2) и высоких (3) скоростей замораживания после хранения в течение 12 месяцев при -20°С, -14°С и -8°С.

[0046] На ФИГ. 7А, 7В и 7С показаны концентрации аморфной (1) и кристаллизованной трегалозы (2) в составах с 0 мг/мл бевацизумаба (ФИГ. 7А), 25 мг/мл бевацизумаба (ФИГ. 7В) и 100 мг/мл бевацизумаба (ФИГ. 7С) после хранения в течение 12 месяцев при -20°С. На ФИГ. 7D и 7E показаны диаграммы размаха с процентной долей высокомолекулярных соединений для составов, содержащих трегалозу, с 25 мг/мл бевацизумаба (ФИГ. 7D) и 100 мг/мл бевацизумаба (ФИГ. 7E) после хранения в течение 12 месяцев при -20°С.

[0047] На ФИГ. 8А и 8В показан процентная доля кристаллизованного дигидрата трегалозы (ФИГ. 8А) и процентная доля высокомолекулярных соединений (ФИГ. 8В) в зависимости от общего соотношения трегалозы и mAb (масс./масс.). Содержание высокомолекулярных соединений измеряли с использованием ВЭЭХ, а концентрацию дигидрата трегалозы определяли с использованием БИК-спектроскопии с преобразованием Фурье.

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

### I. Определения.

[0048] До предоставления более подробного описания настоящего изобретения следует понимать, что данное изобретение не ограничивается конкретными композициями или биологическими системами, которые, конечно, могут варьировать. Также следует понимать, что терминология, используемая в данном документе, предназначена только для описания конкретных вариантов реализации изобретения и не носит ограничительного характера. При использовании в настоящем описании и прилагаемой формуле изобретения единственное число включает ссылку и на множественное число, если из контекста с очевидностью не следует обратное. Следовательно, например, ссылка на «молекулу» опционально включает комбинацию двух или более таких молекул и тому подобное.

[0049] В данном контексте термин «около» относится к обычному диапазону ошибок для соответствующего значения, хорошо известному специалисту в данной области техники. Приблизительное значение или параметр в вариантах осуществления [изобретения] включает в себя точное значение или параметр.

5 [0050] Следует понимать, что аспекты и варианты реализации изобретения, описанные в данном документе, содержат «содержащие», «состоящие» и «состоящие по существу» из аспектов и вариантов осуществления.

[0051] Термин «фармацевтический состав» относится к препарату, что находится в такой форме, которая обеспечивает эффективную биологическую активность активного  
10 ингредиента и не содержит дополнительных компонентов, являющихся неприемлемо токсичными для субъекта, которому должна быть введена композиция. Такие составы являются стерильными. Фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества (носители, добавки) - это вещества, которые целесообразно вводить испытываемому млекопитающему для обеспечения эффективной дозы используемого активного  
15 ингредиента.

[0052] «Стерильный состав» является асептическим или не содержит, или по существу не содержит никаких живых микроорганизмов их спор.

[0053] «Замороженный» состав представляет собой состав при температуре ниже 0°C. Как правило, замороженный состав не лиофилизируют и не подвергают  
20 лиофилизации предварительно или в последующем. В определенных вариантах реализации изобретения замороженный состав содержит замороженное лекарственное вещество для хранения (в контейнере из нержавеющей стали) или лекарственный препарат (конечная упаковка во флаконы).

[0054] «Стабильный» состав - это состав, в котором содержащийся в нем белок по  
25 существу сохраняет свою физическую стабильность и/или химическую стабильность, и/или биологическую активность при хранении. Предпочтительно, чтобы состав по существу сохранял свою физическую стабильность и химическую стабильность, а также свою биологическую активность при хранении. Период хранения, в целом, подбирается на основе предполагаемого срока годности состава. Различные аналитические методы  
30 для измерения стабильности белка доступны в данной области техники и рассматриваются в *Peptide and Protein Drug Delivery*, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991) and Jones, A. *Adv. Drug Delivery Rev.* 10:29-90 (1993), например. Стабильность может быть измерена при выбранной температуре в течение выбранного периода времени. В определенных вариантах реализации  
35 изобретения состав является стабильным при около 40°C по меньшей мере в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 21, 28 или более суток. В определенных вариантах реализации изобретения состав является стабильным при около 40°C по меньшей мере в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более недель. В определенных вариантах реализации изобретения состав является стабильным при около 25°C по меньшей мере в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6,  
40 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или более месяцев. В определенных вариантах реализации изобретения состав является стабильным при около 5°C по меньшей мере в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или более месяцев. В определенных вариантах реализации изобретения состав является стабильным при около -20°C по меньшей мере в течение  
45 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 или более месяцев. В определенных вариантах реализации изобретения состав является стабильным при 5°C или -20°C по меньшей мере в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18,



19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 или более месяцев. Кроме того, состав предпочтительно является стабильным после замораживания (например, до -20°C, -40°C или -70°C) и оттаивания состава, например, после 1, 2 3, 4 или 5 циклов замораживания и оттаивания.

- 5 Стабильность можно оценить качественно и/или количественно различными способами, включая оценку образования агрегатов (например, с использованием эксклюзионной хроматографии, путем измерения мутности и/или визуального контроля); путем оценки гетерогенности зарядов с использованием катионообменной хроматографии, изоэлектрического фокусирования в капиллярах с визуализацией всей колонки (icIEF)
- 10 или капиллярного электрофореза, анализа N-концевых или C-концевых последовательностей; масс-спектрометрического анализа, анализа методом ДСН-ПААГ для сравнения восстановленного и интактного антитела; анализа методом пептидного картирования (например, триптический или LYS-C); оценки биологической активности или антигенсвязывающей функции антитела; и т.д. Нестабильность может включать
- 15 любой один или более процессов: агрегация, дезамидирование (например, дезамидирование Asn), окисление (например, окисление Met), изомеризацию (например, изомеризацию Asp), отсечение/гидролиз/фрагментацию (например, фрагментацию шарнирной области), образование сукцинимидов, непарный(е) цистеиновый(ые) остаток (ки), N-концевое удлинение, C-концевой процессинг, различия в гликозилировании и
- 20 т.д.

[0055] Белок «сохраняет свою физическую стабильность» в фармацевтическом составе, если не наблюдается никаких признаков агрегации, преципитации и/или денатурации при визуальном определении цвета и/или прозрачности или определяется по рассеянию ультрафиолетового излучения, или методом эксклюзионной хроматографии, или если

25 эти признаки слабо выражены.

[0056] Белок «сохраняет свою химическую стабильность» в фармацевтическом составе, если химическая стабильность в определенное время является таковой, что белок, как предполагается, все еще сохраняет свою биологическую активность, как указано ниже. Химическую стабильность можно оценить путем выявления и количественной оценки

30 форм белка с измененными химическими свойствами. Химическое изменение может включать изменение размера (например, путем отсечения), что можно оценить, например, с использованием эксклюзионной хроматографии, ДСН-ПААГ-электрофореза и/или матричной лазерной десорбционной ионизационной времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI/TOF MS). Другие типы химического изменения включают

35 изменение заряда (например, возникающее в результате дезамидирования), что можно оценить, например, с помощью ионообменной хроматографии или icIEF.

[0057] Белок «сохраняет свою биологическую активность» в фармацевтическом составе, если биологическая активность антитела в определенное время находится в пределах около 10% (в пределах ошибок анализа) от биологической активности,

40 проявляемой во время приготовления фармацевтического состава, которую устанавливают, например, в анализе связывания антигена. Другие анализы «биологической активности» антител подробно изложены далее в данном документе.

[0058] Используемый в данном документе термин «биологическая активность» моноклонального антитела относится к способности антитела связываться с антигеном.

45 Он также может охватывать связывание антитела с антигеном и обеспечение измеримого биологического ответа, который можно измерить *in vitro* или *in vivo*. Такая активность может быть антагонистической или агонистической.

[0059] «Дезамидированное» моноклональное антитело, описанное в данном

документе, представляет собой антители, в котором один или несколько остатков аспарагина были дериватизированы до аспарагиновой или изоаспарагиновой кислоты.

[0060] Антитело «чувствительное к дезамидированию» представляет собой антитело, что содержит один или более остатков, которые, как было установлено, подвержены дезамидированию.

[0061] Антитело «чувствительное к агрегации» представляет собой антитело, которое, как было установлено, агрегирует с другой(ими) молекулой(ами) антитела, особенно при замораживании и встряхивании.

[0062] Антитело «чувствительное к фрагментации» представляет собой антитело, которое, как было установлено, расщепляется на два или более фрагментов, например, в его шарнирной области.

[0063] Под «уменьшением дезамидирования, агрегации или фрагментации» подразумевается предотвращение или уменьшение степени дезамидирования, агрегации или фрагментации по сравнению с моноклональным антителом, включенным в состав другого препарата.

[0064] Предпочтительно, чтобы антитело, из которого получают препарат, было по существу очищенным и желательно, чтобы оно было по существу гомогенным (например, не содержало белковых примесей и т.д.). «По существу очищенное» антитело означает композицию, содержащую по меньшей мере около 90% по массе антитела, исходя из общей массы композиции, предпочтительно по меньшей мере около 95% по массе. «По существу гомогенное» антитело означает композицию, содержащую по меньшей мере около 99% по массе антитела, исходя из общей массы композиции.

[0065] Под «изотоническим» подразумевается, что представляющий интерес состав по существу имеет такое же осмотическое давление, что и кровь человека. Изотонические составы, как правило, имеют осмотическое давление от около 250 до 350 мосм. Изотоничность можно измерять, например, с использованием осмометра парового давления или криоскопического осмометра. В некоторых вариантах реализации изобретения состав имеет осмоляльность больше, чем около 240 мосмоль/кг.

[0066] Используемый в данном документе термин «буфер» относится к буферному раствору, который противостоит изменениям pH под воздействием его кислотно-щелочных сопряженных компонентов. Буфер по настоящему изобретению имеет pH в диапазоне от около 4,5 до около 7,0, предпочтительно от около 5,6 до около 7,0, например, от 5,6 до 6,9, от 5,7 до 6,8, от 5,8 до 6,7, от 5,9 до 6,6, от 5,9 до 6,5, 6,0, от 6,0 до 6,4 или от 6,1 до 6,3. В некоторых вариантах реализации изобретения состав имеет pH 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 или 7,0. Например, натрий-фосфатный буфер является примером буферов, которые контролируют pH в этом диапазоне.

[0067] Используемый в данном документе термин «поверхностно-активное вещество» относится к поверхностно-активному веществу, предпочтительно неионогенному поверхностно-активному веществу. Примеры поверхностно-активных веществ, описанные в данном документе, включают полисорбат (например, полисорбат 20 и полисорбат 80); полксамер (например, полксамер 188); Triton; додецилсульфат натрия (SDS); лаурилсульфат натрия; октилглюкозид натрия; лаурил-, миристил-, линолеил- или стеарил-сульфобетаин; лаурил-, миристил-, линолеил- или стеарил-саркозин; линолеил-, миристил- или цетил-бетаин; лауроамидопропил-, кокамидопропил-, линоламидопропил-, миристамидопропил-, палмидопропил- или изостеарамидопропил-бетаин (например, лауроамидопропил); миристамидопропил-, палмидопропил- или изостеарамидопропил-диметиламин; натрий метил кокоил- или динатрий метил олеил-

таурат; и серии MONAQUAT™ (Mona Industries, Inc., Paterson, N.J.); полиэтилгликоль, полипропилгликоль и сополимеры этилена и пропиленгликоля (например, Pluronic, PF68); и тому подобное. В некоторых вариантах реализации изобретения поверхностно-активное вещество, описанное в данном документе, представляет собой полисорбат

20. [0068] В фармакологическом смысле в контексте настоящего изобретения, «терапевтически эффективное количество» антитела означает количество, эффективное для предотвращения или лечения заболевания, для лечения которого данное антитело является действенным. «Нарушение» представляет собой любое состояние, на лечение которого антитело оказывает благотворное воздействие. Этот термин охватывает хронические и острые нарушения или заболевания, включая те патологические состояния, которые увеличивают предрасположенность млекопитающего к рассматриваемому нарушению.

[0069] «Консервант» представляет собой соединение, которое может быть опционально включено в данный состав для существенного подавления бактериального действия на него, таким образом, например, облегчая производство состава для многократного использования. Примеры потенциальных консервантов включают хлорид октадецилдиметилбензиламмония, хлорид гексония, хлорид бензалкония (смесь хлоридов алкилбензилдиметиламмония, где алкильные группы представляют собой длинноцепочечные соединения) и хлорид бензетония. Другие типы консервантов включают ароматические спирты, такие как фенол, бутиловый и бензиловый спирт, алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен, катехин, резорцин, циклогесанол, 3-пентанол и m-крезол. В одном варианте реализации изобретения данный консервант представляет собой бензиловый спирт.

[0070] Термин «VEGF» или «VEGF-A» используется в данном документе для обозначения фактора роста эндотелия сосудов человека размером 165 аминокислот и родственных факторов роста эндотелия сосудов человека размером 121, 189 и 206 аминокислот, описанных, например, в работе Leung et al. (1989) *Science* 246:1306, and Houck et al. (1991) *Mol.Endocrin.*, 5:1806 (1991), вместе с их естественными аллельными и процессированными формами. Термин «VEGF» или «VEGF-A» также относится к VEGF других видов животных, кроме человека, например, VEGF мыши, крысы или примата. Иногда VEGF конкретного вида животных обозначают такими терминами, как hVEGF для VEGF человека или mVEGF для VEGF мыши. Термин «VEGF» также используется для обозначения укороченных форм полипептида, содержащих 8-109 или 1-109 аминокислот из фактора роста эндотелия сосудов человека, состоящего из 165-аминокислот. Упоминание любой из таких форм VEGF может быть указано в настоящей заявке, например, как «VEGF (8-109)», «VEGF (1-109)» или «VEGF<sub>165</sub>». Положения аминокислот в случае «укороченного» нативного VEGF пронумерованы, как указано в нативной последовательности VEGF. Например, положение аминокислоты 17 (метионин) в укороченном нативном VEGF также соответствует положению 17 (метионин) в нативном VEGF. Укороченный нативный VEGF обладает аффинностью связывания по отношению к рецепторам KDR и Flt-1, сравнимым с нативным VEGF.

[0071] «Биологическая активность VEGF» включает связывание с любым рецептором VEGF или любую сигнальную активность VEGF, такую как регуляция как нормального, так и патологического ангиогенеза и васкулогенеза (Ferrara and Davis-Smyth (1997) *Endocrine Rev* 18:4-25; Ferrara (1999) *J.Mol.Med.* 77:527-543); стимулирование эмбрионального васкулогенеза и ангиогенеза (Carmeliet et al. (1996) *Nature* 380:435-439; Ferrara et al. (1996) *Nature* 380:439-442); и модуляцию циклической пролиферации

кровеносных сосудов в женских половых путях и для роста кости и формирования хряща (Ferrara et al.(1998) *Nature Med.*4:336-340; Gerber et al. (1999) *Nature Med.*5:623-628). Помимо того, что VEGF является ангиогенным фактором в ангиогенезе и васкулогенезе, он, как плейотропный фактор роста, оказывает многочисленные

биологические эффекты в других физиологических процессах, таких как, продолжительность существования эндотелиальных клеток, проницаемость сосудов и вазодилатация, моноцитарный хемотаксис и приток кальция (Ferrara and Davis-Smyth (1997), выше, и Cebe-Suarez et al. *Cell.Mol.Life Sci.*63:601-615 (2006)). Более того, в недавних исследованиях сообщалось о митогенных эффектах VEGF на некоторые неэндотелиальные типы клеток, такие как клетки эпителия пигмента сетчатки, клетки протоков поджелудочной железы и шванновские клетки. Guerrin et al. (1995) *J.Cell Physiol.*164:385-394; Oberg-Welsh et al. (1997) *Mol.Cell.Endocrinol.*126:125-132; Sondell et al. (1999) *J.Neurosci.*19:5731-5740.

[0072] «Антагонист VEGF» или «VEGF-специфический антагонист» относится к молекуле, которая способна связываться с VEGF, снижать уровни экспрессии VEGF или нейтрализовать, блокировать, ингибировать, элиминировать, снижать или подавлять биологическую активность VEGF, включая, в том числе, связывание VEGF с одним или несколькими рецепторами VEGF и VEGF-опосредованный ангиогенез, а также продолжительность существования или пролиферацию эндотелиальных клеток. В качестве VEGF-специфических антагонистов, используемых в способах по настоящему изобретению, включены полипептиды, которые специфически связываются с VEGF, антитела к VEGF и их антигенсвязывающие фрагменты, рецепторные молекулы и производные, которые связываются специфически с VEGF, тем самым блокируя его связывание с одним или несколькими рецепторами, слитые белки (например, VEGF-Trap (Regeneron)) и VEGF<sub>121</sub>-гелонин (Peregrine). VEGF-специфические антагонисты также включают антагонистические варианты полипептидов VEGF, антисмысловые олигомеры, направленные на VEGF, малые молекулы РНК, направленные на VEGF, аптамеры РНК, пептитела и рибозимы против VEGF. VEGF-специфические антагонисты также включают непептидные малые молекулы, которые связываются с VEGF и способны блокировать, ингибировать, элиминировать, уменьшать или подавлять биологическую активность VEGF. Таким образом, термин «действие VEGF», в частности, охватывает VEGF-опосредованное биологическое действие VEGF. В определенных вариантах реализации изобретения антагонист VEGF уменьшает или ингибирует уровень экспрессии или биологическое действие VEGF, по меньшей мере, на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более.

[0073] «Антитело к VEGF» представляет собой антитело, которое связывается с VEGF с достаточной аффинностью и специфичностью. В определенных вариантах реализации изобретения выбранное антитело, как правило, обладает достаточной аффинностью связывания по отношению к VEGF, например, данное антитело может связывать hVEGF со значением  $K_d$  в диапазоне  $100 \text{ нМ}^{-1} \text{ пМ}$ . Аффинность антител можно определить, например, с помощью анализа на основе поверхностного плазмонного резонанса (например, анализа BIAcore, описанного в публикации заявки РСТ № WO2005/012359); твердофазного иммуноферментного анализа (твердофазного ИФА); и конкурентных анализов (например, РИА).

[0074] В определенных вариантах реализации антитело к VEGF может быть использовано в качестве терапевтического средства для нацеливания на пораженный участок и подавления симптомов заболеваний или состояний, ассоциированных с

активностью VEGF. Кроме того, данное антитело может быть подвергнуто другим анализам биологического действия, например, с целью оценки его эффективности в качестве терапевтического средства. Такие анализы известны в данной области и зависят от антигена-мишени и предполагаемого использования для данного антитела. Примеры включают анализ ингибирования HUVEC; анализы ингибирования роста опухолевых клеток (например, описанные в WO 89/06692); анализы антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (АЗКЦ) и комплемент-опосредованной цитотоксичности (КЗЦ) (патент США №№ 5500362); и анализы агонистического действия или гомеопоза (см. WO 95/27062). Антитело против VEGF, как правило, не связывается ни с другими гомологами VEGF, например, VEGF-B или VEGF-C, ни другими факторами роста, например, PlGF, PDGF или bFGF. В одном варианте реализации изобретения антитело к VEGF представляет собой моноклональное антитело, которое связывается с тем же эпитопом, что и моноклональное антитело A4.6.1 к VEGF, продуцируемое гибридомой ATCC HB 10709. В другом варианте реализации изобретения антитело к VEGF представляет собой гуманизированное моноклональное антитело к VEGF, получаемое в соответствии с Presta et al. (1997) *Cancer Res.*57:4593-4599, включая, в том числе, антитело, известное как бевацизумаб (BV; AVASTIN<sup>®</sup>).

[0075] Антитело к VEGF «Бевацизумаб (BV)», также известное как « $\rho$ huMAb VEGF» или «AVASTIN<sup>®</sup>», представляет собой рекомбинантное гуманизированное моноклональное антитело к VEGF, получаемое в соответствии с Presta et al. (1997) *Cancer Res.*57:4593-4599. Оно содержит включающие мутации каркасные области IgG1 человека и антигенсвязывающие области, определяющие комплементарность, из моноклонального антитела A.4.6.1 мыши к hVEGF, которое блокирует связывание VEGF с его рецепторами. Приблизительно 93% аминокислотной последовательности Бевацизумаба, включая большую часть каркасных областей, получено из IgG1 человека, а приблизительно 7% последовательности получено из антитела A4.6.1 мыши. Молекулярная масса бевацизумаба составляет приблизительно 149000 дальтон, и он гликозилирован. Бевацизумаб и другие гуманизированные антитела к VEGF дополнительно описаны в патенте США №№ 6884879, выданном 26 февраля 2005 года, полное содержание которого в явном виде включено в данный документ посредством ссылки.

[0076] Используемый здесь термин «полипептид серии B20» относится к полипептиду, включая антитело, которое связывается с VEGF. Полипептиды серии B20 включают, в том числе, антитела, полученные из последовательности антитела B20, или антитело, полученное из B20, описанное в публикации заявки на патент США № 20060280747, публикации заявки на патент США № 20070141065 и/или публикации заявки на патент США №20070020267, причем содержание этих заявок на патент в явном виде включено в данный документ посредством ссылки. В одном варианте реализации изобретения полипептид серии B20 представляет собой B20-4.1, который описан в публикации заявки на патент США № 20060280747, публикации заявки на патент США № 20070141065 и/или публикации заявки на патент США №20070020267. В другом варианте осуществления, полипептид семейства B20 представляет собой B20-4.1.1, который описан в публикации заявки на патент США № 7910098, полное содержание которой в явном виде включено в данный документ посредством ссылки.

[0077] Используемый здесь термин «полипептид серии G6» относится к полипептиду, включая антитело, которое связывается с VEGF. Полипептиды серии G6 включают, в том числе, антитела, полученные из последовательности антитела G6, или антитело, полученное из G6, описанное в публикации заявки на патент США № 20060280747,

публикации заявки на патент США № 20070141065 и/или публикации заявки на патент США № 20070020267. Полипептиды серии G6, которые описаны в публикации заявки на патент США № 20060280747, публикации заявки на патент США № 20070141065 и/или публикации заявки на патент США № 20070020267, включают, в том числе, G6-8, G6-23 и G6-31.

[0078] Для ознакомления с дополнительными антителами см. патенты США №№ 7060269, 6582959, 6703020, 6054297, WO98/45332; WO 96/30046; WO94/10202; EP 0666868B1; публикации заявок на патенты США №№ 2006009360, 20050186208, 20030206899, 20030190317, 20030203409 и 20050112126; и работу Popkov *et al.*, *Journal of Immunological Methods* 288:149-164 (2004). В определенных вариантах реализации изобретения другие антитела включают те антитела, что связываются с функциональным эпитопом на VEGF человека, включающем остатки F17, M18, D19, Y21, Y25, Q89, I91, K101, E103, и C104 или, в альтернативном варианте, включающем остатки F17, Y21, Q22, Y25, D63, I83 и Q89.

[0079] Также известны другие антитела к VEGF, и они описаны, например, в работе Liang *et al.*, *J Biol Chem* 281, 951-961 (2006).

[0080] Используемый в настоящем документе термин «CD20» относится к В-лимфоцитарному антигену CD20 человека (также известному как CD20, В-лимфоцитарный поверхностный антиген B1, Leu-16, Bp35, BM5 и LF5; его последовательность определена номером P11836 в базе данных SwissProt), который представляет собой гидрофобный трансмембранный белок с молекулярной массой приблизительно 35 кДа, локализованный на предшественниках В-лимфоцитов и зрелых В-лимфоцитах. (Valentine, M.A., *et al.*, *J. Biol.Chem.* 264(19) (1989) 11282-11287; Tedder, T.F., *et al.*, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*85 (1988) 208-12; Stamenkovic, I., *et al.*, *J. Exp.Med.*167 (1988) 1975-80; Einfeld, D.A., *et al.*, *EMBO J.*7 (1988) 711-7; Tedder, T.F., *et al.*, *J. Immunol.*142 (1989) 2560-8). Соответствующий ген человека представляет ген 1 подсемейства А семейства генов, кодирующих белки с 4 доменами, пронизывающими мембрану, также известный как MS4A1. Этот ген кодирует представителя семейства трансмембранных 4А генов. Представители этого формирующегося семейства белков отличаются общими структурными свойствами и сходными границами сплайсирования интрона/экзона, а также характеризуются уникальными паттернами экспрессии среди гемопоэтических клеток и нелимфоидных тканей. Этот ген кодирует В-лимфоцитарную поверхностную молекулу, которая играет определенную роль в развитии и дифференцировке В-клеток в плазматические клетки. Представитель этого семейства локализован в положении 11q12 среди кластера представителей семейства. В результате альтернативного сплайсинга этого гена образуется два варианта транскриптов, которые кодируют один и тот же белок.

[0081] Термины «CD20» и «антиген CD20» в данном документе используются взаимозаменяемо и охватывают любые варианты, изоформы и видовые гомологи CD20 человека, которые естественным образом экспрессируются клетками или экспрессируются на поверхности клеток, трансфицированных геном CD20. Связывание антитела по настоящему изобретению с антигеном CD20 опосредует уничтожение клеток, экспрессирующих CD20 (например, клеток опухоли), путем инактивирования CD20. Уничтожение клеток, экспрессирующих CD20, может происходить по одному или нескольким из следующих механизмов: индукции гибели клеток/апоптоза, АЗКЦ и КЗЦ.

[0082] К синонимам CD20, принятым в данной области, относятся В-лимфоцитарный антиген CD20, В-лимфоцитарный поверхностный B1, Leu-16, Bp35, BM5 и LF5.

[0083] Термин «антитело к CD20» согласно настоящему изобретению относится к антителу, которое специфически связывается с антигеном CD20. В зависимости от связывающих свойств и биологического действия антител к CD20 по отношению к антигену CD20 могут быть выделены два типа антител к CD20 (антител к CD20 I и II типов) согласно Cragg, M.S., et al., *Blood* 103 (2004) 2738-2743; и Cragg, M.S., et al., *Blood* 101 (2003) 1045-1052, см. Таблицу 1.

Таблица 1: Свойства антител к CD20 I и II типа

Антитела к CD20 I типа	Антитела к CD20 II типа
Эпитоп CD20 I типа	Эпитоп CD20 II типа
Локализация CD20 в липидных рафтах	Отсутствие локализации CD20 в липидных рафтах
Повышенная КЗЦ (в случае изотипа IgG1)	Сниженная КЗЦ (в случае изотипа IgG1)
Антитела к CD20 I типа	Антитела к CD20 II типа
АЗКЦ (в случае изотипа IgG1)	АЗКЦ (в случае изотипа IgG1)
Полная связывающая способность	Сниженная связывающая способность
Гомотипическая агрегация	Более сильная гомотипическая агрегация
Индукция апоптоза при перекрестном сшивании	Сильная индукция клеточной гибели без перекрестного сшивания

[0084] Примеры таких антител к CD20 II типа включают, например, гуманизированное B-Ly1 антитело IgG1 (химерное гуманизированное антитело IgG1, которое описано в WO 2005/044859), 11 B8 IgG1 (которое описано в WO 2004/035607) и AT80 IgG1. Обычно антитела к CD20 II типа изотипа IgG1 демонстрируют характерные свойства для КЗЦ. Антитела к CD20 II типа характеризуются сниженной КЗЦ (в случае изотипа IgG1) по сравнению с антителами I типа изотипа IgG1.

[0085] Примеры антител к CD20 I типа включают, например, ритуксимаб, HI47 IgG3 (ЕСАСС, гибридома), 2C6 IgG1 (которое описано в WO 2005/103081), 2F2 IgG1 (которое описано в WO 2004/035607 и WO 2005/103081) и 2H7 IgG1 (которое описано в WO 2004/056312).

[0086] Дефукозилированные антитела к CD20 согласно настоящему изобретению представляет собой предпочтительно антитела к CD20 II типа, более предпочтительно дефукозилированное гуманизированное антитело B-Ly1, которое описано в WO 2005/044859 и WO 2007/031875.

[0087] Антитело «ритуксимаб» (контрольное антитело; пример антитела к CD20 I типа) является генно-инженерным химерным моноклональным антителом, содержащим человеческий гамма-1 константный домен и вариабельные области иммуноглобулина мыши, которое направленно против человеческого антигена CD20. Однако это антитело не было получено с использованием гликоинженерии и не относится к дефукозилированным антителам, и, следовательно, содержащееся в нем количество фукозы составляет по меньшей мере 85%. Это химерное антитело содержит человеческие гамма-1 константные домены и обозначается «C2 B8» в патенте США № 5736137 (Andersen, et. al.), который выдан 17 апреля 1998 года, принадлежащей Фармацевтической корпорации IDEC). Ритуксимаб одобрен для лечения пациентов с В-клеточной CD20-положительной неходжкинской лимфомой: низкой степени злокачественности или фолликулярной, рецидивирующей или рефрактерной. Исследования механизма действия ритуксимаба *in vitro* показали, что он проявляет комплементзависимую цитотоксичность (КЗЦ) у людей (Reff, M.E., et. al, *Blood* 83(2) (1994) 435-445). В дополнение к этому, он проявляет активность в анализах, которые направлены на оценку антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (АЗКЦ).

[0088] Термин «гуманизированное антитело B-Ly1» относится к гуманизированному антителу B-Ly1, которое описано в WO 2005/044859 и WO 2007/031875, что были

получены из мышинового моноклонального антитела B-Ly1 к CD20 (вариабельная область тяжелой цепи (VH) мышинового антитела: SEQ ID NO:1; вариабельная область легкой цепи (VL) мышинового антитела: SEQ ID NO:2 - см. Poppe, S. и Visser, L., *Biotest Bulletin* 3 (1987) 131-139) путем химеризации с человеческим константным доменом из IgG1 и последующей гуманизации (см. WO 2005/044859 и WO 2007/031875). Эти «гуманизированные антитела B-Ly1» описаны подробно в WO 2005/044859 и WO 2007/031875.

[0089] В одном варианте реализации изобретения «гуманизированное антитело B-Ly1» имеет вариабельную область тяжелой цепи (VH), выбранную из группы, состоящей из от SEQ ID No.3 до SEQ ID No.19 (от B-HH2 до B-HH9 и от B-HL8 до B-HL17 из WO 2005/044859 и WO 2007/031875). В одном конкретном варианте реализации изобретения такой вариабельный домен выбран из группы, состоящей из SEQ ID No.3, 4, 7, 9, 11, 13 и 15 (B-HH2, BHH-3, B-HH6, B-HH8, B-HL8, B-HL11 и B-HL13 из WO 2005/044859 и WO 2007/031875). В одном конкретном варианте реализации изобретения «гуманизированное антитело B-Ly1» имеет вариабельную область легкой цепи (VL) SEQ ID No.20 (B-KV1 из WO 2005/044859 и WO 2007/031875). В одном конкретном варианте реализации изобретения «гуманизированное антитело B-Ly1» имеет вариабельную область тяжелой цепи (VH) SEQ ID No.7 (B-HH6 из WO 2005/044859 и WO 2007/031875) и вариабельную область легкой цепи (VL) SEQ ID No. 20 (B-KV1 из WO 2005/044859 и WO 2007/031875). Кроме того, в одном варианте реализации изобретения гуманизированное антитело B-Ly1 представляет собой антитело IgG1. Согласно настоящему изобретению такие дефукозилированные антитела B-Ly1 с сегментом Fc, измененным методом гликоинженерии, согласно процедуре, описанной в WO 2005/044859, WO 2004/065540, WO 2007/031875, Umana, P. et al., *Nature Biotechnol.* 17 (1999) 176-180 и WO 99/154342. В одном варианте реализации изобретения дефукозилированное, полученное с использованием гликоинженерии гуманизированное антитело B-Ly1 представляет собой B-HH6-B-KV1 GE. В одном варианте реализации изобретения антитело к CD20 представляет собой обинутузумаб (рекомендованный INN, WHO Drug Information, Vol.26, №4, 2012, p.453). В данном описании обинутузумаб является синонимом GA101 или RO5072759. Он заменяет все предыдущие варианты (например, Vol.25, No.1, 2011, p.75-76) и ранее был известен как афутузумаб (рекомендованный INN, WHO Drug Information, Vol.23, No.2, 2009, p.176; Vol.22, No.2, 2008, p.124). В некоторых вариантах реализации изобретения гуманизированное антитело B-Ly1 представляет собой антитело, содержащее тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:21, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:22, или ее антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах реализации изобретения гуманизированное антитело B-Ly1 содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую три CDR тяжелой цепи SEQ ID NO:21, и вариабельную область легкой цепи, содержащую три CDR легкой цепи SEQ ID NO:22.

Тяжелая цепь (SEQ ID NO:21)

QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYAFS YSWINWVRQA PGQGLEWMGR 50  
IFPGDGD TDY NGKFKGRVTI TADKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARNV 100  
FDGYWL VYWG QGTLVTVSSA STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD 150  
YFPEPVT VSW NSGALTSGVH TFPVLQSSG LYSLSVVTV PSSSLGTQTY 200  
ICNVNHKPSN TKVDKKVEPK SCDKTHTCPP CPAPELLG GP SVFLFPPKPK 250  
DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS 300  
TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV 350  
YTLPPSRDEL TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPVL 400



DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPGK 449

Легкая цепь (SEQ ID NO:22)

DIVMTQTPLS LPVTPGEPAS ISCRSSKSLL HSNGITYLYW YLQKPGQSPQ 50

LLIYQMSNLV SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCAQNLELP 100

5 YTFGGGKVE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK 150

VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE 200

VTHQGLSPV TKSFNRGEC 219

[0090] В некоторых вариантах реализации изобретения гуманизированное антитело B-Ly1 представляет собой дефукозилированное полученное методом гликоинженерии гуманизированное B-Ly1. Такие полученные методом гликоинженерии гуманизированные антитела B-Ly1 имеют измененный паттерн гликозилирования в Fc-области, предпочтительно содержат сниженный уровень фукозных остатков. Предпочтительно количество фукозы составляет 60% или меньше от общего количества олигосахаридов при Asn297 (в одном варианте реализации изобретения количество фукозы составляет от 40% до 60%, в другом варианте реализации изобретения количество фукозы составляет 50% или меньше и еще в одном варианте реализации изобретения количество фукозы составляет 30% или меньше). Кроме того, олигосахариды Fc-области предпочтительно представляют собой олигосахариды с симметричным разветвлением. Эти полученные методом гликоинженерии гуманизированные антитела B-Ly1 обладают повышенной АЗКЦ.

[0091] Олигосахаридный компонент может оказывать значительное влияние на свойства, относящиеся к эффективности терапевтического гликопротеина, включая физическую стабильность, устойчивость к воздействию протеаз, взаимодействия с клетками иммунной системы, фармакокинетику и специфическую биологическую активность. Такие свойства могут зависеть не только от присутствия или отсутствия, но также от специфических структур олигосахаридов. Можно сделать некоторые общие выводы касательно структуры олигосахаридов и функции гликопротеина. Например, определенные олигосахаридные структуры опосредуют быстрый клиренс гликопротеинов из кровяного русла через взаимодействия со специфическими связывающимися с углеводами белками, хотя другие могут быть связаны антителами и запускать иммунные реакции. (Jenkins, N., et al., *Nature Biotechnol.* 14 (1996) 975-81).

[0092] Клетки млекопитающих являются предпочтительными клетками-хозяевами для получения терапевтических гликопротеинов из-за их способности к гликозилированию белков в наиболее приемлемой форме для применения в медицинских целях. (Cumming, D.A., et al., *Glycobiology* 1 (1991) 115-30; Jenkins, N., et al., *Nature Biotechnol.* 14 (1996) 975-81). В клетках бактерий гликозилирование белков происходит очень редко. Белки, подвергшиеся гликозилированию в бактериях, подобно белкам, гликозилированным в других типах клеток, широко используемых для белковой экспрессии, таких как клетки дрожжей, мицелиальных грибов, насекомых и растений, характеризуются ускоренным клиренсом из кровяного русла, нежелательными иммунными реакциями и в некоторых особых случаях с малоэффективным биологическим действием. Среди клеток млекопитающих наиболее часто на протяжении двух последних десятилетий используют клетки яичника китайского хомячка (СНО). Помимо получения стабильных паттернов гликозилирования из этих клеток можно регулярно получать генетически стабильные высокопродуктивные клональные клеточные линии. Их можно культивировать с достижением высоких плотностей в простых биореакторах в бессывороточных средах, и в случае их использования обеспечивается безопасность и воспроизводимость биопроцессов. К другим обычно

используемым клеткам животных относятся клетки почки новорожденного хомяка (БНК), клетки миеломы мыши NSO и SP2/0-. Совсем недавно было изучено их получение из трансгенных животных. (Jenkins, N., et al., *Nature Biotechnol.* 14 (1996) 975-981).

[0093] Все антитела содержат углеводные структуры в консервативных положениях константных областей тяжелой цепи, причем каждый изотип обладает различным набором N-связанных углеводных структур, которые по-разному влияют на сборку, секрецию или функциональное действие белка. (Wright, A., and Morrison, S.L., *Trends Biotech.* 15 (1997) 26-32). Структура присоединяемого N-связанного углевода существенно варьирует в зависимости от степени процессинга и может включать большое количество маннозы, многократно разветвленные олигосахариды, а также олигосахариды сложного типа, состоящие из двух ветвей. (Wright, A., and Morrison, S.L., *Trends Biotech.* 15 (1997) 26-32). Обычно происходит гетерогенный процессинг сердцевинных олигосахаридных структур, присоединенных к определенному сайту гликозилирования, таким образом, что даже моноклональные антитела существуют в виде множества гликоформ.

Аналогичным образом показано, что между клеточными линиями имеются большие различия в гликозилировании антител и наблюдаются даже незначительные различия для конкретной клеточной линии, выращенной в разных условиях культивирования. (Lifely, M.R., et al., *Glycobiology* 5(8) (1995) 813-22).

[0094] Один из способов существенного увеличения активности при сохранении простоты способа получения и потенциальном избежании существенных нежелательных побочных эффектов заключается в повышении природных опосредованных клетками эффекторных функций моноклональных антител путем встраивания их олигосахаридного компонента, как описано в работе Umana, P., et al., *Nature Biotechnol.* 17 (1999) 176-180 и US 6602684. Антитела типа IgG1, которые обычно используют в иммунотерапии рака, являются гликопротеинами с консервативным N-связанным сайтом гликозилирования по положению Asn297 в каждом домене CH2. Два состоящие из двух ветвей олигосахариды сложного типа, присоединенные к Asn297, погружены между доменами CH2, формируя многие контакты с полипептидным каркасом, и их наличие является существенным для того, чтобы антитело опосредовало эффекторные функции, такие как, антителозависимая клеточная цитотоксичность (АЗКЦ) (Lifely, M.R., et al., *Glycobiology* 5 (1995) 813-822; Jefferis, R., et al., *Immunol.Rev.* 163 (1998) 59-76; Wright, A., and Morrison, S.L., *Trends Biotechnol.* 15 (1997) 26-32).

[0095] Ранее было показано, что сверхэкспрессия СНО  $\beta(1,4)$ -N-ацетилглюкозаминилтрансферазы II1 («GnTII17y») - гликозилтрансферазы, катализирующей формирование разветвленных олигосахаридов, в клетках яичника китайского хомячка существенно повышает *in vitro* АЗКЦ-активность антинейробластомного химерного моноклонального антитела (chCE7), вырабатываемого генетически модифицированными клетками СНО. (См. Umana, P., et al., *Nature Biotechnol.* 17 (1999) 176-180; и WO 99/154342, полные содержания которых включены в данный документ посредством ссылки. Антитело chCE7 принадлежит к большому классу неконъюгированных моноклональных антител, которые обладают высокой аффинностью и специфичностью по отношению к опухолям, но обладают слишком низкой активностью для того, чтобы обладать клиническим эффектом при продукции в стандартных промышленных линиях клеток, не имеющих фермента GnTIII (Umana, P., et al., *Nature Biotechnol.* 17 (1999) 176-180). В данном исследовании впервые было показано, что значительное увеличение активности АЗКЦ может быть достигнуто путем конструирования антителопродуцирующих клеток для экспрессии GnTIII, что также приводит к увеличению доли ассоциированных с константной областью (Fc)

олигосахаридов с симметричным разветвлением, включая дефукозилированные олигосахариды с симметричным разветвлением, с уровнем выше, чем встречается в антителах природного происхождения.

[0096] Термин «лечение» относится как к терапевтическому воздействию, так и к профилактическим или превентивным мерам. Нуждающиеся в лечении включают тех, кто уже имеет данное заболевание, а также тех, у которых это заболевание должно быть предотвращено.

[0097] «Заболевание» представляет собой любое состояние, на лечение которого может быть оказано благотворное воздействие, включая, в том числе, хронические и острые заболевания или нарушения, включая те патологические состояния, которые увеличивают предрасположенность млекопитающего к рассматриваемому нарушению. Заболевания включают ангиогенные заболевания. Используемый здесь термин «ангиогенное заболевание» относится к любому состоянию, в которое вовлечен избыточный ангиогенез или избыточная проницаемость сосудов, или экссудация. Неограничивающие примеры ангиогенных заболеваний, которые необходимо лечить, в данном документе включают злокачественные и доброкачественные опухоли; нелейкемические опухоли и лимфолейкозы; и, в частности, опухолевые (раковые) метастазы.

[0098] «Патологический ангиогенез» происходит при избыточном или нарушенном иным образом росте новых кровеносных сосудов (например, местоположение, временные рамки, степень или начало процесса ангиогенеза, нежелательные с медицинской точки зрения) при патологическом состоянии, или тогда, когда это является причиной патологического состояния. В некоторых случаях, избыточной, неконтролируемый или иной патологический ангиогенез происходит, когда наблюдается рост новых кровеносных сосудов, что способствует ухудшению патологического состояния или является причиной развития патологического состояния. Новые кровеносные сосуды могут обеспечивать питание пораженных тканей, разрушение здоровых тканей и, в случае злокачественной опухоли, новые сосуды могут способствовать выходу опухолевых клеток в кровоток и попаданию в другие органы (метастазы опухоли). Примеры заболеваний с участием патологического ангиогенеза включают, в том числе, злокачественную опухоль, в особенности, васкуляризированные солидные опухоли и метастатические опухоли (включая рак толстой кишки, легких (в особенности мелкоочечный рак легких) или рак предстательной железы), заболевания, вызванные окулярной неоваскуляризацией, в особенности, диабетическая слепота, ретинопатии, первичная диабетическая ретинопатия или возрастная макулодистрофия, хороидальная неоваскуляризация (CNV), диабетический макулярный отек, патологическая миопия, болезнь Гиппеля-Линдау, гистоплазмоз глаза, окклюзия центральной вены сетчатки (CRVO), неоваскуляризация роговицы, неоваскуляризация сетчатки и покраснение радужки; псориаз, псориазный артрит, гемангиобластома, как, например, гемангиома; воспалительные заболевания почек, как, например, гломерулонефрит, в особенности, мезангиопролиферативный гломерулонефрит, гемолитико-уремический синдром, диабетическая нефропатия или гипертонический нефросклероз; различные воспалительные заболевания, такие как артрит, в особенности, ревматоидный артрит, воспалительная болезнь кишечника, псориаз, саркоидоз, артериальный артериосклероз и заболевания, развившиеся после трансплантации, эндометриоз или хроническую астму, и другие состояния.

[0099] «Патологическая проницаемость сосудов» возникает, когда поток жидкостей, молекул (например, ионов и питательных веществ) и клеток (например, лимфоцитов)

между сосудистыми и внесосудистыми участками является избыточным или нарушенным иным образом (например, местоположение, временные рамки, степень или начало процесса ангиогенеза, нежелательные с медицинской точки зрения) при патологическом состоянии, или тогда, когда это является причиной патологического состояния.

- 5 Патологическая проницаемость сосудов может привести к избыточной или нарушенной иным образом «экссудации» ионов, воды, питательных веществ или клеток через сосудистую сеть. В некоторых случаях избыточная, неконтролируемая или нарушенная иным образом проницаемость сосудов или экссудация сосудов приводит к обострению или возникновению патологических состояний, включающих, например, отек,
- 10 ассоциированный с опухолями, включая, например, опухоли головного мозга; асциты, ассоциированные со злокачественными новообразованиями; синдром Мейгса; воспалительный процесс в легких; нефротический синдром; экссудативный перикардит; экссудативный плеврит; проницаемость, ассоциированную с сердечно-сосудистыми заболеваниями, такими как состояние после инфаркта миокарда и инсультов, и тому
- 15 подобное. В настоящем изобретении предусмотрено лечение тех пациентов, у которых развились или имеется риск развития заболеваний или нарушений с патологической проницаемостью или экссудацией сосудов.

[0100] Термины «клеточно-пролиферативное заболевание» и «пролиферативное заболевание» относятся к заболеваниям, которые ассоциированы с той или иной

20 степенью избыточной клеточной пролиферации. В одном варианте реализации изобретения клеточно-пролиферативное заболевание представляет собой злокачественную опухоль. В одном варианте реализации изобретения клеточно-пролиферативное заболевание представляет собой опухоль.

[0101] Используемый здесь термин «опухоль» относится к росту и пролиферации всех

25 опухолевых клеток, либо злокачественных, либо доброкачественных, и всех предраковых и раковых клеток и тканей. Термины «рак», «раковый», «клеточно-пролиферативное заболевание», «пролиферативное заболевание» и «опухоль» не являются взаимоисключающими, как изложено в данном документе.

[0102] Термины «рак» и «раковый» служат для обозначения или описания

30 физиологического состояния у млекопитающих, которое обычно характеризуется нерегулируемым ростом клеток. Примеры рака включают, в том числе, карциному, лимфому, бластому, саркому и лейкоз или лимфоидные злокачественные новообразования. Более конкретные примеры таких злокачественных опухолей включают, в том числе, плоскоклеточный рак (например, эпителиальный

35 плоскоклеточный рак), рак легких, включая мелкоклеточный рак легких, немелкоклеточный рак легких, аденокарциному легкого и плоскоклеточный рак легкого, перитонеальный рак, печеночно-клеточный рак, рак ЖКТ или рак желудка, включая, рак желудочно-кишечного тракта и гастроинтестинальную стромальную опухоль, рак поджелудочной железы, глиобластому, рак шейки матки, рак яичников, рак печени,

40 рак мочевого пузыря, рак мочевыводящих путей, гепатому, рак молочной железы, рак толстой кишки, рак прямой кишки, рак толстой и прямой кишок, рак эндометрия или матки, карциному слюнных желез, рак почки или почечный рак, рак предстательной железы, рак вульвы, рак щитовидной железы, карциному печени, рак анального канала, рак полового члена, меланому, поверхностно распространяющуюся меланому, меланому

45 типа злокачественного лентиго, акральные лентигинозные меланомы, узловатые меланомы, множественные миеломы и В-клеточную лимфому (в том числе слабо выраженную/фолликулярную неходжкинскую лимфому (НХЛ); мелкоклеточную лимфоцитарную (SL) НХЛ; средней степени/фолликулярную НХЛ; средней степени

диффузную НХЛ; высокодифференцированную иммунобластную НХЛ; высокодифференцированная лимфобластная НХЛ; высокодифференцированная мелкоклеточную с нерасщепленным ядром НХЛ; генерализованную лимфоаденопатию при НХЛ; лимфому из клеток зоны мантии; СПИД-ассоциированную лимфому; и макроглобулинемию Вальденстрема); хронический лимфолейкоз (CLL); острый лимфобластный лейкоз (ALL); волосатоклеточный лейкоз; хронический миелобластный лейкоз; и лимфопролиферативное заболевание после трансплантации (PTLD), а также избыточную пролиферацию сосудов, ассоциированную с фактоматозом, отеком (как, например, ассоциированным с опухолями головного мозга), синдромом Мейгса, раком головного мозга, а также головы и шеи, а также ассоциированные метастазы. В определенных вариантах реализации изобретения злокачественные опухоли, поддающиеся лечению антителами по настоящему изобретению, включают рак молочной железы, колоректальный рак, рак прямой кишки, немелкоклеточный рак легкого, глиобластому, неходжкинскую лимфому (НХЛ), почечно-клеточный рак, рак предстательной железы, рак печени, рак поджелудочной железы, саркомой мягких тканей, саркому Капоши, карциноид, карциному, рак головы и шеи, рак яичников, мезотелиому и множественную миелому. В некоторых вариантах реализации изобретения злокачественная опухоль выбрана из: немелкоклеточного рака легких, глиобластомы, нейробластомы, меланомы, карциномы молочной железы, рака желудка, колоректального рака (КРР) и гепатоцеллюлярной карциномы. Еще в других вариантах реализации изобретения злокачественная опухоль выбрана из: немелкоклеточного рака легких, колоректального рака, глиобластомы и карциномы молочной железы, включая метастатические формы этих злокачественных опухолей.

[0103] Термин «противораковая терапия» относится к терапии, используемой в лечении рака. Примеры противораковых терапевтических средств включают, в том числе, например, химиотерапевтические средства, средства-ингибиторы роста, цитотоксические средства, средства, используемые в радиотерапии, антиангиогенные средства, аптотические средства, средства-ингибиторы полимеризации тубулина и другие средства для лечения рака, такие как антитела к HER-2, антитела к CD20, антагонист рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) (например, ингибитор тирозинкиназы), ингибитор HER1/EGFR (например, эрлотиниб (Tarceva™), ингибиторы тромбоцитарного фактора роста (например, Gleevec™ (иматиниба мезилат)), ингибитор COX-2 (например, целекоксиб), интерфероны, цитокины, антагонисты (например, нейтрализующие антитела), которые связываются с одной или более следующими мишенями ErbB2, ErbB3, ErbB4, PDGFR-бета, BlyS, APRIL, BCMA или рецептор(ы) VEGF, TRAIL/Apo2 и другие биологически активные и органические химические средства, и тому подобное. Их комбинации также включены в настоящее изобретение.

[0104] «Ангиогенный фактор или средство» представляет собой фактор роста или его рецептор, который участвует в стимуляции развития кровеносных сосудов, например, стимулирует ангиогенез, рост эндотелиальных клеток, устойчивость кровеносных сосудов, и/или васкулогенез, и тому подобное. Например, ангиогенные факторы включают, в том числе, например, VEGF и члены семейства VEGF и их рецепторы (VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGFR1, VEGFR2 и VEGFR3), PlGF, семейство PDGF, семейство фактора роста фибробластов (FGF), лиганды TIE (ангиопозтины, ANGPT1, ANGPT2), TIE1, TIE2, эфрины, Bv8, дельта-подобный лиганд 4 (DLL4), Del-1, факторы роста фибробластов: кислые (aFGF) и основные (bFGF), FGF4, FGF9, BMP9, BMP10, Фоллистатин, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF), GM-CSF, фактор роста гепатоцитов (HGF)/рассеивающий фактор (SF), Интерлейкин-8 (IL-8),

СХСL12, лептин, мидкин, нейропилины, NRP1, NRP2, плацентарный фактор роста, тромбоцитарный эндотелиальный фактор роста (PD-ECGF), тромбоцитарный фактор роста, в особенности PDGF-BB, PDGFR-альфа или PDGFR-бета, плеiotрофин (PTN), програнулин, пролиферин, трансформирующий фактор роста альфа (TGF-альфа), трансформирующий фактор роста бета (TGF-бета), фактор некроза опухоли альфа (TNF-альфа), Alk1, CXCR4, Notch1, Notch4, Sema3A, Sema3C, Sema3F, Robo4, и тому подобное. Также дополнительно могут быть включены факторы, которые стимулируют ангиогенез, такие как ESM1 и перлекан. Также могут быть включены факторы, которые ускоряют заживление ран, такие как гормон роста, инсулиноподобный фактор роста-I (IGF-I), VIGF, эпидермальный фактор роста (EGF), EGF-подобный домен, комплексный 7 (EGFL7), CTGF и члены его семейства, и TGF-альфа, и TGF-бета. См., например, Klagsbrun and D'Amore (1991) *Annu.Rev.Physiol.*53:217-39; Streit and Detmar (2003) *Oncogene* 22:3172-3179; Ferrara & Alitalo (1999) *Nature Medicine* 5(12):1359-1364; Tonini et al. (2003) *Oncogene* 22:6549-6556 (например, в Таблице 1 перечислены известные ангиогенные факторы); и Sato (2003) *Int. J. Clin.Oncol.*8:200-206.

[0105] Термин «антиангиогенное средство» или «ингибитор ангиогенеза» относится к низкомолекулярному веществу, полинуклеотиду (включая, например, ингибитор РНК (иРНК или миРНК)), полипептиду, выделенному белку, рекомбинантному белку, антителу или конъюгатам или их слитым белкам, которые ингибируют ангиогенез, васкулогенез или нежелательную проходимость сосуда, любой в прямой или скрытой форме. Следует понимать, что антиангиогенное средство включает те средства, которые связывают и блокируют ангиогенную активность ангиогенного фактора или его рецептора. Например, антиангиогенное средство представляет собой антитело или другой антагонист ангиогенного средства, как описано выше, например, антитела к VEGF-A или к рецептору VEGF-A (например, рецептору KDR или рецептору Flt-1), ингибиторы PDGFR, малые молекулы, что блокируют передачу сигнала через рецептор VEGF (например, PTK787/ZK2284, SU6668, SUTENT®/SU11248 (сунитиниб малат), AMG706 или те вещества, которые были описаны, например, в международной заявке на патент WO 2004/113304). Антиангиогенные средства включают, в том числе, следующие средства: ингибиторы VEGF, такие как VEGF-специфический антагонист, ингибитор EGF, ингибиторы EGFR, Erbitux® (цетуксимаб, ImClone Systems, Branchburg, N.J.), Vectibix® (панитумумаб, Amgen, Thousand Oaks, Calif.), ингибиторы TIE2, ингибиторы IGF1R, ингибиторы COX-II (циклооксигеназа II), ингибиторы MMP-2 (матриксная металлопротеиназа 2), и ингибиторы MMP-9 (матриксная металлопротеиназа 9), CP-547,632 (Pfizer Inc., NY, USA), Акситиниб (Pfizer Inc.; AG-013736), ZD-6474 (AstraZeneca), AEE788 (Novartis), AZD-2171), VEGF Trap (Regeneron/Aventis), Ваталаниб (также известный как PTK-787, ZK-222584: Novartis & Schering A G), Макуген (пегаптаниб натрия, NX-1838, EYE-001, Pfizer Inc./Gilead/Eyetech), IM862 (Cytran Inc. of Kirkland, Wash., USA); и ангиозим, синтетический рибозим от Ribozyme (Boulder, Colo.) и Хирон (Emeryville, Calif.), и их комбинации. Другие ингибиторы ангиогенеза включают тромбоспондин1, тромбоспондин2, коллаген IV и коллаген XVIII. Ингибиторы VEGF описаны в патентах США №№6534524 и 6235764, оба из которых включены целиком и безоговорочно. Антиангиогенные средства также включают природные ингибиторы ангиогенеза, например, ангиостатин, эндостатин и т.д. См., например, Klagsbrun and D'Amore (1991) *Annu.Rev.Physiol.*53:217-39; Streit and Detmar (2003) *Oncogene* 22:3172-3179 (например, в Таблице 3 перечислены антиангиогенные средства для лечения злокачественной меланомы); Ferrara & Alitalo (1999) *Nature Medicine*

5(12):1359-1364;(2003) *Oncogene* 22:6549-6556 (например, в Таблице 2 перечислены известные антиангиогенные факторы); и Sato (2003) *Int.J. Clin.Oncol.*8:200-206 (например, в Таблице 1 перечислены антиангиогенные средства, используемые в клинических испытаниях).

5 [0106] Термин «антиангиогенная терапия» относится к терапии, пригодной к использованию для ингибирования ангиогенеза, что включает введение антиангиогенного средства.

[0107] Используемый в данном документе термин «злокачественная опухоль, клетки которой экспрессируют CD20» относится ко всем злокачественным опухолям, клетки  
10 которых экспрессируют антиген CD20. Предпочтительно используемый в данном документе термин «злокачественная опухоль, клетки которой экспрессируют CD20» относится к лимфомам (предпочтительно В-клеточным неходжкинским лимфомам (НХЛ)) и лимфоцитарным лейкозам. Такие лимфомы и лимфоцитарные лейкозы включают, например, а) фолликулярные лимфомы, б) мелкоклеточные лимфомы с  
15 нерасщепленным ядром/лимфому Беркитта (включая эндемическую лимфому Беркитта, спорадическую лимфому Беркитта и лимфому, не являющуюся лимфомой Беркитта), в) лимфомы маргинальной зоны (включая экстранодальную В-клеточную лимфому маргинальной зоны (лимфомы лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистыми оболочками, MALT), нодальную В-клеточную лимфому маргинальной зоны и  
20 селезеночную лимфому маргинальной зоны), г) лимфому из клеток мантии (MCL), д) крупноклеточную лимфому (включая В-клеточную диффузную крупноклеточную лимфому (DLCL), диффузную смешанно-клеточную лимфому, иммунобластную лимфому, первичную медиастинальную В-клеточную лимфому, лимфангиому - легочную В-клеточную лимфому, е) лейкоз ворсистых клеток, ж) лимфоцитарную лимфому,  
25 макроглобулинемию Вальденстрема, з) острый лимфоцитарный лейкоз (ALL), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL)/мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому (SLL), В-клеточный пролимфоцитарный лейкоз, и) новообразования плазматических клеток, миелому плазматических клеток, множественную миелому, плазмацитому, к) болезнь Ходжкина.

30 [0108] Более предпочтительно, злокачественная опухоль, клетки которой экспрессируют CD20, представляет собой В-клеточную неходжкинскую лимфому (НХЛ). Особенно злокачественная опухоль, клетки которой экспрессируют CD20, представляет собой лимфому из клеток зоны мантии (MCL), острый лимфоцитарный лейкоз (ALL), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), В-клеточную диффузную крупноклеточную  
35 лимфому (DLCL), лимфому Беркита, лейкоз ворсистых клеток, фолликулярную лимфому, множественную миелому, лимфому маргинальной зоны, посттрансплантационное лимфопролиферативное расстройство (PTLD), ВИЧ-ассоциированную лимфому, макроглобулинемию Вальденстрема или первичную лимфому ЦНС.

[0109] Используемый в настоящем документе термин «цитотоксическое средство»  
40 относится к веществу, которое подавляет и нарушает функцию клеток и/или вызывает клеточную гибель или деструкцию. Подразумевается, что термин охватывает радиоактивные изотопы (например, At<sup>211</sup>, I<sup>131</sup>, I<sup>125</sup>, Y<sup>90</sup>, Re<sup>186</sup>, Re<sup>188</sup>, Sm<sup>153</sup>, Bi<sup>212</sup>, P<sup>32</sup>, Pb<sup>212</sup> и радиоактивные изотопы Lu), химиотерапевтические средства (например,  
45 метотрексат, адриамицин, алкалоиды барвинка (винкристин, винбластин, этопозид), доксорубицин, мелфалан, митомицин С, хлорамбуцил, даунорубицин или другие интеркалирующие средства, ферменты и их фрагменты, такие как, нуклеолитические ферменты, антибиотики и токсины, такие как низкомолекулярные токсины или ферментативно активные токсины бактериального, грибкового, растительного или

животного происхождения, включая их фрагменты и/или их варианты, и различные противоопухолевые или противораковые средства, описанные ниже. Ниже описаны другие цитотоксические средства. Туморицидное средство вызывает разрушение опухолевых клеток.

[0110] «Токсином» является любое вещество, способное оказывать отрицательный эффект на рост или пролиферацию клетки.

[0111] «Химиотерапевтическое средство» представляет собой химическое соединение, которое можно использовать в лечении рака. Примеры химиотерапевтических средств включают алкилирующие средства, например, тиотепа и циклофосфамид (CYTOXAN®); алкилсульфонаты, такие как, бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как, бензодопу, карбоквон, метуредопу и уредопу; этиленимины и метиламеламины, включая алтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилентифосфорамид и триметилмеламин; ацетогенины (особенно буллатацин и буллатацинон); дельта-9-тетрагидроканнабинол (дронабинол, MARINOL®); бета-лапахон; лапахол; колхицины; бетулиновую кислоту; камптотецин (включая синтетический аналог топотекана (HYCAMTIN®), CPT-11 (иринотекан, CAMPTOSAR®), ацетилкамптотецин, скополетин и 9-аминокамптотецин); бриостатин; каллистатин; CC-1065 (включая его синтетические аналоги адоцелезин, карцелезин и бицелезин); 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; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, хлорфосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлоретамин, мехлоретаминоксидгидрохлорид, мелфалан, новембицин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урамустин; нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорзотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин и ранимнустин; антибиотики, такие как энединовые антибиотики (например, калихеамицин, особенно калихеамицин-гамма-11 и калихеамицин-омега-11 (см., например, Nicolaou et al., *Angew.Chem Intl.Ed.Engl.*,33:183-186 (1994))); CDP323, пероральный ингибитор α-4 интегрина; динемидин, включая динемидин А; эсперамицин; а также неокарцинонхромомин и родственные хромопротеиновые хромофорные антибиотики энедины), аклациномизины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, сактиномицин, карабицин, карминомицин, карцинофилин, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин (включая ADRIAMYCIN®, морфолинодоксорубицин, цианоморфолинодоксорубицин, 2-пирролино-доксорубицин, инъекционные липосомы с доксорубицином HCl (DOXIL®), липосомный доксорубицин TLC D-99 (MYOCET®), пегилированный липосомный доксорубицин (CAELYX®) и дезоксидоксорубицин), эпирубицин, эзорубицин, идарубицин, марцелломицин, митомицины, такие как митомицин С, микофеноловая кислота, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, порфирамицин, пурамицин, квеламицин, роторубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат, гемцитабин (GEMZAR®), тегафур (UFTORAL®), капецитабин (XELODA®), эпотилон и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметотрексат; аналоги пурина, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; аналоги пиримидина, такие как анцитабин, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин; андрогены, такие как калустерон, дромостанолон пропионат, эпителиостанол, мепителиостан, тестолактон;



противоадrenalовые средства, такие как аминоклутетимид, митотан, трилостан; компенсатор фолиевой кислоты, такой как фолиевая кислота; ацеллатон; альдофосфамид гликозид; аминоклевулиновую кислоту; энилурацил; амсакрин; бестрабуцил; бисантрон; эдатраксат; дефофамин; демеколцин; диазиквон; эфлорнитин;

5 эллиптиний ацетат; эпотилон; этоглуцид; нитрат галлия; гидроксимочевина; лентинан; лонидаинин; майтанзиноиды, такие как майтанзин и ансамитоцины; митогуазон; митоксантрон; мопиданмол; нитраэрин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; лозоксантрон; 2-этилгидразид; прокарбазин; полисахаридный комплекс PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); разоксан; ризоксин; сизофиран; спирогерманий;

10 тенуазоновую кислоту; триазикивон; 2,2',2'-трихлортриэтиламин; трихотецены (в частности, токсин Т-2, верракурин А, роридин А и ангуидин); уретан; виндезин (ELDISINE®, FILDESIN®); дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид («Ара-С»); тиотепу; таксоид, например, паклитаксел (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Принстон, Нью-Джерси AXOL), состав

15 паклитаксела в сконструированных из альбумина наночастицах (ABRAXANE™) и доцетаксел (TAXOTERE®); хлоранбуцил; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; платиновые средства, такие как цисплатин, оксалиплатин, например ELOXATIN® и карбоплатин; алкалоиды барвинка, которые препятствуют полимеризации тубулина при образовании микротрубочек, включая винбластин (VELBAN®), винкристин

20 (ONCOVIN®), виндезин (ELDISINE®, FILDESIN®) и винорелбин (NAVELBINE®); этопозид (VP- 16); ифосфамид; митоксантрон; лейковорин; новантрон; эдатрексат; дауномицин; аминоклутерин; ибандронат; ингибитор топоизомеразы RFS 2000; диформетилорнитин (DMFO); ретиноиды, такие как ретиноевая кислота, включая бексаротен (TARGRETIN®); бисфосфонаты, такие как клодронат (например, BONEFOS®

25 или OSTAC®), этидронат (DIDROCAL®), NE-58095, золедроновая кислота/золедронат (ZOMETA®), алендронат (FOSAMAX®), памидронат (AREDIA®), тилудрона (SKELID®) или ризедронат (ACTONEL®); троксацидабин (1,3-диоксолановый аналог нуклеозида цитозин); антисмысловые олигонуклеотиды, в частности те, которые ингибируют экспрессию генов в путях передачи сигнала, вовлеченных в аберрантную клеточную

30 пролиферацию, таких как, например, PKC-α, Raf, H-Ras и рецептор эпидермального фактора роста (EGF-R); (например, эрлотиниб (Tarceva™)); и VEGF-A, который уменьшает пролиферацию клеток, вакцины, такие как вакцина THERATOPE® и генотерапевтические вакцины, например, вакцина ALLOVECTIN®, вакцина LEUVECTIN® и вакцина VAXID®; ингибитор топоизомеразы 1 (например,

35 LURTOTECAN®); гмРН (например, ABARELIX®); BAY439006 (сорафениб; Bayer); SU-11248 (сунитиниб, SUTENT®, Pfizer); перифосин, COX-2 ингибитор COX-2 (например, целекоксиб или эторикоксиб), протеасомный ингибитор (например, PS341); бортезомиб (VELCADE®); CCI-779; типифарниб (R11577); орафениб, ABT510; ингибитор Bcl-2, такой как облимерсен натрия (GENA-SENSE®); пиксантрон; (ингибиторы EGFR;

40 ингибиторы тирозинкиназы; ингибиторы серин-треонин киназы, такие как рапамицин (сиролимус, RAPAMUNE®); ингибиторы фарнезилтрансферазы, такие как лонафарниб (SCH 6636, SARASAR™); и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого указанного выше; а также комбинации двух или более указанных выше, такие как CHOP, сокращение для комбинированной терапии циклофосфамидом,

45 доксорубицином, винкристином и преднизолоном; и FOLFOX, сокращение для схемы лечения с использованием оксалиплатина (ELOXATIN™) в комбинации с 5-FU и лейковорином; и фармацевтически приемлемых солей, кислот или производных любых из выше перечисленных веществ; а также комбинации из двух или более из выше

перечисленных веществ.

[0112] Как указано в данном документе, химиотерапевтические средства включают «антигормональные средства» или «терапевтические средства, воздействующие на эндокринную систему», которые регулируют, уменьшают, блокируют или ингибируют эффекты гормонов, что могут содействовать росту злокачественной опухоли. Они могут представлять собой гормоны, включая в том числе: анти-эстрогены и селективные модуляторы рецептора эстрогена (SERM), в том числе, например, тамоксифен (включая тамоксифен NOLVADEX®), ралоксифен, дролоксифен, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон и FARESTON торемифен; ингибиторы ароматазы, которые ингибируют фермент ароматаза, который регулирует продукцию эстрогена в надпочечниках, такие как, например, 4(5)-имидазолы, аминоклутетимид, мегестрол ацетат MEGASE®, экземестан AROMASIN®, форместан, фодрозол, ворозол RIVISOR®, летрозол FEMARA®, и анастрозол ARIMIDEX®; и анти-андрогены, такие как флутамид, нилутамид, бикалутамид, лейпролид и гoserелин; а также троксацитабин (1,3-диоксолановый аналог нуклеозида цитозина); антисмысловые олигонуклеотиды, в частности олигонуклеотиды, которые ингибируют экспрессию генов в путях передачи сигналов, участвующих в aberrантной пролиферации клеток, таких как, например PKC-альфа, Ralf и H-Ras; рибозимы, такие как ингибитор экспрессии VEGF (например, рибозим ANGIOZYME®) и ингибитор экспрессии HER2; вакцины, такие как вакцины, применяемые при генотерапии, например, вакцина ALLOVECTIN®, вакцина LEUVECTIN® и вакцина VAXID®; PROLEUKIN® rIL-2; ингибитор топоизомеразы 1 LURTOTECAN®; ABARELIX® gmRH; винорелбин и эсперамицины (см. патент США №4675187), и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из перечисленных веществ; а также две или более комбинации любого из перечисленных веществ.

[0113] Используемый в настоящем документе термин «ингибитор роста» относится к соединению или композиции, которая ингибирует рост клетки или *in vitro*, или *in vivo*. В одном варианте реализации изобретения ингибитор роста представляет собой антитело-ингибитор роста, предотвращающее или уменьшающее пролиферацию клетки экспрессирующей антиген, с которым связывается антитело. В другом варианте реализации изобретения ингибитор роста может представлять собой ингибитор, который значительно уменьшает процентную долю клеток в S-фазе. Примеры ингибиторов роста включают ингибиторы, блокирующие ход клеточного цикла (на этапе, отличающемся от S-фазы), такие как средства, индуцирующие остановку G1- и M-фазы. Классические блокаторы M-фазы включают алкалоиды барвинка (винкристин и винбластин), таксаны и ингибиторы топоизомеразы II, такие как доксорубин, эпирубин, даунорубин, этопозид и блеомицин. Эти средства, которые блокируют G1, также приводят к остановке S-фазы, например, ДНК-алкилирующие агенты, такие как тамоксифен, преднизолон, дакарбазин, мехлорэтамин, цисплатин, метотрексат, 5-фторурацил и ara-C. Дополнительную информацию можно найти в работе Mendelsohn and Israel, eds., *The Molecular Basis of Cancer*, Глава 1, с названием «Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs», автором которой является Murakami et al. (W.B.Saunders, Филадельфия, 1995), например, стр.13. Таксаны (паклитаксел и доцетаксел) являются противораковыми препаратами, оба из которых получают из тиса. Доцетаксел (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), получаемый из европейского тиса, является полусинтетическим аналогом паклитаксела (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). Паклитаксел и доцетаксел стимулируют сборку микротрубочек из димеров тубулина и стабилизируют микротрубочки, предотвращая их деполимеризацию, что приводит к ингибированию

митоза в клетках.

[0114] Под «радиотерапией» подразумевается применение направленного гамма-излучения или бета-излучения для индукции соответствующего повреждения клеток, с тем, чтобы ограничить их нормальную функциональную активность или обеспечить полное разрушение клеток. Следует понимать, что в данной области известно много способов определения дозировки и продолжительности лечения. Типичный курс лечения включает однократное воздействие, а типичные дозы находятся в диапазоне от 10 до 200 единиц (Грей) в сутки.

[0115] «Субъект» или «индивидуум» в целях лечения относится к любому животному, относящемуся к классу млекопитающих, включая людей, домашних и сельскохозяйственных животных, а также животных зоопарка, спортивных животных или домашних любимцев, таких как собаки, лошади, коровы и т.д. Предпочтительно млекопитающее представляет собой человека.

[0116] Термин «антитело» используется в самом широком смысле и конкретно охватывает моноклональные антитела (включая полноразмерные моноклональные антитела), поликлональные антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела) и фрагменты антител, при условии, что они проявляют желаемую биологическую активность.

[0117] «Выделенное» антитело представляет собой антитело, идентифицированное и отделенное и/или извлеченное из компонентов среды, окружающей его в природе. Загрязняющие компоненты окружающей природной среды представляют собой материалы, которые могут мешать исследовательскому, диагностическому или терапевтическому применению антитела, и могут включать ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворенные вещества. В некоторых вариантах реализации антитело является очищенным (1) более чем на 95% по массе антитела, согласно, например, методике Лоури, а в некоторых вариантах реализации - более чем на 99% по массе; (2) до степени, достаточной для получения по меньшей мере 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности путем использования, например, секвенатора с вращающимся стаканом, или (3) до однородности согласно электрофорезу в ДСН-ПААГ в восстановительных или невосстановительных условиях с использованием, например, красителя Кумасси синего или серебряного. Выделенное антитело включает антитело *in situ* в рекомбинантных клетках, поскольку по меньшей мере один из компонентов природной среды антитела отсутствует. В то же время обычно выделенное антитело получают с использованием по меньшей мере одного этапа очистки.

[0118] «Природные антитела» обычно представляют собой гетеротетрамерные гликопротеины с молекулярной массой приблизительно 150000 дальтон, состоящие из двух идентичных легких (L) цепей и двух идентичных тяжелых (H) цепей. Каждая легкая цепь связана с тяжелой цепью одной ковалентной дисульфидной связью, хотя количество дисульфидных связей варьирует среди тяжелых цепей различных изотипов иммуноглобулинов. Каждая тяжелая и легкая цепи также имеет расположенные с равными интервалами внутрицепочечные дисульфидные мостики. На одном конце каждой тяжелой цепи находится вариабельный домен ( $V_H$ ), а затем - ряд константных доменов. На одном конце каждой легкой цепи находится вариабельный домен ( $V_L$ ), а на другом конце - константный домен; константный домен легкой цепи выровнен с первым константным доменом тяжелой цепи, а вариабельный домен легкой цепи выровнен с вариабельным доменом тяжелой цепи. Предполагается, что конкретные аминокислотные остатки должны образовывать область разделения между

вариабельными доменами легкой цепи и тяжелой цепи.

[0119] Термин «константный домен» относится к участку молекулы иммуноглобулина, имеющий более сохраненную аминокислотную последовательность по сравнению с другим участком иммуноглобулина, вариабельного домена, содержащий антигенсвязывающий сайт. Константный домен содержит C<sub>H</sub>1, C<sub>H</sub>2 и C<sub>H</sub>3 домены (вместе, CH) тяжелой цепи и CHL (или CL) домен легкой цепи.

[0120] «Вариабельная область» или «вариабельный домен» антитела относится к N-концевым доменам тяжелой или легкой цепи антитела. Вариабельный домен тяжелой цепи может носить название «V<sub>H</sub>». Вариабельный домен легкой цепи может носить название «V<sub>L</sub>». Эти домены обычно являются наиболее изменчивыми частями антитела и содержат антигенсвязывающие сайты.

[0121] Термин «вариабельный» относится к тому факту, что последовательности некоторых частей вариабельных доменов сильно различаются у разных антител и вносят вклад в связывание и специфичность каждого конкретного антитела по отношению к его конкретному антигену. В то же время, изменчивость не является равномерно распределенной по вариабельным доменам антител. Она сосредоточена в трех сегментах вариабельных доменов как легкой, так и тяжелой цепи, называемых гипервариабельными областями (HVR). Более консервативные фрагменты вариабельных доменов называются каркасными областями (FR). Каждый вариабельный домен нативных легких и тяжелых цепей содержит четыре области FR, преимущественно принимающих конфигурацию бета-листа и соединенных тремя HVR, образующими петли, соединяющие структуры бета-типа, а в некоторых случаях - являющиеся их частью. HVR каждой цепи объединены друг с другом в непосредственной близости от областей FR и, вместе с HVR другой цепи, участвуют в образовании антигенсвязывающего сайта антител (см., Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, Md.(1991)). Константные домены не принимают непосредственного участия в связывании антитела с антигеном, однако проявляют различные эффекторные функции, например, участие антитела в антитело-зависимой клеточной токсичности.

[0122] «Легкие цепи» антител (иммуноглобулинов) любых млекопитающих можно отнести к одному из двух четко различающихся типов, называемых каппа («κ») и лямбда («λ»), на основе аминокислотных последовательностей их константных доменов.

[0123] Термин «изотип» или «подкласс» IgG, используемый в данном документе, подразумевает любой подкласс иммуноглобулинов, обозначающий химические и антигенные характеристики их константных областей.

[0124] В зависимости от аминокислотных последовательностей константных доменов тяжелых цепей, антитела (иммуноглобулины) можно отнести к различным классам. Существует пять основных классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них могут дополнительно подразделяться на подклассы (изотипы), например, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub>, и IgA<sub>2</sub>. Константные домены тяжелой цепи, которые соответствуют различным классам иммуноглобулинов, называются α, δ, ε, γ и μ, соответственно. Хорошо известны субъединичная структура и трехмерная конфигурация различных классов иммуноглобулинов, которые, в целом, описаны, например, в публикации Abbas et al. *Cellular and Mol. Immunology*, 4th ed. (W.B.Saunders, Co., 2000). Антитело может являться частью более крупной гибридной молекулы, образованной путем ковалентного или нековалентного связывания антитела с одним или несколькими другими белками или пептидами.

[0125] Термины «полноразмерное антитело», «интактное антитело» и «целое антитело» в настоящем документе являются взаимозаменяемыми и относятся к антителу в практически интактной форме, а не фрагментам антител, определение которых приведено ниже. Эти термины в особенности относятся к антителу с тяжелыми цепями, содержащими Fc-область.

[0126] Термин «свободное антитело» предложенный в данном документе является антителом, не конъюгированное с цитотоксической группой или радиоактивной меткой.

[0127] «Фрагменты антитела» содержат часть интактного антитела, предпочтительно содержащую его антигенсвязывающую область. Примеры фрагментов антител включают фрагменты Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, и Fv; диатела; линейные антитела; молекулы одноцепочечных антител; и полиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

[0128] При расщеплении антител папаином образуются два идентичных антигенсвязывающих фрагмента, называемых фрагментами «Fab», каждый из которых содержит одиночный антигенсвязывающий сайт и остаточный фрагмент «Fc», название которого отражает его способность к кристаллизации. Обработка пепсином позволяет получить фрагмент F(ab')<sub>2</sub>, содержащий два антигенсвязывающих сайта и по-прежнему способный к перекрестному связыванию антиген.

[0129] «Fv» представляет собой минимальный фрагмент антитела, содержащий полный антигенсвязывающий сайт. В одном варианте реализации двуцепочечная разновидность Fv состоит из димера одного переменного домена тяжелой цепи и одного переменного домена легкой цепи, соединенных жесткой ковалентной связью. В одноцепочечных разновидностях Fv (scFv) один переменный домен тяжелой цепи и один переменный домен легкой цепи могут быть ковалентно связаны гибким пептидным линкером таким образом, что легкая и тяжелая цепи могут образовывать «димерную» структуру, аналогичную структуре двуцепочечных разновидностей Fv. Именно в этой конфигурации три HVR каждого переменного домена взаимодействуют с образованием антигенсвязывающего домена на поверхности димера VH-VL. Совместно шесть HVR придают антителу специфичность связывания с антигеном. В то же время, даже одиночный переменный домен (или половина фрагмента Fv, включающая только три HVR, специфичных к антигену) обладает способностью распознавать и связывать антиген, хотя и с более низкой аффинностью по сравнению с полноразмерным сайтом связывания.

[0130] Fab-фрагмент содержит переменные домены тяжелой и легкой цепи, а также константный домен легкой цепи и первый константный домен (CH1) тяжелой цепи. Fab'-фрагменты отличаются от Fab-фрагментов по дополнительным нескольким остаткам на карбоксильном конце CH1-домена тяжелой цепи, включая один или более цистеинов из подвижной области антитела. Fab'-SH в данном документе представляет собой обозначение Fab', в котором остаток(ки) цистеина в константных доменах несет (ут) свободную тиольную группу. Фрагменты антител F(ab')<sub>2</sub> первоначально получали в виде пар фрагментов Fab', между которыми расположены шарнирные остатки цистеина. Кроме того, известны другие варианты химического соединения фрагментов антител.

[0131] «Одноцепочечные Fv-фрагменты» или «scFv»-фрагменты антитела содержат VH- и VL-домены антитела, причем эти домены находятся в одной полипептидной цепи. Как правило, полипептид scFv дополнительно содержит полипептидный линкер между VH- и VL-доменами, позволяющий scFv образовывать желательную структуру для связывания антигена. Обзор фрагментов scFv, см., например, в работе Pluckthün, *The*

*Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York, 1994), pp. 269-315.

[0132] Термин «диатела» относится к фрагментам антител, содержащим два антигенсвязывающих сайта, причем указанные фрагменты содержат переменный домен тяжелой цепи (VH), связанный с переменным доменом легкой цепи (VL) той же полипептидной цепи (VH-VL). За счет линкера, который является слишком коротким, чтобы обеспечить сопряжение между двумя доменами на одной и той же цепи, домены вынуждены соединяться с комплементарными доменами другой цепи и образовывать два антигенсвязывающих сайта. Диатела могут быть двухвалентными или биспецифическими. Диатела подробнее описаны в, например, EP 404,097; WO 1993/01161; Hudson et al., *Nat.Med.*9:129-134 (2003); and Hollinger et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 90:6444-6448 (1993). Триатела и тетраатела также описаны в публикации Hudson et al., *Nat.Med.*9:129-134 (2003).

[0133] Термин «моноклональное антитело» в настоящем документе относится к антителу, полученному из популяции практически однородных антител, например, отдельные антитела, составляющие популяцию, являются идентичными, за исключением возможных мутаций, например, естественных мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Таким образом, модификатор «моноклональное» указывает на то, что антитело не является смесью отдельных антител. В некоторых вариантах реализации такое моноклональное антитело обычно содержит антитело, содержащее полипептидную последовательность, связывающую мишень, причем указанную полипептидную последовательность, связывающую мишень, получают за счет способа, включающего выбор одной полипептидной последовательности, связывающей мишень, из множества полипептидных последовательностей. Например, процесс выбора может представлять собой выбор уникального клона из множества клонов, например, пула гибридных клонов, фаговых клонов или клонов рекомбинантных ДНК. Следует понимать, что выбранную последовательность, связывающую мишень, можно дополнительно модифицировать, например, с целью улучшения средства по отношению к мишени, гуманизации последовательности, связывающей мишень, улучшения ее продукции в культуре клеток, снижения ее иммуногенности *in vivo*, создания полиспецифического антитела и т.д., и что антитело, содержащее модифицированную последовательность, связывающую мишень, также является моноклональным антителом согласно настоящему изобретению. В отличие от препаратов поликлональных антител, которые обычно содержат различные антитела против различных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело из препарата моноклонального антитела направлено против одной детерминанты антигена. Кроме своей специфичности, преимуществом препаратов моноклональных антител заключается в том, что они как правило не контаминированы другими иммуноглобулинами.

[0134] Модификатор «моноклональное» указывает на свойство антитела, как на полученное из практически гомогенной популяции антител, и его не следует интерпретировать как требование относительно продуцирования антитела посредством какого-либо конкретного способа. Например, моноклональные антитела, которые предполагается применять в соответствии с настоящим изобретением, могут быть получены различными способами, включая, например, метод гибридом (например, Kohler and Milstein, *Nature*, 256:495-97 (1975); Hongo et al., *Hybridoma*, 14 (3):253-260 (1995), Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed.1988); Hammerling et al., в: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier,

N.Y.,1981)), способы рекомбинантных ДНК (см., например, патент США №4816567), технологии фаговых дисплеев (см. например, Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol.Biol.*222:581-597 (1992); Sidhu *et al.*, *J. Mol.Biol.*338(2):299-310 (2004); Lee *et al.*, *J. Mol.Biol.*340(5):1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 101(34): 12467-12472 (2004); и Lee *et al.*, *J. Immunol.Methods* 284(1-2):119-132 (2004), и технологии продуцирования антител человека или аналогов антител человека в организмах животных, которые частично или полностью содержат локусы или гены иммуноглобулинов человека, кодирующие последовательности иммуноглобулинов человека (см., например, WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits *et al.*, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 90:2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature* 362: 255-258 (1993); Bruggemann *et al.*, *Year in Immunol.*7:33 (1993 год); 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 Biotechnol.*14:845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnol.*14: 826 (1996); и Lonberg и Huszar, *Intern.Rev.Immunol.*13:65-93 (1995).

[0135] Моноклональные антитела в настоящем документе конкретно включают «химерные» антитела, в которых участок тяжелой и/или легкой цепи идентичен или гомологичен соответствующим последовательностям антител, полученных от конкретного вида или относящихся к конкретному классу или подклассу антител, тогда как остаток цепи (цепей) идентичен или гомологичен соответствующим последовательностям антител, полученным от другого вида или относящихся к другому классу или подклассу антител, а также фрагменты таких антител при условии, что они проявляют заданную биологическую активность (см., например, патент США №4816567; и Morrison *et al.*, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 81:6851-6855 (1984)). Химерные антитела включают PRIMATIZED<sup>®</sup> антитела, в которых антиген-связывающая область антитела происходит от антител, полученных, например, путем иммунизации макаков исследуемым антигеном.

[0136] «Гуманизированными» формами антител нечеловеческого происхождения (например, мышинных) являются химерные антитела, которые содержат минимальную последовательность, полученную из нечеловеческого иммуноглобулина. В одном варианте реализации гуманизированное антитело представляет собой иммуноглобулин человека (реципиентное антитело), в котором остатки из HVR реципиента заменяют остатками из HVR вида, не являющегося человеком (донорного антитела), например, мыши, крысы, кролика или примата, не являющегося человеком, обладающий желательной специфичностью, сродством и/или активностью. В некоторых случаях остатки FR иммуноглобулина человека заменяют соответствующими остатками нечеловеческого происхождения. Кроме того, гуманизированные антитела могут содержать остатки, отсутствующие в антителе реципиента или в антителе донора. Эти модификации можно внести для дальнейшего улучшения характеристик антитела. В общем, гуманизированное антитело будет содержать практически все из по меньшей мере одного, а обычно двух переменных доменов, в которых все или практически все гиперпеременные петли соответствуют таким участкам иммуноглобулина нечеловеческого происхождения, а все или практически все FR соответствуют таким участкам последовательности иммуноглобулина человека. Гуманизированное антитело также необязательно будет содержать, по меньшей мере, часть константной области (Fc) иммуноглобулина, как правило, константной области иммуноглобулина человека. Для дополнительных деталей, см., например, Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-329 (1988); и Presta, *Curr.Op.Struct.Biol.*2:593-596 (1992).

См. также, например, Vaswani and Hamilton, *Ann.Allergy, Asthma & Immunol.*1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurle and Gross, *Curr. Op. Biotech.*5:428-433 (1994); и патент США №№6982321 и 7087409.

[0137] «Антитело человека» представляет собой антитело, обладающее аминокислотной последовательностью, соответствующей последовательности антитела, продуцированного в организме человека и/или полученной с использованием любой методики получения антител человека, описанных в настоящем документе. Из этого определения антитела человека, в частности, исключено гуманизированное антитело, содержащее антигенсвязывающие остатки нечеловеческого происхождения. Антитела человека можно получить, используя различные методики, известные в данной области техники, включая библиотеки фагового дисплея. Hoogenboom and Winter, *J.Mol.Biol.*,227:381 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol.Biol.*,222:581 (1991). Также для получения моноклональных антител человека доступны способы, описанные в Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R.Liss, p.77 (1985); Boerner *et al.*, *J. Immunol.*,147(1):86-95 (1991). См. также van Dijk and van de Winkel, *Curr. Opin.Pharmacol.*,5:368-74 (2001). Антитела человека можно получить путем введения антигена трансгенному животному, которое было модифицировано с целью получения таких антител в ответ на антигенный стимул, и эндогенные локусы которого были заблокированы, как, например, у иммунизированных ксеномыши (см., например, патент США №№6075181 и 6150584 касательно технологии XENOMOUSE™). См. также, например, Li *et al.*, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 103:3557-3562 (2006 год) касательно антител человека, полученных с применением технологии В-клеточных гибридом человека.

[0138] «Видоспецифическое антитело» представляет собой антитело, которое обладает более сильной аффинностью связывания по отношению к антигену первого вида млекопитающих, чем по отношению к гомологичному антигену второго вида млекопитающих. Как правило, видоспецифическое антитело «специфически связывается» с антигеном человека (например, значение аффинности связывания (Kd) составляет не более чем около  $1 \times 10^{-7}$  М, предпочтительно не более чем около  $1 \times 10^{-8}$  М и предпочтительно не более чем около  $1 \times 10^{-9}$  М), но обладает аффинностью связывания по отношению к гомологичному антигену второго вида млекопитающих, отличных от человека, которая по меньшей мере около в 50 раз или по меньшей мере около в 500 раз или по меньшей мере около в 1000 раз ниже аффинности связывания по отношению к антигену человека. Видоспецифическое антитело может относиться к любым различным типам антител, которые приведены выше, но предпочтительно представляет собой гуманизированное или человеческое антитело.

[0139] Термин «гипервариабельный участок», «HVR» или «HV» в контексте настоящего описания относится к участкам вариабельного домена антитела, которые характеризуются гипервариабельностью последовательностей и/или образуют определенные структурой петли. Как правило, антитела содержат шесть HVR: три в VH (H1, H2, H3) и три в VL (L1, L2, L3). В нативных антителах H3 и L3 проявляют наибольшее многообразие из шести HVR, и, в частности, полагают, что H3 играет уникальную роль в обеспечении высокой специфичности антител. См., например, Xu *et al.*, *Immunity* 13:37-45 (2000); Johnson and Wu, в *Methods in Molecular Biology* 248:1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, N.J.,2003). Действительно, природные антитела верблюдовых, состоящие только из тяжелой цепи, являются функциональными и стабильными в отсутствии легкой цепи. См., например, Hamers-Casterman *et al.*, *Nature* 363:446-448 (1993); Sheriff *et al.*, *Nature Struct.Biol.*3:733-736 (1996).

[0140] В данном документе используется и охватывается ряд определений HVR.



Области, определяющие комплементарность, по Kabat (CDR) основаны на  
 5 вариабельности последовательностей и являются наиболее часто используемыми (Kabat  
*et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National  
 Institutes of Health, Bethesda, Md.(1991)). Напротив, Chothia обращает внимание на  
 10 локализацию структурных петель (Chothia and Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)).  
 Использование AbM HVR представляет собой компромисс между HVR Kabat и  
 структурными петлями Chothia, и они используются программным обеспечением Oxford  
 Molecular's для моделирования структуры антител. «Контактные» HVR основаны на  
 анализе доступных комплексных кристаллических структур. Остатки из каждого из  
 15 этих HVR указаны ниже.

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

[0141] Области HVR могут содержать «удлиненные HVR» следующим образом: 24-  
 20 36 или 24-34 (L1), 46-56 или 50-56 (L2) и 89-97 или 89-96 (L3) в VL, и 26-35 (H1), 50-65 или  
 49-65 (H2), и 93-102, 94-102 или 95-102 (H3) в VH. Для каждого из этих определений  
 остатки в вариабельных доменах нумеруются по Kabat et al., выше, для каждого из этих  
 определений.

[0142] «Каркасные» или «FR»-остатки представляют собой остатки вариабельного  
 25 домена, не являющиеся остатками HVR, согласно определению в настоящем документе.

[0143] Термин «нумерация остатков вариабельных доменов по Kabat» или «нумерация  
 положений аминокислот по Kabat» и их вариации, относятся к системе нумерации,  
 используемой для вариабельных доменов тяжелой цепи или вариабельных доменов  
 легкой цепи компиляции антител в Kabat et al., выше. С использованием этой системы  
 30 нумерации действительная линейная аминокислотная последовательность может  
 содержать меньшее количество аминокислот или дополнительные аминокислоты,  
 соответствующие укорочению FR или HVR вариабельного домена, или вставке в них.  
 Например, вариабельный домен тяжелой цепи может содержать в себе инсерцию одной  
 аминокислоты (остаток 52A согласно Kabat) после 52 остатка в H2 и вставленные  
 35 остатки (например, остатки 82A, 82b и 82c и т.д. согласно Kabat) после 82 остатка FR  
 тяжелой цепи. Нумерацию остатков по Kabat можно определять для данного антитела  
 посредством выравнивания в областях гомологии последовательности антитела со  
 «стандартной» пронумерованной по Kabat последовательностью.

[0144] Система нумерации по Kabat, как правило, используется, когда речь идет об  
 40 остатке в вариабельном домене (приблизительно остатки 1-107 легкой цепи и остатки  
 1-113 тяжелой цепи) (например, Kabat *et al., Sequences of Immunological Interest*. 5th Ed. Public  
 Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.(1991)). Как правило, «система  
 нумерации EU» или «индекс EU» используется, когда речь идет об остатке в константной  
 области тяжелой цепи иммуноглобулина (например, индекс EU, описанный в Kabat *et*  
 45 *al.*, выше). «Индекс EU по Kabat» относится к нумерации остатков антитела EU IgG1  
 человека.

[0145] Экспрессия «линейных антител» относится к антителам, описанным в Zapata  
 et al. (1995 *Protein Eng*, 8(10):1057-1062). Вкратце, эти антитела составляют пару

тандемных Fd-сегментов (VN-CH1-VN-CH1), которые вместе с комплементарными полипептидами легких цепей образуют пару антигенсвязывающих участков. Линейные антитела могут быть биспецифическими или моноспецифическими.

## II. Составы и получение на основе антитела

5 [0146] Настоящее изобретение в данном документе относится к стабильным водным составам, содержащим антитело. В некоторых вариантах реализации изобретения состав содержит моноклональное антитело, трегалозу и буфер, причем массовое соотношение моноклонального антитела и трегалозы в составе больше, чем или равно 0,41 и меньше, чем 1,65, и при этом состав имеет рН от около 5,5 до около 7,0. В  
10 некоторых вариантах реализации изобретения состав дополнительно содержит буфер (такой как, например, фосфат натрия или гистидин). В некоторых вариантах реализации изобретения состав содержит (а) моноклональное антитело в количестве от около 25 мг/мл до около 100 мг/мл; (b) трегалозу в количестве от около 45 до около 634 mM; и (с) фосфат натрия в количестве большем, чем 35 mM до около 100 mM, причем указанный  
15 состав имеет рН от около 5,5 до около 7,0, и при этом массовое соотношение указанного моноклонального антитела и указанной трегалозы в составе больше, чем или равно 0,41 и меньше, чем 1,65. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело в составе является стабильным при -20°C в течение по меньшей мере около 6 меньшей мере около 12 месяцев или по меньшей мере около 18 месяцев. В некоторых вариантах  
20 реализации изобретения трегалоза может замещаться на полиол, отличный от трегалозы. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело связывает VEGF.

### А. Получение антител

[0147] Антитела, входящие в состав композиции, получают обычными методами, которые используются в данной области и типичные примеры которых подробно  
25 описаны в последующих разделах.

[0148] Антитело направлено против представляющего интерес антигена. Предпочтительно антиген представляет собой полипептид, выполняющий важную биологическую функцию, а введение антитела млекопитающему, у которого наблюдается нарушение может оказать положительное терапевтическое воздействие на это  
30 млекопитающее. Однако предусмотрены также антитела, направленные против антигенов неполипептидной природы.

[0149] Если в качестве антигена выступает полипептид, он может представлять собой трансмембранную молекулу (например, рецептор) или лиганд, как, например, фактор роста. Типичные антигены включают молекулы, такие как фактор роста эндотелия  
35 сосудов (VEGF); CD20; ox-LDL; ox-ApoB100; ренин; гормон роста, включая человеческий гормон роста и бычий гормон роста; фактор высвобождения гормона роста; паратиреоидный гормон; тиреотропный гормон; липопротеины; альфа-1-антитрипсин; А-цепь инсулина; В-цепь инсулина; проинсулин; фолликулостимулирующий гормон; кальцитонин; лютеинизирующий гормон; глюкагон; факторы свертывания крови, такие как фактор VIIIC, фактор IX, тканевой фактор (TF) и фактор фон Виллебранда;  
40 антикоагулянты, такие как протеин С; предсердный натрийуретический фактор; легочный сурфактант; активатор плазминогена, такой как урокиназа или мочевого, или тканевой активатор плазминогена (t-PA); бомбезин; тромбин; гемопоэтический фактор роста; фактор некроза опухоли-альфа и -бета; энкефалиназа; RANTES (хемокин, выделяемый Т-клетками при активации); человеческий макрофагальный воспалительный белок (MIP-1-альфа); сывороточный альбумин, такой как человеческий сывороточный альбумин; мюллерова ингибирующая субстанция; А-цепь релаксина; В-цепь релаксина; прорелаксин; мышинный гонадотропин-ассоциированный пептид; микробный белок,

такой как бета-лактамаза; ДНКаза; IgE; антиген цитотоксических Т лимфоцитов (CTLA), такой как CTLA-4; ингибин; активин; рецепторы для гормонов или факторов роста; белок А или D; ревматоидные факторы; нейротрофический фактор, такой как костный нейротрофический фактор (BDNF), нейротропин-3, -4, -5 или -6 (NT-3, NT-4, NT-5 или NT- или фактор роста нервов, такой как NGF- $\beta$ ; фактор роста, полученный из тромбоцитов (PDGF); фактор роста фибробластов, такой как AFGF и bFGF; эпидермальный фактор роста (EGF); трансформирующий фактор роста (TGF), такой как TGF-альфа и TGF-бета, включая TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3, TGF- $\beta$ 4 или TGF- $\beta$ 5; инсулиноподобный фактор роста-I и -II (IGF-I и ИФР-II); des (1-3)-IGF-I (мозговой IGF-I), белки, связывающий инсулиноподобный фактор роста; CD протеины, такие как CD3, CD4, CD8, CD19, и CD20; эритропоэтин; остеоиндуктивные факторы; иммунотоксины; костный морфогенетический белок (BMP); интерферон, такой как интерферон альфа, бета и гамма; колониестимулирующие факторы (CSF), такие как M-CSF, GM-CSF и G-CSF; интерлейкины (ILS), например, M-CSF, GM-CSF и G-CSF); интерлейкины (IL), например, IL-1 до IL-10; супероксиддисмутаза; Т-клеточные рецепторы; поверхностные мембранные белки; стимулятор гомотиза; вирусный антиген, такой, как, например, участок оболочки ВИЧ; транспортные белки; хоминг-рецепторы; адрессины, регуляторные белки; интегрины, такие как CD11a, CD11b, CD11c, CD18, ICAM, VLA-4 и VCAM; опухолеассоциированный антиген, такой как рецептор HER2, HER3 или HER4; и фрагменты любого из вышеперечисленных полипептидов.

[0150] В определенных вариантах реализации изобретения молекулярные мишени для антител, охваченных рамками настоящего изобретения, включают VEGF и CD20. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело, описанное в данном документе, представляет собой антитело, которое связывается с VEGF человека. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело, описанное в данном документе, представляет собой антитело, которое связывается с CD20 человека.

#### (i) Получение антигенов

[0151] Растворимые антигены или их фрагменты, опционально конъюгированные с другими молекулами, могут быть использованы в качестве иммуногенов для получения антител. В случае трансмембранных молекул, таких как рецепторы, в качестве иммуногена могут быть использованы их фрагменты (например, внеклеточный домен рецептора). В альтернативном варианте в качестве иммуногена могут быть использованы клетки, экспрессирующие трансмембранную молекулу. Такие клетки могут быть получены из природного источника (например, клеточные линии злокачественной опухоли) или клетки, которые были трансформированы с помощью рекомбинационных методов для экспрессии трансмембранной молекулы. Другие антигены и их формы, пригодные к использованию для получения антител, будут понятны специалистам в данной области техники.

#### (ii) Определенные способы на основе использования антител

[0152] Поликлональные антитела предпочтительно продуцируются у животных посредством многократных подкожных (sc) или внутрибрюшинных (ip) инъекций соответствующего антигена и адъюванта. Возможно, было бы полезно конъюгировать соответствующий антиген с белком, который является иммуногенным для вида, которому проводят иммунизацию, например, гемоцианин фиссуреллы, сывороточный альбумин, с использованием бифункционального или дериватизирующего средства, например, малеимидобензоилсульфосукцинимидного сложного эфира (конъюгация через цистеиновые остатки), N-гидроксисукцинимид (через лизиновые остатки), глутаральдегида, янтарного ангидрида,  $\text{SOCl}_2$  или  $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ , где R и  $\text{R}^1$  представляют

собой разные алкильные группы.

[0153] Животных иммунизируют против антигена, иммуногенных конъюгатов или производных путем комбинации, например, 100 мкг или 5 мкг белка или конъюгата (в случае кроликов или мышей, соответственно) с использованием 3 объемов полного адьюванта Фрейнда и инъекции раствора внутривенно в различные участки тела. Через один месяц проводили бустер-иммунизацию животных пептидом или конъюгатом в полном адьюванте Фрейнда в количестве от 1/5 до 1/10 от исходного количества путем подкожных инъекций одновременно в различные участки тела. Через 7-14 суток у животных берут кровь и в сыворотке оценивают титр антител. Животным проводят бустер-иммунизацию до выхода титра на плато. Предпочтительно животным проводят бустер-иммунизацию конъюгатам того же антигена, но конъюгированного с другим белком или через другой перекрестносвязывающий реагент. Конъюгаты также могут быть получены в культуре рекомбинантных клеток в виде слитых белков. Кроме того, для усиления иммунного ответа целесообразно использовать адьюванты, такие как квасцы.

[0154] Моноклональные антитела по настоящему изобретению могут быть получены методом гибридом, впервые описанным Kohler *et al.*, *Nature*, 256:495 (1975), а затем описанным, например, в Hongo *et al.*, *Hybridoma*, 14 (3):253-260 (1995), Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed.1988); Hammerling *et al.*, в: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y.,1981) и Ni, *Xiandai Mianyixue*, 26(4):265-268 (2006), что касается гибридом типа «человек-человек». Дополнительные способы включают способы, описанные, например, в патенте США №7189826, что касается получения естественных моноклональных антител IgM человека из гибридомных клеточных линий. Гибридная технология с использованием клеток человека (триомная технология) также описана в Vollmers and Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005) и Vollmers and Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185-91 (2005).

[0155] В отношении различных других методов получения гибридом, см., например, US 2006/258841; US 2006/183887 (полностью человеческие антитела), US 2006/059575; US 2005/287149; US 2005/100546; US 2005/026229; и патенты США №№7078492 и 7153507. Иллюстративный протокол для получения моноклональных антител с использованием метода получения гибридом описан, как указано далее. В одном варианте реализации изобретения мышь или другое соответствующее животное-хозяин, как, например, хомячка иммунизируют с целью активации лимфоцитов, которые продуцируют или способны продуцировать антитела, что будут специфически связываться с белком, использованным для иммунизации. Антитела вырабатываются у животных в результате многократных подкожных (sc) или внутривенных (iv) инъекций полипептида по настоящему изобретению или его фрагмента и адьюванта, как, например, монофосфорилилипида А (MPL)/дикриномиколята трегалозы (TDM) (Ribi Immunochem. Research, Inc. Hamilton, Mont.). Полипептид по настоящему изобретению (например, антиген) или его фрагмент могут быть получены с использованием способов, хорошо известных в данной области, как, например, рекомбинационных способов, некоторые из которых дополнительно описаны в данном документе. В сыворотке крови иммунизированных животных определяют антитела к антигену и опционально проводят бустер-иммунизацию. Выделяют лимфоциты животных, продуцирующих антитела к антигену. В альтернативном варианте лимфоциты могут подвергаться *in vitro* иммунизации.

[0156] Затем производят слияние лимфоцитов с миеломными клетками с

использованием подходящего средства, обеспечивающего слияние клеток, как, например, полиэтиленгликоль с получением гибридной клетки. См., например, Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986). Можно использовать миеломные клетки, которые характеризуются высокой эффективностью слияния, поддерживают высокий уровень продукции антител выбранными антителопродуцирующими клетками и чувствительны к среде, такой как среда НАТ. Типичные клетки миеломы включают, в том числе, линии миеломных клеток миеломы, как, например, полученные из опухолей мыши МОРС-21 и МРС-11, которые имеются в Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif. USA, и клетки SP-2 или X63-Ag8-653, которые имеются в Американской коллекции типовых культур, Rockville, Md. USA. Также описаны линии клеток миеломы человека и гетеромиеломы мыши-человека, которые продуцируют моноклональные антитела человека. (Kozbor, *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp.51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

[0157] Клетки гибридомы, полученные таким способом, высевает и выращивают в подходящей культуральной среде, например, среде, что содержит один или более веществ, которые ингибируют рост и выживаемость неслитых, исходных клеток миеломы. Например, если в исходных клетках миеломы отсутствует фермент гипоксантингуанинфосфорибозилтрансфераза (ГГФРТ или ГФРТ), культуральная среда для гибридом обычно будет содержать гипоксантин, аминоптерин и тимидин (среда НАТ), причем эти вещества препятствуют росту клеток с дефицитом ГГФРТ. Предпочтительно используют способы культивирования гибридных клеток в бессывороточной среде для уменьшения применения сыворотки животного происхождения, такой как эмбриональная телячья сыворотка, как описано, например, в Even *et al.*, *Trends in Biotechnology*, 24(3), 105-108 (2006).

[0158] Олигопептиды в качестве средств для повышения продуктивности гибридных клеточных культур описаны в Franek, *Trends in Monoclonal Antibody Research*, 111-122 (2005). Конкретно, стандартные культуральные среды обогащают определенными аминокислотами (аланином, серином, аспарагином, пролином) или фракциями белкового гидролизата, причем апоптоз можно значительно подавлять с помощью синтетических олигопептидов, состоящих из от трех до шести аминокислотных остатков. Пептиды присутствуют в миллимолярных или более высоких концентрациях.

[0159] Культуральную среду, в которой выращивают гибридные клетки, оценивают на продукцию моноклональных антител, которые связываются с антителом по настоящему изобретению. Специфичность связывания моноклональных антител, продуцируемых гибридными клетками, можно определить посредством иммунопреципитации или анализа связывания *in vitro*, как, например, радиоиммунного анализа (РИА) или твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Аффинность связывания моноклонального антитела можно определять, например, посредством анализа Скэтчарда. См., например, Munson *et al.*, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

[0160] После идентификации гибридных клеток, которые продуцируют антитела с требуемой специфичностью, аффинностью и/или активностью, клоны можно субклонировать методами предельных разведений и выращивать стандартными способами. См., например, Goding, выше. Пригодные для этой цели культуральные среды включают, например, среду D-МЕМ или RPMI-1640. Кроме того, гибридные клетки можно выращивать *in vivo* у животных в качестве асцитных опухолей. Моноклональные антитела, секретируемые субклонами, подходящим способом выделяют из культуральной среды, асцитной жидкости или сыворотки с помощью

общепринятых способов очистки иммуноглобулинов, например, таких как хроматография с белком А-сефарозой, хроматография с гидроксилатапитом, гель-электрофорез, диализ или аффинная хроматография. Один из способов выделения белков из гибридомных клеток описан в US 2005/176122 и США № 6919436. Способ

5 включает применение растворов с минимальными концентрациями солей, таких как лиотропные соли, в процессе связывания, а также предпочтительно применение небольших количеств органических растворителей в процессе элюирования.

(iii) Определенные способы скрининга библиотек

[0161] Антитела по настоящему изобретению можно получать с использованием

10 комбинаторных библиотек для скрининга антител с требуемой активностью или видами активности. Например, в данной области известны различные способы получения библиотек фагового дисплея и скрининг таких библиотек на предмет антител, обладающих желательными характеристиками связывания. Такие способы описаны, главным образом, в Hoogenboom et al. в *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, N.J., 2001). Например, один способ получения

15 представляющих интерес антител заключается в использовании фаговой библиотеки антител, как описано в Lee et al., *J. Mol. Biol.* (2004), 340(5):1073-93.

[0162] По существу, клоны синтетических антител подвергают селекции посредством скрининга библиотек фагового дисплея, которые содержат фаг, что экспонирует

20 различные фрагменты варибельной области (Fv) антитела, слитые с белком оболочки фага. Такие фаговые библиотеки отбирают с помощью аффинной хроматографии против требуемого антигена. Клоны, продуцирующие Fv-фрагменты, способные связываться с необходимым антигеном, адсорбируются на антигене и, таким образом, их отделяют от несвязывающихся клонов в библиотеке. Затем связывающиеся клоны

25 элюируют с антигена, и их могут быть далее обогащены посредством дополнительных циклов адсорбции/элюирования антигена. Любые из антител по настоящему изобретению могут быть получены путем разработки пригодного способа скрининга с помощью антигена для селекции представляющего интерес клон фага с последующим конструированием клон полноразмерного антитела с использованием

30 последовательностей Fv из представляющего интерес фагового клон и пригодных последовательностей константной области (Fc), описанных в Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda Md. (1991), vols. 1-3.

[0163] В определенных вариантах реализации изобретения антигенсвязывающий

35 домен антитела образован из двух варибельных (V) областей, состоящих приблизительно из 110 аминокислот, по одной из легкой (VL) и тяжелой (VH) цепей, в обеих из которых присутствуют три гиперварибельные петли (HVR) или определяющие комплементарность области (CDR). Варибельные домены можно функционально экспонировать на фаге - как в виде одноцепочечных Fv-фрагментов (scFv), где VH и

40 VL связаны ковалентно посредством короткого гибкого пептида, так и в виде Fab-фрагментов, где каждый из них слит с константным доменом, и они взаимодействуют нековалентно, как описано в работе Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12:433-455 (1994). В настоящем документе фаговые клоны, кодирующие scFv, и фаговые клоны, кодирующие Fab, в совокупности называют «фаговыми клонами Fv» или «клонами Fv».

[0164] Репертуары генов VH и VL можно по отдельности клонировать путем

45 полимеразной цепной реакции (PCR) и случайным образом рекомбинировать в фаговых библиотеках, в которых затем можно осуществлять поиск антигенсвязывающих клонов, как описано в работе Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12:433-455 (1994). Библиотеки из

иммунизированных источников позволяют получить высокоаффинные антитела к иммуногену без необходимости конструирования гибридом. В альтернативном варианте, можно клонировать наивный репертуар для обеспечения одного источника антител человека к широкому диапазону несобственных, а также собственных антигенов без иммунизации, как описано Griffiths *et al.*, *EMBO J*, 12:725-734 (1993). Наконец, наивные библиотеки можно также получить путем синтеза, клонируя сегменты V-генов стволовых клеток, не подвергавшиеся реаранжировке, и используя ПЦР-праймеры, содержащие случайные последовательности, для кодирования гипервариабельной области CDR3 и осуществления реаранжировки *in vitro*, как описано в Hoogenboom and Winter, *J.Mol.Biol.*, 227:381-388 (1992).

[0165] В определенных вариантах реализации изобретения используют нитевидный фаг для экспонирования фрагментов антител путем слияния с минорным белком оболочки рIII. Фрагменты антител могут быть экспонированы в виде одноцепочечных Fv-фрагментов, в которых VH- и VL-домены связаны на одной полипептидной цепи гибким полипептидным спейсером, например, как описано Marks *et al.*, *J. Mol.Biol.*, 222: 581-597 (1991), или в качестве Fab-фрагментов, в которых одна цепь слиты с рIII, а другая секретируется в периплазму бактериальной клетки-хозяина, где собирается структура Fab-белок оболочки, которая экспонируется на поверхности фага путем вытеснения некоторых из белков оболочки дикого типа, например, как описано в *Nucl.Acids Res.*, 19:4133-4137 (1991).

[0166] Как правило, нуклеиновые кислоты, кодирующие фрагменты генов антител, выделенных из организма человека или животных. Если необходимо получить библиотеку с соотношением, смещенным в сторону клонов, специфичных к данному антигену, субъекта иммунизируют антигеном для вызова гуморального иммунного ответа, и выделяют клетки селезенки и/или циркулирующие В-клетки, и другие лимфоциты периферической крови человека (PBL) для конструирования библиотеки. В одном варианте реализации изобретения получают библиотеку фрагментов генов антител человека с соотношением, смещенным в сторону клонов, специфичных к антигену, путем вызова гуморального иммунного ответа против антигена у трансгенных мышей, несущих набор функциональных генов иммуноглобулинов человека (и лишенных функциональной эндогенной системы продукции антител), так что иммунизация антигеном приводит к образованию В-клеток, продуцирующих антитела человека к антигену. Получение антителопродуцирующих трансгенных мышей описано ниже.

[0167] Дополнительного обогащения популяций клеток, реактивных против антигена, можно достичь с использованием подходящего метода скрининга для выделения В-клеток, экспрессирующих антигенспецифическое мембраносвязанное антитело, например, путем разделения клеток с использованием аффинной хроматографии с антигеном или адсорбции клеток на меченный флуорохромом антиген с последующей активированной флуоресценцией сортировкой клеток (FACS).

[0168] В альтернативном варианте, применение клеток селезенки и/или В-клеток или других PBL от неиммунизированного донора обеспечивает лучшее представление возможного репертуара антител, а также позволяет конструирование библиотеки антител с использованием любого вида животных (человека или не относящегося к человеку), для которого данный антиген не является антигенным. Для библиотек, включающих конструирование генов антител *in vitro*, собирают стволовые клетки субъекта для получения нуклеиновых кислот, кодирующих неаранжированные сегменты генов антител. Представляющие интерес иммунные клетки можно получать у различных видов животных, таких как человек, мышь, крыса, видов зайцеобразных, волчьих,

собачьих, кошачьих, свиней, крупного рогатого скота, лошадей и птиц и т.д.

[0169] Нуклеиновую кислоту, кодирующую сегменты генов вариабельных областей антитела (включая VH- и VL-сегменты), выделяют из представляющих интерес клеток и амплифицируют. В случае использования библиотек реаранжированных генов VH и VL, 5 необходимая ДНК может быть получена путем выделения геномной ДНК или мРНК из лимфоцитов с последующим проведением полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием праймеров, соответствующих 5'- и 3'-концам реаранжированных генов VH и VL, как описано в публикации *Proc.Natl.Acad.Sci.(USA)*, 86:3833-3837 (1989), тем самым получая разнообразные репертуары V-генов для экспрессии. V-гены можно амплифицировать с кДНК и геномной ДНК с помощью обратных праймеров на 5'-конце экзона, кодирующего зрелый V-домен, и прямых праймеров, располагающихся в J-сегменте, как описано в публикации *Orlandi et al.* (1989) и в *Ward et al., Nature*, 341: 544-546 (1989). Однако для амплификации с кДНК обратные праймеры также могут располагаться в лидерном экзоне, как описано в публикации *Jones et al., Biotechnol.*, 9: 88-89 (1991), а прямые праймеры могут располагаться в константной области, как описано в публикации *Sastry et al., Proc.Natl.Acad.Sci.(USA)*, 86:5728-5732 (1989). Для увеличения расширения спектра комплементарных последовательностей могут быть использованы вырожденные праймеры, аналогичные описанным в публикации *Orlandi et al.* (1989) или *Sastry et al.* (1989). В определенных вариантах реализации изобретения разнообразие библиотек максимально увеличивают с использованием ПЦР-праймеров, нацеленных на каждое семейство V-генов, для амплификации всех существующих вариантов комбинаций генов VH и VL, имеющихся в образце нуклеиновой кислоты иммунных клеток, например, как описано в способе *Marks et al. J. Mol.Biol.*, 222:581-597 (1991) или как описано в способе *Orum et al., Nucleic Acids Res.*, 21:4491-4498 (1993). Для клонирования амплифицированной ДНК в экспрессирующие векторы в ПЦР-праймер можно вносить редкие участки рестрикции в качестве метки на одном конце, как описано в *Orlandi et al.* (1989), путем дальнейшей ПЦР-амплификации с использованием содержащего тег праймера, как описано в *Clackson et al., Nature*, 352:624-628 (1991).

[0170] Репертуары подвергнутых синтетической реаранжировке V-генов можно получать *in vitro* из сегментов V-генов. Большинство из сегментов VH-генов человека были клонированы и секвенированы (как сообщалось в публикации *Tomlinson et al., J. Mol.Biol.*, 227:776-798 (1992)), а также картированы (как сообщалось в публикации *Matsuda et al., Nature Genet.*, 3:88-94 (1993)); эти клонированные сегменты (включая все основные конформации петель H1 и H2) могут быть использованы для получения различных репертуаров генов VH с использованием ПЦР-праймеров, кодирующих петли H3, с различными последовательностями и длиной, как описано в публикации *Hoogenboom and Winter, J. Mol.Biol.*, 227:381-388 (1992). Могут быть также получены репертуары VH, характеризующиеся разнообразием последовательностей, которое всецело сосредоточено в длинной петле H3 одной длины, как описано в публикации *Barbas Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 89:4457-4461 (1992). Были клонированы и секвенированы человеческие сегменты V $\kappa$  и V $\lambda$  (как сообщалось в публикации *Williams and Winter, Eur.J. Immunol.*, 23:1456-1461 (1993)) и такие сегменты могут быть использованы для получения репертуаров синтетических легких цепей. Репертуары синтетических V-генов на основе ряда укладок VH и VL и длин L3 и H3 кодируют антитела со значительным структурным разнообразием. После амплификации молекул ДНК, кодирующих сегменты V-генов, сегменты V-генов зародышевой линии могут быть реаранжированы *in vitro* методами, описанными в публикации *Hoogenboom and Winter, J. Mol.Biol.*, 227:381-388 (1992).

[0171] Репертуары фрагментов антител могут быть сконструированы путем



объединения репертуаров VH- и VL-генов несколькими способами. Каждый репертуар можно создавать в разных векторах, и данные векторы могут быть подвергнуты рекомбинации *in vitro*, например, как описано в Hogrefe *et al.*, *Gene*, 128:119-126 (1993), или *in vivo* путем комбинаторного инфицирования, например, системой loxP, описанной в публикации Waterhouse *et al.*, *Nucl.Acids Res.*, 21:2265-2266 (1993). В подходе рекомбинации *in vivo* используется двухцепочечная структура Fab-фрагментов для преодоления ограничения размера библиотеки, определяемого эффективностью трансформации *E. coli*. Наивные репертуары VH и VL клонируют по отдельности, один в фагмиду, а другой в фаговый вектор. Затем две библиотеки объединяют путем инфицирования бактерии, содержащей фагмиду, фагом, так, чтобы каждая клетка содержала различные комбинации, а размер библиотеки был ограничен только числом присутствующих клеток (около  $10^{12}$  клонов). Оба вектора содержат рекомбинационные сигналы *in vivo*, в силу чего обеспечивается рекомбинация генов VH и VL в один репликон и совместная упаковка в фаговые вирионы. Эти огромные библиотеки обеспечивают большое число разнообразных антител с хорошей аффинностью ( $K_d^{-1}$  около  $10^{-8}$  М).

[0172] В альтернативном варианте, эти репертуары могут быть клонированы в один и тот же вектор последовательно, например, как описано в работе Barbas *et al.*, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 88:7978-7982 (1991), или собраны вместе с использованием ПЦР и затем клонированы, например, как описано в работе Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991). ПЦР-сборку также можно использовать для соединения ДНК VH и VL с ДНК, кодирующей гибкий пептидный спейсер для формирования репертуаров одноцепочечных Fv (scFv). В еще одной методике «ПЦР-сборка в клетке» используется для объединения генов VH и VL в пределах лимфоцитов посредством ПЦР и последующего клонирования репертуаров сцепленных генов, как описано в работе Embleton *et al.*, *Nucl.Acids Res.*, 20:3831-3837 (1992).

[0173] Антитела, полученные с помощью наивных библиотек (естественных или синтетических), могут иметь умеренную аффинность ( $K_d^{-1}$  около от  $10^6$  до  $10^7$  М<sup>-1</sup>), но созревание аффинности также можно имитировать *in vitro* посредством конструкции и повторного отбора из вторичных библиотек, как описано в работе Winter *et al.* (1994), выше. Например, могут быть введены мутации случайным образом *in vitro*, используя полимеразу пониженной точности (согласно сообщениям в работе Leung *et al.*, *Technique* 1:11-15 (1989)) или в способе Hawkins *et al.*, *J. Mol.Biol.*, 226:889-896 (1992) или в способе Gram *et al.*, *Proc.Natl.Acad.Sci USA*, 89:3576-3580 (1992). Кроме того, созревания аффинности можно достигнуть посредством внесения случайных мутаций в один или несколько CDR, например, с использованием ПЦР с праймерами, несущими случайную последовательность, перекрывающую представляющий интерес CDR, в отобранных отдельных клонах Fv, и скрининга клонов с более высокой аффинностью. В WO 9607754 (дата публикации 14 марта 1996 года) описан способ индукции мутагенеза в определяющая комплементарность области легкой цепи иммуноглобулина для того, чтобы создать библиотеку генов легкой цепи. Другой эффективный подход заключается в рекомбинации доменов VH или VL, отобранных с помощью фагового дисплея с использованием репертуаров природных вариантов V-домена, полученных у иммунизированных доноров, и проведении скрининга в отношении более высокой аффинности в нескольких циклах перетасовки цепей, как описано в работе Marks *et al.*, *Biotechnol.*, 10:779-783 (1992). Этот метод делает возможным продукцию антител с

аффинностями около  $10^{-9}$  М или менее.

[0174] Скрининг библиотек может быть выполнен с помощью различных способов, известных в данной области. Например, антиген можно использовать для покрытия лунок адсорбционных планшетов, экспрессировать в клетках-хозяевах, закрепленных на адсорбционных планшетах, или использовать в сортировке клеток, или конъюгировать с биотином для захвата с использованием покрытых стрептавидином микрогранул, или использовать в любом другом способе отбора библиотек фагового дисплея.

[0175] Образцы фаговых библиотек приводят в контакт с иммобилизированным антигеном в условиях, подходящих для связывания по меньшей мере части фаговых частиц с данным адсорбентом. Обычно, данные условия, включая рН, ионную силу, температуру и тому подобное, подбирают с целью имитации физиологических условий. Фаги, связавшиеся с твердой подложкой, отмывают, а затем элюируют с помощью кислоты, например, как описано в работе Barbas *et al.*, *Proc.Natl.Acad.Sci USA*, 88:7978-7982 (1991), или щелочью, например, как описано в работе Marks *et al.*, *J. Mol.Biol.*, 222: 581-597 (1991), или в результате антигенной конкуренции, например, в методе, похожем на метод антигенной конкуренции по Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991). Фаги могут быть обогащены в 20-1000 раз в одном цикле селекции. Более того, обогащенные фаги можно выращивать в бактериальной культуре и подвергать дополнительным циклам селекции.

[0176] Эффективность отбора зависит от многих факторов, включая кинетику диссоциации во время отмывки, и вероятности того, могут ли многочисленные фрагменты антител на одном фаге одновременно взаимодействовать антигеном. Удержание антител с быстрой кинетикой диссоциации (и низкой аффинностью связывания) может достигаться посредством применения коротких отмывок, мультивалентного фагового дисплея и высокой плотности покрытия антигена на твердой фазе. Высокая плотность не только стабилизирует фаг вследствие мультивалентных взаимодействий, но и благоприятствует повторному связыванию диссоциированного фага. Отбору антител с медленной кинетикой диссоциации (и хорошей аффинностью связывания) может способствовать применение длительных промывок и моновалентного фагового дисплея, как описано в работе Bass *et al.*, *Proteins*, 8:309-314 (1990) и в WO 92/09690, низкая плотность покрытия антигеном, как описано в работе Marks *et al.*, *Biotechnol.*, 10:779-783 (1992).

[0177] Существует возможность осуществления отбора среди фаговых антител, даже незначительно различающихся по аффинности к данному антигену. Однако случайная мутация в отобранном антителе (например, осуществляемая в некоторых методах созревания аффинности) скорее всего приведет к образованию множества мутантных форм, большинство из которых будет связываться с антигеном, но только некоторые - с более высокой аффинностью. При проведении конкурентного связывания в присутствии ограниченного количества антигена связываться будут преимущественно фаги обладающие высокой аффинностью. Для удержания всех мутантных форм с наиболее высокой аффинностью фаги можно инкубировать с избытком биотинилированного антигена, но с биотинилированным антигеном в концентрации с более низкой молярностью, чем целевая молярная константа аффинности к данному антигену. Фаги с высокой аффинностью связывания затем могут быть захвачены на парамагнитные бусины со стрептавидиновым покрытием. Такой «равновесный захват» позволяет провести отбор антител в соответствии с их аффинностью связывания с чувствительностью, которая обеспечивает выделение мутантных клонов с аффинностью

всего в два раза более высокой из большого избытка фагов с более низкой аффинностью. Для селекции отбора фаговых клонов на основе кинетики диссоциации можно также изменять условия отмывки фагов, связанных с твердой фазой.

[0178] Специфичные данному антигену клоны могут быть отобраны на основе активности. В определенных вариантах реализации настоящее изобретения относится к специфичным к данному антигену антителам, которые связываются с живыми клетками, что естественным образом экспрессируют антиген, или связываются с растворимым антигеном, или антигеном, прикрепленным к другим клеточным структурам. Клоны Fv, соответствующие таким анти-антиген антителам, могут быть отобраны посредством (1) выделения клонов анти-антигена из фаговой библиотеки, как описано выше, и, не обязательно, увеличивая данную выделенную популяцию фаговых клонов в результате выращивания данной популяции в подходящей бактериальном хозяине; (2) отбора антигена и второго белка, против которых требуется блокирующая и неблокирующая активность, соответственно; (3) адсорбции данных анти-антигенных фаговых клонов на иммобилизованном антигене; (4) использования избытка второго белка для элюирования любых нежелательных клонов, которые распознают антигенсвязывающие детерминанты, перекрывающиеся или разделяемые с детерминантами связывания данного второго белка; и (5) элюирования клонов, которые сохраняются абсорбированными после этапа (4). Опционально, клоны с требуемыми блокирующими/неблокирующими свойствами могут быть дополнительно обогащены посредством повторения методик отбора, описанных в данном документе, один или несколько раз.

[0179] ДНК, кодирующую моноклональные антитела, полученные с помощью гибридомы, или Fv-клоны фагового дисплея по данному изобретению, легко изолировать и секвенировать с использованием стандартных процедур (например, используя олигонуклеотидные праймеры, сконструированные для специфической амплификации представляющих интерес кодирующих областей тяжелой и легкой цепи из гибридомной или фаговой ДНК-матрицы). После выделения ДНК может быть помещена в экспрессирующие векторы, которые затем трансфецируют в клетки-хозяева, такие как клетки *E. coli*, клетки COS обезьяны, клетки яичника китайского хомячка (СНО) или клетки миеломы, которые в противном случае не продуцируют белок-иммуноглобулин, для достижения синтеза требуемых 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 (1993) и Pluckthun, *Immunol.Revs.* 130:151 (1992).

[0180] ДНК, кодирующая клоны Fv по настоящему изобретению, может быть объединена с известными последовательностями ДНК, кодирующими константные области тяжелой цепи и/или легкой цепи (например, соответствующие последовательности ДНК могут быть получены из Kabat *et al.*, выше), для создания клонов, кодирующих тяжелую и/или легкую цепь полной или неполной длины. Следует иметь в виду, что с этой целью можно использовать константные области любого изотипа, включая константные области IgG, IgM, IgA, IgD и IgE, и что такие константные области могут быть получены у любых видов животных или человека. Клон Fv, полученный из ДНК варибельного домена одного вида животного (например, человека), и затем слитый с ДНК константной области другого вида животного, с образованием кодирующей(их) последовательности(ей) «гибридной» полноразмерной тяжелой цепи и/или легкой цепи, охвачен используемым в настоящем документе определением «химерное» и «гибридное» антитело. В определенных вариантах

реализации изобретения клон Fv, полученный из ДНК варибельной области иммуноглобулина человека, слит с ДНК константной области иммуноглобулина человека с образованием кодирующей(их) последовательности(ей) для тяжелой и/или легкой цепей человека полной или неполной длины.

- 5 [0181] ДНК, кодирующая антитело к антигену, полученная из гибридомы по настоящему изобретению, может быть также модифицирована, например, путем замены кодирующей последовательности константных доменов тяжелой и легкой цепей человеческого антитела на гомологичные последовательности антитела мыши, полученные из гибридного клона (например, как в способе Morrison *et al.*,  
10 *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 81:6851-6855 (1984)). ДНК, кодирующая полученное из гибридного или Fv-клона антитело или его фрагмент, может быть дополнительно модифицирована путем ковалентного присоединения к кодирующей последовательности иммуноглобулина всей кодирующей последовательности полипептида неиммуноглобулиновой природы, или ее части. Таким способом получают «химерные»  
15 или «гибридные» антитела, которые обладают специфичностью связывания антител по настоящему изобретению, полученных из Fv-клона или гибридного клона.

(iv) Гуманизированные и человеческие антитела

- [0182] В данной области хорошо известны способы гуманизации антител, отличных от человеческих. Например, гуманизированное антитело содержит один или более  
20 аминокислотных остатков, введенных в него из организма другого вида животных, помимо человека. Эти аминокислотные остатки, не относящиеся к аминокислотным остаткам человека, часто называют «вносимыми» остатками, которые обычно берутся из «вносимого» варибельного домена. По существу, гуманизация может быть осуществлена методом Винтера (Winter) и сотрудников (Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525  
25 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeyen *et al.*, *Science*, 239:1534-1536 (1988)), путем замещения CDR грызунов или последовательностей CDR на соответствующие последовательности антитела человека. Таким образом, такие «гуманизированные» антитела представляют собой химерные антитела (патент США № 4816567), в которых участок последовательности, значительно короче интактного  
30 варибельного домена человеческого антитела замещен соответствующей последовательностью антитела другого вида животных. Фактически, гуманизированные антитела являются типичными человеческими антителами, в которых некоторые остатки CDR и, возможно, некоторые остатки FR замещаются остатками из аналогичных областей антител грызунов.

- 35 [0183] Выбор варибельных доменов человека, как легких, так и тяжелых цепей, для использования при получении гуманизированных антител является очень важным для снижения антигенности. Согласно так называемому способу «наилучшего соответствия» проводят скрининг последовательности варибельного домена антитела грызуна относительно целой библиотеки известных последовательностей варибельных доменов  
40 человека. Затем последовательность человеческого антитела, которая является наиболее схожей с последовательностью грызунов, принимается качестве каркасного участка (FR) человеческого антитела для создания гуманизированного антитела (Sims *et al.*, *J. Immunol.*, 151:2296 (1993); Chothia *et al.*, *J. Mol.Biol.*, 196:901 (1987)). В другом методе используют определенный каркасный участок, полученный из консенсусной  
45 последовательности всех человеческих антител определенной подгруппы легких и тяжелых цепей. Эта же каркасный участок может быть использован для нескольких различных гуманизированных антител (Carter *et al.*, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 89:4285 (1992); Presta *et al.*, *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)).

[0184] Кроме того, важно, чтобы гуманизация антител осуществлялась с сохранением высокой аффинности к данному антигену и других благоприятных биологических свойств. Для достижения этой цели в соответствии с одним вариантом реализации данного способа гуманизированные антитела получают путем анализа родительских последовательностей и различных расчетных гуманизированных продуктов с применением трехмерных моделей родительских и гуманизированных последовательностей. Трехмерные модели иммуноглобулина общедоступны и известны специалистам в данной области. Также существуют компьютерные программы для иллюстрации и представления вероятных трехмерных конформационных структур выбранных последовательностей-кандидатов иммуноглобулина. Изучение полученных изображений позволяет проанализировать вероятную роль данных остатков в функционировании последовательности-кандидата иммуноглобулина, т. е. провести анализ влияния этих остатков на способность иммуноглобулина-кандидата связываться с антигеном. Таким способом остатки FR могут быть выбраны из последовательностей антител-реципиентов и вводимых последовательностей и объединены так, чтобы можно было получить антитело с требуемыми свойствами, такими как повышенная аффинность к антигену(ам)-мишени(ям). Как правило, остатки гипервариабельной области оказывают непосредственное и наиболее существенное влияние на связывание антигена.

[0185] Антитела человека по настоящему изобретению можно сконструировать путем комбинирования последовательности(ей) вариабельного домена клона Fv, выбранной(ых) из библиотек фагового дисплея, полученных из последовательностей человека, с известной последовательностью(ями) константного домена человека, как описано выше. В альтернативном варианте моноклональные антитела человека по настоящему изобретению можно получить гибридным методом. Линии клеток миеломы человека и гетеромиеломы мыши-человека для продукции моноклональных антител человека были описаны Kozbor *J. Immunol.*,133:3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp.51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); и Boerner *et al.*, *J. Immunol.*,147:86 (1991).

[0186] В настоящее время возможным является получение трансгенных животных (например, мышей), которые при иммунизации способны продуцировать полный репертуар антител человека в отсутствии продукции эндогенных иммуноглобулинов. Например, было описано, что гомозиготная делеция гена соединительного участка тяжелых цепей антител ( $J_H$ ) у химерных мышей и мышей с герминальной мутацией приводит к полному ингибированию продукции эндогенных антител. Перенос набора генов иммуноглобулинов зародышевой линии человека таким мышам с герминальной мутацией приводит к продукции антител человека при антигенной стимуляции. См., например, Jakobovits *et al.*, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggermann *et al.*, *Year in Immuno.*,7:33 (1993); и Duchosal *et al.* *Nature* 355:258 (1992).

[0187] Претасовка генов может быть также использована для получения человеческих антител из антител, не относящихся к человеческим, например, грызуна, при этом человеческое антитело обладает сходной аффинностью и специфичностью в сравнении с исходным антителом, не относящимся к человеческому. Согласно этому способу, который также называется «импринтингом эпитопа», каждый фрагмент вариабельной области тяжелой и легкой цепи антитела, не относящегося к человеческому, который получают методами фагового дисплея, что описаны в настоящем документе, заменяют репертуаром генов V-домена человека, благодаря чему формируется популяция химерных фрагментов scFv или Fab, включающих участки нечеловеческого и

человеческого происхождения. Селекция с антигеном приводит к выделению химерных scFv или Fab, состоящих из цепи отличной от человеческого антитела/цепи человеческого антитела, при этом цепь человеческого антитела обеспечивает восстановление антигенсвязывающего центра, разрушенного при удалении соответствующей отличной от человеческой цепи в первичном клоне фагового дисплея, т.е. эпитоп определяет (отвечает за импринтинг) выбор партнера цепи человеческого антитела. Когда этот процесс повторяют для замены оставшейся отличной от человеческой цепи, получают антитело человека (см. PCT WO 93/06213, опубликованную 1 апреля 1993 года). В отличие от традиционной гуманизации отличных от человеческих антител путем пересадки CDR этот метод обеспечивает получение полностью человеческих антител, в которых отсутствуют отличные от человеческих остатки FR или CDR.

(v) Фрагменты антител

[0188] Фрагменты антител можно получать традиционными способами, такими как ферментативное расщепление, или рекомбинационными методами. В определенных обстоятельствах преимущественным является применение фрагментов антител, а не целых антител. Меньший размер фрагментов обеспечивает быстрый клиренс и может привести к повышенному доступу к солидным опухолям. Для обзора определенных фрагментов антител, см. Hudson et al. (2003) *Nat.Med.*9:129-134.

[0189] Для получения фрагментов антител были разработаны различные способы. Традиционно эти фрагменты получали протеолитическим расщеплением полноразмерных антител (см., например, Morimoto et al., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992); и Brennan et al., *Science*, 229:81 (1985)). Однако эти фрагменты в настоящее время можно получать непосредственно с помощью рекомбинантных клеток-хозяев. Fab-, Fv- и scFv-фрагменты антител могут быть экспрессированы и секретируются в *E. coli*, таким образом, обеспечивая простой способ получения больших количеств этих фрагментов. Фрагменты антител можно выделять из фаговых библиотек антител, описанных выше. В альтернативном варианте Fab'-SH-фрагменты можно выделять непосредственно из *E. coli* и с помощью химических методов соединить с получением F(ab')<sub>2</sub>-фрагментов (Carter et al., *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). В соответствии с другим подходом F(ab')<sub>2</sub>-фрагменты можно выделять непосредственно из рекомбинантной культуры клеток-хозяев. Fab- и F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент с повышенным временем полужизни *in vivo*, содержащий остатки эпитопа для связывания с рецепторами реутилизации, описан в патенте США №5869046. Другие способы получения фрагментов антител будут очевидны специалисту в данной области. В определенных вариантах реализации изобретения антитело представляет собой одноцепочечный Fv-фрагмент (scFv). См. WO 93/16185; патенты США №5571894; и 5587458. Fv и sFv являются единственными вариантами с интактными антигенсвязывающими участками, которые лишены константных участков; таким образом, они могут подойти для снижения неспецифического связывания в ходе применения *in vivo*. Можно сконструировать слитые белки sFvc с получением эффекторного белка либо на амино-, либо на карбоксильном конце sFv. См. *Antibody Engineering*, ed. Borrebaeck, выше. Фрагмент антитела также может представлять собой «линейное антитело», например, как описано в патенте США №5641870, например. Такие линейные фрагменты антител могут быть моноспецифическими или биспецифическими.

vi) Мультиспецифические антитела

[0190] Мультиспецифические антитела обладают специфичностью связывания по

меньшей мере по отношению к двум различным эпитопами, причем данные эпитопы обычно получают из различных антигенов. Несмотря на то, что такие молекулы обычно связываются только с двумя различными эпитопами (т.е., биспецифические антитела, BsAb), антитела с дополнительной специфичностью, как, например, триспецифические антитела, охвачены этим выражением при использовании в данном документе. Биспецифические антитела можно получить в виде полноразмерных антител или фрагментов антител (например, биспецифические антитела F(ab')<sub>2</sub>).

[0191] Способы получения биспецифических антител известны в данной области. Традиционное получение полноразмерных биспецифических антител основано на совместной экспрессии двух пар иммуноглобулиновых тяжелой-легкой цепей, причем две цепи обладают различной специфичностью (Millstein et al., *Nature*, 305:537-539 (1983)). Поскольку происходит случайное распределение тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина, в клетки таких гибридом (квадром) продуцируют потенциальную смесь из 10 различных молекул антител, из которых только одна будет иметь правильную биспецифическую структуру. Очистка молекул с правильной структурой, которую обычно проводят с использованием различных стадий аффинной хроматографии, является довольно трудоемкой, и выход продукта является низким. Аналогичные способы описаны в WO 93/08829, и в работе Traunecker et al., *EMBO J.*, 10: 3655-3659 (1991).

[0192] В соответствии с другим подходом осуществляют слияние переменных доменов антитела с требуемой специфичностью связывания (участки связывания антитело-антиген) с последовательностями константных доменов иммуноглобулинов. Слияние осуществляют, например, с константным доменом тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащим по меньшей мере часть шарнирной области, CH2 и CH3. Обычно первая константная область тяжелой цепи (CH1), содержащая участок, необходимый для связывания легкой цепи, содержится по меньшей мере в одном из слитых белков. ДНК, кодирующие слитые тяжелые цепи иммуноглобулина и, если требуется, легкие цепи иммуноглобулина, встраивают в отдельные экспрессирующие векторы и совместно трансфецируют в подходящий организм-хозяин. Это обеспечивает большую гибкость в регуляции соотношений трех полипептидных фрагментов в вариантах реализации изобретения, где неравные соотношения трех полипептидных цепей, используемых в конструкции, обеспечивают оптимальные выходы. Однако возможным является встраивание кодирующих последовательностей двух или всех трех полипептидных цепей в один экспрессирующий вектор, если экспрессия по меньшей мере двух полипептидных цепей в равных соотношениях приводит к высокому выходу продукта или если соотношения не имеют существенного влияния.

[0193] В одном варианте осуществления этого подхода, биспецифические антитела состоят из тяжелой цепи гибридного иммуноглобулина с одной специфичностью связывания на одном плече, и пары тяжелая цепь - легкая цепь гибридного иммуноглобулина (обладающей другой специфичностью связывания) на другом плече. Было обнаружено, что такая ассиметричная структура облегчает разделение требуемого биспецифического соединения и нежелательных комбинаций цепей иммуноглобулинов, поскольку наличие легкой цепи иммуноглобулина только в одной половине биспецифической молекулы обеспечивает легкий способ разделения. Этот подход описан в WO 94/04690. Для более подробного описания получения биспецифических антител см., например, *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

[0194] В соответствии с другим подходом, который описан в источнике WO96/27011, для максимального увеличения процентной доли гетеродимеров, которые выделяют

из культур рекомбинантных клеток, можно сконструировать область контакта между парой молекул антител. Одна область контакта содержит по меньшей мере часть C<sub>H</sub>3-домена константного домена антитела. В этом способе одну или несколько небольших боковых цепей аминокислот из области контакта первой молекулы антитела заменяют на более крупные боковые цепи (например, тирозин или триптофан). В области контакта второй молекулы антитела создают компенсирующие «полости» идентичного или сходного с крупной(ыми) боковой(ыми) цепью(ями) размера посредством замены крупных боковых цепей аминокислот на цепи меньших размеров (например, аланин или треонин). Это обеспечивает механизм повышения выхода гетеродимера по сравнению с другими нежелательными конечными продуктами, такими как гомодимеры.

[0195] Биспецифические антитела включают «поперечно-сшитые» антитела или «гетероконъюгаты» антител. Например, одно из антител в гетероконъюгате может быть связано с авидином, а другое с биотином. Такие антитела, например, были предложены для нацеливания клеток иммунной системы против нежелательных клеток (патент США №4676980) и для лечения ВИЧ-инфекции (WO 91/00360, WO 92/200373 и EP 03089). Гетероконъюгаты антител можно получать с использованием любых пригодных способов поперечного сшивания. Подходящие сшивающие агенты хорошо известны в данной области, и описаны в патенте США № 4676980 наряду с различными методами поперечной сшивки.

[0196] Методы получения биспецифических антител из фрагментов антител также описаны в литературе. Например, биспецифические антитела можно получать с использованием химической связи. В работе Brennan et al., *Science*, 229:81 (1985) описан способ, в котором полноразмерные антитела протеолитически расщепляют с получением F(ab')<sub>2</sub>-фрагментов. Эти фрагменты восстанавливают в присутствии образующего комплексы с дитиолами средства - арсенита натрия для стабилизации вицинальных дитиолов и предотвращения образования межмолекулярных дисульфидных связей. Затем полученные Fab'-фрагменты преобразуются в производные тионитробензоата (TNB). Одно из производных Fab'-TNB реконвертируют в Fab'-тиол восстановлением меркаптоэтаноламинам и смешивают с эквимольным количеством другого производного Fab'-TNB с получением биспецифического антитела. Полученные таким способом биспецифические антитела можно использовать в качестве агентов для селективной иммобилизации ферментов.

[0197] Новейшие достижения упростили непосредственное выделение Fab'-SH-фрагментов из *E. coli*, которые могут быть соединены с помощью химических методов для получения биспецифических антител. В работе Shalaby et al., *J. Exp. Med.*, 175:217-225 (1992) описано получение полностью гуманизированной молекулы F(ab')<sub>2</sub> биспецифического антитела. Каждый Fab'-фрагмент был по отдельности секретируван в клетках *E. coli* и подвергнут прямому химическому соединению *in vitro* для получения биспецифического антитела.

[0198] Были также описаны различные методы получения и выделения фрагментов биспецифических антител непосредственно из культуры рекомбинантных клеток. Например, биспецифические антитела были получены с применением лейциновых «молний». Kostelny et al. *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992). Пептиды с лейциновыми «молниями» из белков Fos и Jun были соединены с Fab'-участками двух разных антител с помощью слияния генов. Гомодимеры антител были восстановлены в шарнирной области с получением мономеров и затем подвергнуты повторному окислению с получением гетеродимеров антител. Этот способ можно также использовать для



получения гомодимеров антител. Технология получения «диател», описанная Hollinger et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 90:6444-6448 (1993), обеспечила альтернативный механизм для получения фрагментов биспецифических антител. Фрагменты содержат

5 вариабельный домен тяжелой цепи ( $V_H$ ), соединенный с вариабельным доменом легкой цепи ( $V_L$ ) линкером, который слишком короткий для того, чтобы было возможно образование пары между двумя доменами на одной и той же цепи. Соответственно,  $V_H$ - и  $V_L$ -домены одного фрагмента вынуждены образовывать пару с комплементарными  $V_H$ - и  $V_L$ -доменами другого фрагмента, тем самым образуя два

10 антигенсвязывающих сайта. Сообщали также о другой стратегии получения фрагментов биспецифического антитела с применением димеров одноцепочечных Fv (sFv). См. Gruber et al, *J.Immunol*, 152:5368 (1994).

[0199] Предусмотрены антитела с более чем двумя валентностями. Например, могут быть получены триспецифические антитела. *Tuft et al.J. Immunol.*147:60 (1991).

15 (vii) Однодоменные антитела

[0200] В некоторых вариантах реализации изобретения антитело представляет собой однодоменное антитело. Однодоменное антитело представляют собой одну полипептидную цепь, содержащую весь или часть вариабельного домена тяжелой цепи или весь, или часть, вариабельного домена легкой цепи антитела. В некоторых вариантах

20 реализации изобретения однодоменное антитело представляет собой однодоменное антитело человека (Domantis, Inc., Waltham, Mass.; см., например, патент США №6248516 B1). В одном варианте реализации изобретения однодоменное антитело полностью или частично состоит из вариабельного домена тяжелой цепи антитела.

(viii) Варианты антител

25 [0201] В некоторых вариантах реализации изобретения предусмотрена(ы) модификация (и) аминокислотных последовательностей антител, описанных в настоящем документе. Например, может возникнуть необходимость в улучшении аффинности связывания и/или других биологических свойств антитела. Варианты аминокислотных последовательностей антитела можно получить путем внесения соответствующих

30 изменений в нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело, или путем пептидного синтеза. Такие модификации включают, например, делеции и/или вставки, и/или замены остатков в аминокислотных последовательностях антитела. Для получения конечной конструкции может быть использована любая комбинация делеции, вставки и замены, при условии, что данная конечная конструкция обладает необходимыми

35 характеристиками. Аминокислотные замены могут быть введены в изучаемую аминокислотную последовательность во время образования данной последовательности.

(ix) Производные антител

[0202] Антитела по настоящему изобретению могут быть дополнительно модифицированы для содержания дополнительных небелковых молекул, которые

40 известны в данной области и общедоступны. В определенных вариантах реализации изобретения к молекулам, подходящим для дериватизации антитела, относят водорастворимые полимеры. Неограничивающие примеры водорастворимых полимеров включают, в том числе, полиэтиленгликоль (ПЭГ), сополимеры этиленгликоля/пропиленгликоля, карбоксиметилцеллюлозу, декстран, поливиниловый спирт,

45 поливинилпирролидон, поли-1, 3-диоксолан, поли-1,3,6-триоксан, сополимер этилена/малеинового ангидрида, полиаминокислоты (либо гомополимеры, либо статистические сополимеры) и декстран или поли(n-винилпирролидон)полиэтиленгликоль, гомополимеры пропропиленгликоля, сополимеры оксида/этиленоксида,

полиоксиэтилированные полиолы (например, глицерин), поливиниловый спирт и их смеси. Пропионовый альдегид полиэтиленгликоля может обладать преимуществами при производстве из-за его стабильности в воде. Указанный полимер может обладать любой молекулярной массой и разветвленной или неразветвленной структурой.

- 5 Количество молекул полимера, присоединенных к антителу, может варьировать, и в случае присоединения более одной молекулы полимера, они могут представлять собой одинаковые или разные молекулы. В целом, количество и/или тип полимеров, используемых для получения производных, можно определить с учетом факторов, включающих, в том числе, конкретные свойства или функции антитела, подлежащие
- 10 улучшению, независимо от того, будет ли производное антитела использоваться в терапии при определенных условиях и т.д.

(х) Векторы, клетки-хозяева и рекомбинационные способы

- [0203] Антитела также можно получить с использованием рекомбинационных способов. Для рекомбинантного получения антитела к антигену выделяют нуклеиновую
- 15 кислоту, кодирующую данное антитело и встраивают в реплицируемый вектор для дальнейшего клонирования (амплификации ДНК) или для экспрессии. ДНК, кодирующую антитело, можно легко выделить и секвенировать с использованием общепринятых методик (например, с использованием олигонуклеотидных зондов, способных специфически связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи
- 20 антитела). Доступно множество векторов. Компоненты вектора, как правило, включают, в том числе, один или более из следующих компонентов: сигнальная последовательность, точка начала репликации, один или более маркерных генов, энхансерный элемент, промотор и последовательность терминации транскрипции.

а) Компонент - сигнальная последовательность

- 25 [0204] Антитело по настоящему изобретению можно получать рекомбинационными способами не только непосредственно, но также в качестве полипептида, слитого с гетерологичным полипептидом, который предпочтительно представляет собой сигнальную последовательность или другой полипептид, обладающий участком для специфичного расщепления на N-конце зрелого белка или полипептида. Выбранная
- 30 гетерологичная сигнальная последовательность предпочтительно представляет собой последовательность, которая распознается и подвергается процессингу (например, расщепляется сигнальной пептидазой) в клетке-хозяине. В случае прокариотических клеток-хозяев, которые не распознают и не подвергают процессингу нативную сигнальную последовательность антитела, данную сигнальную последовательность
- 35 можно заменять прокариотической сигнальной последовательностью, выбранной, например, из группы из лидерных последовательностей щелочной фосфатазы, пенициллиназы, lpp или термостабильного энтеротоксина II. В случае секреции в клетках дрожжей нативную сигнальную последовательность можно заменять, например, лидерной последовательностью инвертазы дрожжей, лидерной последовательностью
- 40  $\alpha$ -фактора (включая лидерные последовательности  $\alpha$ -фактора *Saccharomyces* и *Kluyveromyces*) или лидерной последовательностью кислой фосфатазы, лидерной последовательностью глюкоамилазы *C.albicans* или сигнальной последовательностью, описанной в WO 90/13646. Для экспрессии в клетках млекопитающих доступны сигнальные последовательности млекопитающих, а также вирусные секреторные
- 45 лидерные последовательности, например, сигнальная последовательность gD вируса простого герпеса.

(b) Точка начала репликации

[0205] Как экспрессирующие, так и клонирующие векторы содержат

последовательность нуклеиновой кислоты, которая обеспечивает репликацию вектора в одной или более выбранных клетках-хозяевах. Как правило, в клонирующих векторах эта последовательность представляет собой последовательность, которая обеспечивает репликацию вектора независимо от хромосомной ДНК хозяина, и включает точки начала репликации или автономно реплицирующиеся последовательности. Такие последовательности хорошо известны для множества бактерий, дрожжей и вирусов. Точка начала репликации из плазмиды pBR322 подходит для большинства грамотрицательных бактерий, точка начала репликации плазмиды 2μ, подходит для дрожжей, и точки начала репликации различных вирусов (SV40, вируса полиомы, аденовируса, VSV или BPV) пригодны для клонирования векторов в клетках млекопитающих. Как правило, в случае экспрессирующих векторов млекопитающих компонент - точка начала репликации не требуется (точку начала репликации SV40, главным образом, можно использовать только потому, что она содержит ранний промотор).

с) Компонент - селективный ген

[0206] Экспрессирующие и клонирующие векторы могут содержать ген для селекции, также называемый селективным маркером. Типичные гены для селекции кодируют белки, которые (а) придают устойчивость к антибиотикам или другим токсинам, например, ампициллину, неомицину, метотрексату или тетрациклину, (б) комплементировать ауксотрофность или (с) обеспечивают основные питательные вещества, которые не доступны в комплексных средах, например, ген, кодирующий D-аланинрацемазу для *Bacilli*.

[0207] В одном примере схемы селекции используют лекарственное вещество для остановки роста клетки-хозяина. Клетки, которые успешно трансформированы гетерологичным геном, продуцируют белок, придающий устойчивость к лекарственному веществу и, таким образом, выживают после режима селекции. Примерами такого доминантного вида селекции является применение лекарственных веществ: неомицина, микофеноловой кислоты и гиромидина.

[0208] Другим примером подходящих селективных маркеров для клеток млекопитающих являются маркеры, которые позволяют идентификацию клеток, компетентных для поглощения нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело, как, например, гены DHFR, глутаминсинтетазы (GS), тимидинкиназы, металлотеонеина-I и -II, предпочтительно гены металлотеонеина приматов, аденозиндезаминазы, орнитиндекарбоксилазы и т.д.

[0209] Например, клетки, трансформированные геном DHFR, идентифицируют культивированием всех трансформантов в культуральной среде, которая содержит метотрексат (Mtx), конкурентный антагонист DHFR. В этих условиях ген DHFR амплифицируется наряду с любой другой совместно трансформируемой нуклеиновой кислотой. Можно использовать линию клеток яичника китайского хомячка (CHO), дефицитную по эндогенной активности DHFR (например, ATCC CRL-9096).

[0210] В альтернативном варианте, клетки, трансформированные геном GS, идентифицируют культивированием трансформантов в культуральной среде, содержащей L-метионинсульфоксимин (Mtx), ингибитор GS. В этих условиях ген GS амплифицируется наряду с любой другой совместно трансформируемой нуклеиновой кислотой. Систему для селекции/амплификации GS можно использовать в комбинации с системой селекции/амплификации DHFR, описанной выше.

[0211] В альтернативном варианте, клетки-хозяева (в частности, хозяева дикого типа, которые содержат эндогенный DHFR), трансформированные или совместно

трансформированные последовательностями ДНК, кодирующими представляющее интерес антитело, ген DHFR дикого типа и другой селективный маркер, такой как аминокликозид-3'-фосфотрансфераза (APH), можно отбирать путем выращивания клеток на среде, содержащей селективное средство для селективного маркера, такое как аминокликозидный антибиотик, например, канамицин, неомицин или G418. См. США. США №4965199

[0212] Подходящим селективным геном для применения в дрожжах является ген *trp1*, содержащийся в плазмиде дрожжей YRp7 (Stinchcomb *et al.*, *Nature*, 282:39 (1979)). Ген *trp* представляет собой селективный маркер для мутантного штамма дрожжей, у которого отсутствует способность расти в отсутствии триптофана, например, ATCC No. 44076 или PER4-1. Jones, *Genetics*, 85:12 (1977). Затем наличие обеспечиваемого *trp1* дефекта в геноме дрожжевой клетки-хозяина обеспечивает эффективные условия для определения трансформации по росту в отсутствии триптофана. Аналогично, дефицитные по *Leu2* штаммы дрожжей (ATCC 20622 или 38626) комплементируют известными плазмидами, несущими ген *Leu2*.

[0213] Кроме того, векторы, полученные из кольцевой плазмиды pKD1 размером 1,6 мкм, можно использовать для трансформации дрожжей *Kluyveromyces*. В альтернативном варианте сообщалось об экспрессирующей системе для продукции рекомбинантного химозина телят в больших объемах для *K. lactis*. Van den Berg, *Bio/Technology*, 8:135 (1990). Также описаны стабильные многокопийные экспрессирующие векторы для секретиции зрелого рекомбинантного сывороточного альбумина человека промышленными штаммами *Kluyveromyces*. Fleer *et al.*, *Bio/Technology*, 9:968-975 (1991).

#### d) Компонент - промотор

[0214] Экспрессирующие и клонирующие векторы, как правило, содержат промотор, который распознается организмом-хозяином и функционально связан с нуклеиновой кислотой, кодирующей антитело. Промоторы, подходящие для применения в прокариотических клетках-хозяевах, включают промотор *phoA*, промоторные системы β-лактамазы и лактозы, промотор щелочной фосфатазы, промоторную систему триптофана (*trp*) и гибридные промоторы, такие как промотор *tac*. Однако подходят другие известные бактериальные промоторы. Промоторы для применения в бактериальных системах также содержат последовательность Шайна-Дальгарно (S.D.), функционально связанную с ДНК, кодирующей антитело.

[0215] Промоторные последовательности для эукариот известны. Практически все эукариотические гены обладают АТ-богатой областью, расположенной приблизительно от 25 до 30 оснований выше участка инициации транскрипции. Другая последовательность, находящаяся от 70 до 80 оснований выше точки начала транскрипции множества генов, представляет собой участок CNCAAT, где N может представлять собой любой нуклеотид. На 3'-конце большинства эукариотических генов находится последовательность AATAAA, которая может представлять собой сигнал для добавления поли-А хвоста к 3'-концу кодирующей последовательности. Все эти последовательности можно соответствующим образом встраивать в эукариотические экспрессирующие векторы.

[0216] Примеры подходящих промоторных последовательностей для применения в клетках-хозяевах дрожжей включают промоторы 3-фосфоглицераткиназы или других гликолитических ферментов, таких как енолаза, глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа, гексокиназа, пируватдекарбоксилаза, фосфофруктокиназа, глюкоза-6-фосфат изомеразы, 3-фосфоглицеромутаза, пируваткиназа, триозофосфатизомеразы, фосфоглюкоизомеразы и глюкокиназы.

[0217] Другие промоторы дрожжей, которые являются индуцибельными промоторами, обладающими дополнительным преимуществом, которое заключается в транскрипции, контролируемой посредством условий выращивания, представляют собой промоторные участки алкогольдегидрогеназы 2, изоцитохрома C, кислой фосфатазы, ферментов деградации, связанных с метаболизмом азота, металлотеонеина, глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы и ферментов, ответственных за употребление мальтозы и галактозы. Кроме того, пригодные векторы и промоторы для применения для экспрессии в дрожжах описаны в EP 73657. Также предпочтительно с промоторами дрожжей используют энхансеры дрожжей.

[0218] Транскрипцию антитела с векторов в клетках-хозяевах млекопитающих могут контролировать, например, промоторы, получаемыми из геномов вирусов, таких как вирус полиомы, вирус оспы птиц, аденовирус (такой как Аденовирус 2), вирус папилломы крупного рогатого скота, вирус саркомы птиц, цитомегаловирус, ретровирус, вирус гепатита-B и вирус обезьяны 40 (SV40), или гетерологичные промоторы млекопитающих, например, промотор гена актина или промотор гена иммуноглобулина, промотор генов белков теплового шока, при условии, что такие промоторы совместимы с системами клеток-хозяев.

[0219] Ранние и поздние промоторы вируса SV40 обычно получают в качестве рестрикционного фрагмента SV40, который также содержит точку начала репликации вируса SV40. Предранний промотор цитомегаловируса человека обычно получают в качестве рестрикционного фрагмента HindIII E. Система для экспрессии ДНК в клетках млекопитающих-хозяев с использованием вируса папилломы крупного рогатого скота в качестве вектора описана в патенте США №4419446. Модификация этой системы описана в патенте США №4601978. См. также Reyes *et al.*, *Nature* 297:598-601 (1982) в отношении экспрессии кДНК β-интерферона человека в клетках мышей под контролем тимидинкиназного промотора из вируса простого герпеса. В альтернативном варианте в качестве промотора можно использовать длинный концевой повтор вируса саркомы Рауса.

(e) Компонент - энхансерный элемент

[0220] Транскрипцию ДНК, кодирующей антитело по настоящему изобретению, у высших эукариот часто усиливают посредством встраивания в вектор энхансерной последовательности. В настоящее время известно много энхансерных последовательностей из генов млекопитающих (глобина, эластазы, альбумина, α-фетопротеина и инсулина). Однако, как правило, используют энхансер из вируса, поражающего эукариотическую клетку. Их примеры включают энхансер SV40 на участке позднего начала репликации (п.о. 100-270), энхансер раннего промотора цитомегаловируса, энхансер полиомы на участке позднего начала репликации и энхансеры аденовируса. См. также публикацию Yaniv, *Nature* 297:17-18 (1982), в которой описаны энхансерные элементы для активации эукариотических промоторов. Энхансер может быть сплайсирован в вектор в 5'- или 3'-положении по отношению к последовательности, кодирующей антитело, но предпочтительно, чтобы он находился в 5'-положении от промотора.

(f) Компонент для терминации транскрипции

[0221] Экспрессирующие векторы, используемые в эукариотических клетках-хозяевах (в клетках дрожжей, грибов, насекомых, растений, животных, человека или ядросодержащих клетках из других многоклеточных организмов) также содержат последовательности, необходимые для терминации транскрипции и для стабилизации мРНК. Такие последовательности обычно находятся на 5'-а, иногда, на 3'-

нетранслируемых участках эукариотических или вирусных ДНК или кДНК. Эти участки содержат нуклеотидные фрагменты, транскрибируемые в качестве полиаденилированных фрагментов в нетранслируемом участке мРНК, кодирующей антитело. Одним пригодным компонентом для терминирования транскрипции является участок полиаденилирования бычьего гормона роста. См. описание экспрессионных векторов в WO 94/11026 и в настоящей заявке.

g) Селекция и трансформация клеток-хозяев

[0222] К подходящим клеткам-хозяевам для клонирования или экспрессии ДНК в векторах, описанных в данном документе, относятся описанные выше клетки прокариот, дрожжей или высших эукариот. Подходящие для этой цели прокариоты включают эубактерии, такие как грамотрицательные или грамположительные организмы, например, Enterobacteriaceae, такие как *Escherichia*, например, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, например, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, например, *Serratia marcescans* и *Shigella*, а также *Bacilli*, как, например, *B. subtilis* и *B. licheniformis* (например, *B. licheniformis* 41P, описанные в DD 266710, опубликованной 12 апреля 1989 года, *Pseudomonas*, как, например, *P. Aeruginosa* и *Streptomyces*. Одним предпочтительным хозяином *E. coli* для клонирования является *E. coli* 294 (ATCC 31446), хотя также подходят другие штаммы, такие как *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31537) и *E. coli* W3110 (ATCC 27325). Эти примеры носят скорее иллюстративный, чем исчерпывающий характер.

[0223] Полноразмерное антитело, слитые белки на основе антител и фрагменты антител можно получать в бактериях, в частности, когда отсутствует необходимость в гликозилировании и эффекторной функции Fc, например, когда терапевтическое антитело конъюгировано с цитотоксическим средством (например, токсином), которое само по себе обеспечивает эффективное разрушение клеток опухоли. Полноразмерные антитела обладают более высоким временем полужизни в кровотоке. Продукция в *E. coli* является более быстрой и более экономически эффективной. В отношении экспрессии фрагментов антител и полипептидов в бактерии см., например, патент США № 5648237 (Carter et al.), патент США № 5789199 (Joly et al.), патент США № 5840523 (Simmons et al.), в которых описаны участок инициации трансляции (TIR) и сигнальные последовательности для оптимизации экспрессии и секреции. См. также Charlton, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C.Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J., 2003), pp.245-254, в которой описана экспрессия фрагментов антител в *E. coli*. После экспрессии антитело может быть выделено из клеточной суспензии *E. coli* в растворимой фракции и очищено, например, с помощью колонки с белком А или G, в зависимости от изотипа. Окончательную очистку можно проводить аналогично процессу очистки антитела, экспрессируемого, например, в клетках СНО.

[0224] Помимо прокариот, подходящими хозяевами для клонирования или экспрессии кодирующих антитела векторов являются эукариотические микроорганизмы, такие как нитевидные грибы или дрожжи. *Saccharomyces cerevisiae*, или обычные пекарские дрожжи, наиболее широко используемый микроорганизм из числа низших эукариотических микроорганизмов-хозяев. Однако к широко доступным и пригодным к использованию в настоящем изобретении относится ряд других родов, видов и штаммов, таких как *Schizosaccharomyces pombe*, клетки-хозяева *Kluyveromyces*, такие как, например, *K. K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12424), *K. bulgaricus* (ATCC 16045), *K. wickerhamii* (ATCC 24178), *K. waltii* (ATCC 56500), *K. drosophilarum* (ATCC 36906), *K. thermotolerans* и *K. marxianus*, *Yarrowia* (EP 402226); *Pichia pastoris* (EP 183070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces*, как, например,

*Schwanniomyces occidentalis*; и нитевидные грибы, такие как, например, клетки-хозяева *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, и клетки-хозяева *Aspergillus*, как, например, *A. nidulans* и *A. niger*. Обзор, в котором обсуждается применение дрожжей и нитчатых грибов для продукции терапевтических белков, см., например, в Gerngross, *Nat.Biotech.*22: 1409-1414 (2004).

[0225] Можно выбирать определенные штаммы грибов и дрожжей, у которых пути гликозилирования были «гуманизированы», что приводит к продукции антитела с профилем гликозилирования, частично или полностью характерным для человека. См., например, Li et al. *Nat.Biotech.*24:210-215 (2006) (где описана гуманизация пути гликозилирования в *Pichia pastoris*); и Gerngross et al., выше.

[0226] Подходящие клетки-хозяева для экспрессии гликозилированного антитела также получают из многоклеточных организмов (безпозвоночных и позвоночных). Примеры клеток беспозвоночных включают клетки растений и насекомых. Выявлен ряд штаммов и вариантов бакуловирусов, и соответствующих пермиссивных клеток-хозяев среди хозяев, таких как *Spodoptera frugiperda* (гусеница), *Aedes aegypti* (комар), *Aedes albopictus* (комар), *Drosophila melanogaster* (плодовая мушка) и *Bombyx mori*. Множество штаммов вирусов для трансфекции являются широко доступными, например, вариант L-1 *Autographa californica* NPV и штамм Bm-5 *Bombyx mori* NPV, и такие вирусы можно использовать в качестве вирусов в соответствии с настоящим изобретением, в частности, для трансфекции клеток *Spodoptera frugiperda*.

[0227] Также в качестве хозяев можно использовать растительные клеточные культуры хлопка, кукурузы, картофеля, сои, петунии, томата, ряски (*Leninaceae*), люцерны (*M. truncatula*) и табака. См., например, патент США №№ 5959177, 6040498, 6420548, 7125978 и 6417429 (где описана технология PLANTIBODIES™ для продукции антител трансгенными растениями).

[0228] В качестве клеток-хозяев можно использовать клетки позвоночных, и размножение клеток позвоночных в культуре (культуре тканей) стало общепринятой методикой. Примерами пригодных линий клеток млекопитающих-хозяев являются линия клеток почки обезьяны CV1, трансформированная SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); линия клеток эмбриональных почек человека (клетки 293 или 293, субклонированные для выращивания в суспензионной культуре, Graham et al., *J. Gen Virol.*36:59 (1977)); клетки почки молодого хомячка (BHK, ATCC CCL 10); клетки Сертоли мыши (TM4, Mather, *Biol.Reprod.*23:243-251, 1980); клетки почек обезьяны (CV1 ATCC CCL 70); клетки почек африканской зеленой мартышки (VERO-76, ATCC CRL-1 587); клетки карциномы шейки матки человека (HeLa, ATCC CCL 2); клетки почки собаки (MDCK, ATCC CCL 34); клетки печени серой крысы (BRL 3A, ATCC CRL 1442); клетки легких человека (W138, ATCC CCL 75); клетки печени человека (Hep G2, HB 8065); опухоль молочной железы мышей (MMT 060562, ATCC CCL51); клетки TRI (Mather et al., *Annals N.Y.Acad.Sci.*383:44-68, 1982); клетки MRC 5; клетки FS4; и линия гепатомы человека (Hep G2). Другие пригодные линии клеток-хозяев млекопитающих включают клетки яичника китайского хомяка (CHO), в том числе клетки DHFR<sup>-</sup> CHO (Urlaub et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 77:4216 (1980)); и миеломные клеточные линии, такие как NS0 и Sp2/0. Для ознакомления с обзором по определенным линиям клеток млекопитающих-хозяев, подходящим для получения антител, см., например, Yazaki and Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol.248 (B.K.C.Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J., 2003), pp.255-268.

[0229] Для продукции антител клетки-хозяева трансформируют описанными выше экспрессирующими и клонирующими векторами и культивируют в стандартных питательных средах, модифицированной соответствующим образом, для индукции

промоторов, селекции трансформантов или амплификации генов, кодирующих требуемые последовательности.

#### h) Культивирование клеток-хозяев

[0230] Клетки-хозяева, используемые для продукции антитела по настоящему изобретению, можно культивировать в различных средах. Для культивирования клеток-хозяев подходят коммерчески доступные среды, такие как среда Хэма F10 (Sigma), минимальная поддерживающая среда ((MEM), (Sigma)), RPMI-1640 (Sigma) и модифицированная по способу Дульбекко среда Игла, ((DMEM), Sigma). Кроме того, для клеток-хозяев в качестве культуральной среды можно использовать любую из сред, описанных в Ham *et al.*, *Meth. Enz.* 58:44 (1979), Barnes *et al.*, *Anal. Biochem.* 102:255 (1980), патенты США №№ 4767704; 4657866; 4927762; 4560655; или 5122469; WO 90/03430; WO 87/00195; или патент США Re.30985. Любые из этих сред можно дополнить при необходимости гормонами и/или другими факторами роста (такими как инсулин, трансферрин или эпидермальный фактор роста), солями (такими как хлорид натрия, кальция, магния и фосфат), буферами (такими как HEPES), нуклеотидами (такими как аденозин и тимидин), антибиотиками (такими как лекарственное средство GENTAMYCIN™), микроэлементами (определяемыми как неорганические соединения, обычно содержащиеся в конечных концентрациях микромолярного диапазона) и глюкозой или эквивалентными источниками энергии. Также можно добавлять любые другие необходимые дополнительные вещества в соответствующих концентрациях, которые известны специалистам в данной области. Условия культивирования, такие как температура, pH и т.п., представляют собой условия, которые ранее использовали для выбранных для экспрессии клеток-хозяев, и они будут понятны специалисту в данной области.

#### 25 (xi) Очистка антитела

[0231] При использовании рекомбинационных методов продукция антитела может осуществляться внутри клетки, в периплазматическом пространстве, или оно может непосредственно секретироваться в среду. При внутриклеточной продукции антитела в качестве первого этапа удаляют нерастворимые частицы, представляющие собой клетки или клеточные обломки, например, посредством центрифугирования или ультрафильтрации. В Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992) описан способ выделения антител, которые секретируются в периплазматическое пространство *E. coli*. Вкратце, клеточную массу размораживают в присутствии ацетата натрия (pH 3,5), ЭДТА и фенилметилсульфонилфторида (ФМСФ) в течение приблизительно 30 мин. Клеточные обломки можно удалять центрифугированием. Когда антитело секретируется в среду, супернатанты из таких экспрессирующих систем, как правило, сначала концентрируют с использованием коммерчески доступного фильтра для концентрирования белка, например, элемента для ультрафильтрации Amicon или Millipore Pellicon. На любом из вышеупомянутых этапов можно использовать ингибитор протеаз, такой как ФМСФ, для ингибирования протеолиза, а для предотвращения роста случайных микроорганизмов можно добавлять антибиотики.

[0232] Композицию антител, полученную из клеток, можно подвергать очистке, например, с использованием хроматографии с гидроксипатитом, хроматографии гидрофобного взаимодействия, гель-электрофореза, диализа и аффинной хроматографии, причем обычно аффинную хроматографию используют в качестве предпочтительного этапа очистки. Пригодность белка А в качестве аффинного лиганда зависит от вида и изоформа любого Fc-домена иммуноглобулина, что содержится в антителе. Белок А можно использовать для очистки антител, в основе которых лежат тяжелые цепи  $\gamma 1$ ,



γ2, или γ4 иммуноглобулинов человека (Lindmark *et al.*, *J. Immunol.Meth.*62:1-13 (1983)). Белок G рекомендован для всех изотипов антител мыши и для γ3 цепи иммуноглобулина человека (Guss *et al.*, *EMBO J.*5:1567-1575 (1986)). В качестве матрицы, к которой присоединен аффинный лиганд, наиболее часто используют агарозу, однако доступны и другие матрицы. Механически стабильные матрицы, такие как стекло с контролируемым размером пор или поли(стиролдивинил)бензол, обеспечивают более высокие скорости потока и более короткое время обработки, чем те, которых достигают с использованием агарозы. В случае, когда антитело содержит домен C<sub>H</sub>3, для очистки пригодна смола ABX<sup>TM</sup> (J.T.Baker, Phillipsburg, N.J.). Также в зависимости от антитела, подлежащего выделению, пригодны другие способы очистки белка, такие как фракционирование на ионообменной колонке, осаждение этанолом, обращенно-фазовая ВЭЖХ, хроматография на диоксиде кремния, хроматография на SEPHAROSE<sup>TM</sup> с гепарином, хроматография на анионной или катионной обменной смоле (как, например, колонка с полиаспарагиновой кислотой), хроматофокусирование, ДСН-ПААГ и осаждение сульфатом аммония.

[0233] В целом, в данной области хорошо известны различные методики получения антител для применения в научных исследованиях, испытаниях и клинической практике, которые согласуются с описанными выше методиками и/или методиками, которые специалист в данной области сочтет пригодными для получения конкретного представляющего интерес антитела.

#### В. Отбор биологически активных антител

[0234] Антитела, полученные как описано выше, могут быть подвергнуты одному или более анализам «биологической активности» для отбора антитела с полезными свойствами с терапевтической точки зрения. Можно провести скрининг антител в отношении их способности связывать антиген, на нейтрализацию которого направлено их действие. Например, антигенсвязывающие свойства антитела к VEGF могут быть оценены в анализе, с помощью которого определяют его способность связываться с VEGF. В другом примере, для антитела к CD20, антигенсвязывающие свойства антитела могут быть оценены в анализе, с помощью которого определяют его способность связываться с CD20.

[0235] В другом варианте реализации изобретения аффинность антитела может быть установлена с помощью насыщающего связывания; ИФА; и/или анализов конкурентного связывания (например, РИА).

[0236] Кроме того, данное антитело может быть подвергнуто другим анализам биологического действия, например, с целью оценки его эффективности в качестве терапевтического средства. Такие анализы известны в данной области и зависят от антигена-мишени и предполагаемого использования для данного антитела.

[0237] Для скрининга антител, которые связываются с определенным эпитопом на представляющем интерес антигене (например, те, что блокируют связывание антитела к VEGF с VEGF), может быть проведен стандартный анализ на перекрестное блокирование, как, например, анализ, описанный в руководстве *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988). В альтернативном варианте можно проводить картирование эпитопа, например, как описано в Champe *et al.*, *J. Biol.Chem.*270:1388-1394 (1995), для определения наличия связывания антитела с представляющим интерес эпитопом.

[0238] Термин «экспрессия антигена CD20» предназначен для обозначения значительного уровня экспрессии антигена CD20 в клетке, предпочтительно на клеточной поверхности Т- или В-клетки, более предпочтительно В-клетки из опухоли

или злокачественной опухоли, соответственно, предпочтительно несолидной опухоли. Наличие «злокачественной опухоли, клетки которой экспрессируют CD20» у пациентов можно определить посредством стандартных анализов, известных в данной области. Например, экспрессию антигена CD20 оценивают иммуногистохимическими (ИГХ)

5 методами, FACS или определением соответствующей мРНК методом ПЦР.

#### С. Получение составов

[0239] После получения, представляющего интерес антитела (например, методы получения антител, которые могут быть включены в препарат, как описано в настоящем документе, будут подробно описаны ниже и известны в данной области), получают

10 состоящий из него фармацевтический состав. В определенных вариантах реализации изобретения антитело, включаемое в препарат, предварительно не подвергают лиофилизации, а представляющий интерес состав, описанный в данном документе, представляет собой водный состав. В определенных вариантах реализации изобретения антитело представляет собой полноразмерное антитело. В одном варианте реализации

15 изобретения входящее в состав антитело представляет собой фрагмент антитела, такой как  $F(ab')_2$ , в случае чего, возможно, понадобится решение проблем, которые не возникают в случае полноразмерного антитела (как, например, усечение антитела до размеров Fab). Терапевтически эффективное количество антитела, содержащегося в составе, определяют с учетом необходимого объема дозы и, например, способ(ы)

20 введения. Иллюстративная концентрация антитела в составе составляет от около 25 мг/мл до около 100 мг/мл, от около 30 мг/мл до около 100 мг/мл или от около 45 мг/мл до около 55 мг/мл.

[0240] Водный состав, содержащий антитело, получают в растворе с pH буферного раствора. Буфер по настоящему изобретению имеет pH в диапазоне от около 5,5 до

25 около 7,0. В определенных вариантах реализации изобретения pH находится в диапазоне от 5,5 до 6,5, находится в диапазоне от pH 5,7 до 6,8, находится в диапазоне от pH 5,8 до 6,5, находится в диапазоне от pH 5,9 до 6,5, находится в диапазоне от pH 6,0 до 6,5 или находится в диапазоне от pH 6,2 до 6,5. В определенных вариантах реализации изобретения состав имеет pH 6,2 или около 6,2. В определенных вариантах реализации

30 изобретения состав имеет pH 6,0 или около 6,0. Примеры буферов, которые можно использовать для контроля pH в этом диапазоне включают фосфат натрия и гистидин (как, например, L-гистидин). Используемые в данном документе ссылки на «гистидин» в отношении состава или буфера могут относиться к любой форме гистидина, известной в данной области, включая, в том числе гистидин-HCl или хлорид гистидина, ацетат

35 гистидина, фосфат гистидина, сульфат гистидина и тому подобное.

[0241] В некоторых вариантах реализации изобретения буфер содержит фосфат (например, фосфат натрия) в концентрации от более 35 mM до меньше, чем или равно

около 100 mM. В некоторых вариантах реализации изобретения буфер содержит фосфат (например, фосфат натрия) в концентрации от около 15 mM до около 100 mM. В

40 определенных вариантах реализации изобретения буфер содержит фосфат натрия в концентрации около 15 mM, около 20 mM, около 22 mM, около 25 mM, около 28 mM, около 30 mM, около 35 mM, около 36 mM, около 40 mM, около 45 mM, около 50 mM, около 51 mM, около 55 mM, около 60 mM, около 65 mM, около 70 mM, около 75 mM, около 80 mM, около 85 mM, около 90 mM, около 95 mM или около 100 mM. В некоторых

45 вариантах реализации изобретения буфер содержит фосфат натрия в концентрации, которая меньше, чем почти любая из следующих концентраций: 100 mM, 95 mM, 90 mM, 85 mM, 80 mM, 75 mM, 70 mM, 65 mM, 60 mM, 55 mM, 51 mM, 50 mM, 45 mM, 40 mM, 36 mM, 35 mM, 30 mM, 28 mM, 25 mM, 22 mM или 20 mM. В некоторых вариантах реализации

изобретения буфер содержит фосфат натрия в концентрации, которая больше, чем почти любая из следующих концентраций: 15 мМ, 20 мМ, 22 мМ, 25 мМ, 28 мМ, 30 мМ, 35 мМ, 36 мМ, 40 мМ, 45 мМ, 50 мМ, 51 мМ, 55 мМ, 60 мМ, 65 мМ, 70 мМ, 75 мМ, 80 мМ, 85 мМ, 90 мМ или 95 мМ. Т. е., концентрация фосфата натрия в составе может  
 5 быть любой из целого ряда концентраций, имеющих верхний предел около 100 мМ, 95 мМ, 90 мМ, 85 мМ, 80 мМ, 75 мМ, 70 мМ, 65 мМ, 60 мМ, 55 мМ, 51 мМ, 50 мМ, 45 мМ, 40 мМ, 36 мМ, 35 мМ, 30 мМ, 28 мМ, 25 мМ, 22 мМ или 20 мМ, и независимо выбранный нижний предел около 15 мМ, 20 мМ, 22 мМ, 25 мМ, 28 мМ, 30 мМ, 35 мМ, 36 мМ, 40 мМ, 45 мМ, 50 мМ, 51 мМ, 55 мМ, 60 мМ, 65 мМ, 70 мМ, 75 мМ, 80 мМ, 85 мМ, 90 мМ  
 10 или 95 мМ, причем нижний предел меньше верхнего предела.

[0242] В определенных вариантах реализации изобретения буфер содержит гистидин в концентрации от около 40 мМ до около 100 мМ. В определенных вариантах реализации изобретения буфер содержит гистидин в концентрации от около 15 мМ до около 100 мМ. В определенных вариантах реализации изобретения буфер содержит гистидин в  
 15 концентрации около 15 мМ, около 20 мМ, около 22 мМ, около 25 мМ, около 28 мМ, около 30 мМ, около 35 мМ, около 36 мМ, около 40 мМ, около 45 мМ, около 50 мМ, около 51 мМ, около 55 мМ, около 60 мМ, около 65 мМ, около 70 мМ, около 75 мМ, около 80 мМ, около 85 мМ, около 90 мМ, около 95 мМ или около 100 мМ. В некоторых вариантах реализации изобретения буфер содержит гистидин в концентрации, которая  
 20 меньше, чем почти любая из следующих концентраций: 100 мМ, 95 мМ, 90 мМ, 85 мМ, 80 мМ, 75 мМ, 70 мМ, 65 мМ, 60 мМ, 55 мМ, 51 мМ, 50 мМ, 45 мМ, 40 мМ, 36 мМ, 35 мМ, 30 мМ, 28 мМ, 25 мМ, 22 мМ или 20 мМ. В некоторых вариантах реализации изобретения буфер содержит гистидин в концентрации, которая больше, чем почти любая из следующих концентраций: 15 мМ, 20 мМ, 22 мМ, 25 мМ, 28 мМ, 30 мМ, 35  
 25 мМ, 36 мМ, 40 мМ, 45 мМ, 50 мМ, 51 мМ, 55 мМ, 60 мМ, 65 мМ, 70 мМ, 75 мМ, 80 мМ, 85 мМ, 90 мМ или 95 мМ. Т. е., концентрация гистидина в буфере может быть любой из целого ряда концентраций, имеющих верхний предел около 100 мМ, 95 мМ, 90 мМ, 85 мМ, 80 мМ, 75 мМ, 70 мМ, 65 мМ, 60 мМ, 55 мМ, 51 мМ, 50 мМ, 45 мМ, 40 мМ, 36 мМ, 35 мМ, 30 мМ, 28 мМ, 25 мМ, 22 мМ или 20 мМ, и независимо выбранный нижний  
 30 предел около 15 мМ, 20 мМ, 22 мМ, 25 мМ, 28 мМ, 30 мМ, 35 мМ, 36 мМ, 40 мМ, 45 мМ, 50 мМ, 51 мМ, 55 мМ, 60 мМ, 65 мМ, 70 мМ, 75 мМ, 80 мМ, 85 мМ, 90 мМ или 95 мМ, причем нижний предел меньше верхнего предела.

[0243] Состав дополнительно содержит трегалозу в количестве от около 45 мМ до около 634 мМ, от около 50 мМ до около 600 мМ или от около 150 мМ до около 400  
 35 мМ. В некоторых вариантах реализации изобретения трегалоза содержится в составе в количестве от около 45 мМ до около 600 мМ, от около 45 мМ до около 550 мМ, от около 45 мМ до около 500 мМ, от около 45 мМ до около 450 мМ, от около 45 мМ до около 400 мМ, от около 45 мМ до около 350 мМ, от около 45 мМ до около 300 мМ, от около 45 мМ до около 250 мМ, от около 45 мМ до около 200 мМ, от около 45 мМ  
 40 до около 180 мМ, от около 45 мМ до около 150 мМ, от около 45 мМ до около 140 мМ, от около 45 мМ до около 135 мМ, от около 45 мМ до около 130 мМ, от около 45 мМ до около 120 мМ, от около 45 мМ до около 110 мМ, от около 45 мМ до около 100 мМ, от около 180 мМ до около 634 мМ, от около 50 мМ до около 600 мМ или от около 150 мМ до около 400 мМ. В некоторых вариантах реализации изобретения трегалоза  
 45 содержится в составе в количестве около 45 мМ, около 50 мМ, около 60 мМ, около 70 мМ, около 80 мМ, около 90 мМ, около 100 мМ, около 110 мМ, около 120 мМ, около 130 мМ, около 135 мМ, около 140 мМ, около 150 мМ, около 180 мМ, около 200 мМ, около 250 мМ, около 300 мМ, около 350 мМ, около 400 мМ, около 450 мМ, около 500

мМ, около 550 мМ, около 600 мМ, около 610 мМ, около 620 мМ, около 630 мМ или около 634 мМ. В некоторых вариантах реализации изобретения состав содержит трегалозу в концентрации, которая меньше, чем почти любая из следующих концентраций: 634 мМ, 630 мМ, 620 мМ, 610 мМ, 600 мМ, 550 мМ, 500 мМ, 450 мМ, 400 мМ, 350 мМ, 300 мМ, 250 мМ, 200 мМ, 180 мМ, 150 мМ, 140 мМ, 135 мМ, 130 мМ, 120 мМ, 110 мМ, 100 мМ, 90 мМ, 80 мМ, 70 мМ, 60 мМ, или 50 мМ. В некоторых вариантах реализации изобретения состав содержит трегалозу в концентрации, которая больше, чем почти любая из следующих концентраций: 45 мМ, 50 мМ, 60 мМ, 70 мМ, 80 мМ, 90 мМ, 100 мМ, 110 мМ, 120 мМ, 130 мМ, 135 мМ, 140 мМ, 150 мМ, 180 мМ, 200 мМ, 250 мМ, 300 мМ, 350 мМ, 400 мМ, 450 мМ, 500 мМ, 550 мМ, 600 мМ, 610 мМ, 620 мМ или 630 мМ. Т. е., концентрация трегалозы в составе может быть любой из целого ряда концентраций, имеющих верхний предел около 634 мМ, 630 мМ, 620 мМ, 610 мМ, 600 мМ, 550 мМ, 500 мМ, 450 мМ, 400 мМ, 350 мМ, 300 мМ, 250 мМ, 200 мМ, 180 мМ, 150 мМ, 140 мМ, 135 мМ, 130 мМ, 120 мМ, 110 мМ, 100 мМ, 90 мМ, 80 мМ, 70 мМ, 60 мМ или 50 мМ, и независимо выбранный нижний предел около 45 мМ, 50 мМ, 60 мМ, 70 мМ, 80 мМ, 90 мМ, 100 мМ, 110 мМ, 120 мМ, 130 мМ, 135 мМ, 140 мМ, 150 мМ, 180 мМ, 200 мМ, 250 мМ, 300 мМ, 350 мМ, 400 мМ, 450 мМ, 500 мМ, 550 мМ, 600 мМ, 610 мМ, 620 мМ или 630 мМ, причем нижний предел меньше верхнего предела.

[0244] В некоторых вариантах реализации изобретения массовое соотношение моноклонального антитела и трегалозы в составе больше, чем или равно 0,41 и меньше, чем 1,65. В некоторых вариантах реализации изобретения массовое соотношение моноклонального антитела и трегалозы в составе составляет от 0,41 до 0,73. В некоторых вариантах реализации изобретения массовое соотношение моноклонального антитела и трегалозы составляет от 0,73 до 1,47. В некоторых вариантах реализации изобретения массовое соотношение моноклонального антитела и трегалозы составляет от 0,49 до 1,47. В некоторых вариантах реализации изобретения используется любое массовое соотношение моноклонального антитела и трегалозы из 0,41, 0,45, 0,50, 0,55, 0,60, 0,65, 0,70, 0,75, 0,80, 0,85, 0,90, 0,95, 1,00, 1,05, 1,10, 1,15, 1,20, 1,25, 1,30, 1,35, 1,40, 1,45, 1,50, 1,55, 1,60 и 1,64, в том числе все промежуточные значения. В данном контексте масса трегалозы в составе для расчета массового соотношения антитела и трегалозы рассчитывается исходя из количества дигидрата трегалозы (MW 378.33). При использовании других форм трегалозы (например, ангидрида трегалозы) массу трегалозы в составе необходимо пересчитать на массу дигидрата трегалозы с той же молярной концентрацией.

[0245] В некоторых вариантах реализации изобретения трегалоза может быть замещена многоатомным спиртом, отличным от трегалозы. Например, трегалоза может быть замещена сахарозой, маннитом, лактозой, глицерином и/или пропиленгликолем. Таким образом, при любой ссылке на трегалозу в составе на основе антител, описанном в данном документе, указанная трегалоза опционально может быть замещена многоатомным спиртом, отличным от трегалозы (например, тем, что перечислен выше).

[0246] В состав на основе антител опционально может быть добавлено поверхностно-активное вещество. Типичные поверхностно-активные вещества включают неионогенные поверхностно-активные вещества (например, полисорбаты 20, 80 и т.д.) или полуксамеры (например, полуксамер 188 и т.д.). Количество добавляемого поверхностно-активного вещества служит для уменьшения агрегации готового антитела и/или минимизации образования частиц в составе и/или уменьшения адсорбции. Например, поверхностно-активное вещество может содержаться в составе в количестве от около 0,001% до около 0,5%, от около 0,005% до около 0,2%, от около 0,01% до

около 0,1% или от около 0,02% до около 0,06%, или от около 0,03% до около 0,05%. В определенных вариантах реализации изобретения поверхностно-активное вещество содержится в составе в количестве 0,04% или около 0,04%. В определенных вариантах реализации изобретения поверхностно-активное вещество содержится в составе в  
 5 количестве 0,02% или около 0,02%. В одном варианте реализации изобретения в составе не содержится никакое поверхностно-активное вещество.

[0247] В одном варианте реализации изобретения состав содержит обозначенные выше средства (например, антитело, буфер, трегалозу и/или поверхностно-активное вещество) и по существу не содержит одного или более консервантов, таких как  
 10 бензиловый спирт, фенол, m-крезол, хлорбутанол и бензетоний хлорид. В другом варианте реализации изобретения в состав может быть включен консервант, в частности, если состав представляет собой состава для многократного применения. Концентрация консерванта может находиться в диапазоне от около 0,1% до около 2%, предпочтительно от около 0,5% до около 1%. Один или более других фармацевтически приемлемых  
 15 носителей, вспомогательных веществ или стабилизирующих веществ, как, например, тех, что описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980), могут быть включены в состав, при условии, что они не оказывают негативного воздействия на свойства состава. Приемлемые носители, вспомогательные вещества или стабилизирующие вещества нетоксичны для реципиентов в используемых дозировках  
 20 и концентрациях и включают дополнительные буферные вещества; сорастворители; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; хелаторы, такие как ЭДТК; комплексы металлов (например, комплексы Zn-белок); биodeградируемые полимеры, как, например, полиэстеры; и/или солеобразующие противоионы. Типичные фармацевтически приемлемые носители, описанные в данном документе, дополнительно  
 25 включают средства для диспергирования лекарственных средств в межклеточном пространстве, такие как растворимые активные в нейтральных условиях гликопротеины с гиалуронидазной активностью (sHASEGP), например, растворимые гликопротеины PH-20 человека с гиалуронидазной активностью, такие как rHuPH20 (HYLENEX<sup>®</sup>, Baxter International, Inc.). Некоторые типичные sHASEGP и способы их применения, в том числе  
 30 rHuPH20, описаны в патентных публикациях США № 2005/0260186 и 2006/0104968. В одном из аспектов sHASEGP объединяют с одним или более дополнительными гликозаминогликанами, таким как хондроитиназами.

[0248] Несмотря на то, что описание хелаторов в данном документе ограничено ЭДТА, следует иметь в виду, что другие хелаторы ионов металлов также охвачены  
 35 рамками настоящего изобретения. Хелаторы ионов металлов хорошо известны специалистам в данной области и необязательно ограничиваются аминокполикарбоксилатами, ЭДТК (этилендиаминтетрауксусная кислота), ЭГТК (этиленгликоль-бис-(бета-аминоэтиловый эфир)-N,N',N'-тетрауксусная кислота), НТК (нитрилотриуксусная кислота), ЭДДС (этилендиаминдисукцинат), ПДТК (1,3-  
 40 пропилендиаминтетрауксусная кислота), ДТПК (диэтилентриаминпентауксусная кислота), АДК (бета-аланиндиуксусная кислота), МГДК (метилглициндиуксусная кислота) и т.д. В дополнение к этому, некоторые варианты реализации изобретения, описанные в данном документе, включают хелаторы фосфонатов/фосфоновой кислот.

[0249] Состав, описанный в данном документе, также может содержать несколько  
 45 белков, необходимых для лечения определенного заболевания, предпочтительно таких, которые обладают вспомогательным действием, что не оказывает негативного влияния на другой белок. Например, если в качестве антитела используют антитело к VEGF, его можно быть объединить с другим средством (например, химиотерапевтическим

средством и противоопухолевым средством).

[0250] В некоторых вариантах реализации изобретения оценивают или измеряют физическую стабильность, химическую стабильность или биологическую активность антитела в составе. Для оценки стабильности и биологической активности можно использовать любые известные способы. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело в составе является стабильным при  $-20^{\circ}\text{C}$  в течение по меньшей мере около 12 месяцев, по меньшей мере около 18 месяцев, по меньшей мере около 21 месяц или по меньшей мере 24 месяца (или по меньшей мере 52 недели). В некоторых вариантах реализации изобретения стабильность измеряют по образованию высокомолекулярных соединений (ВМС) в составе после хранения. В некоторых вариантах реализации изобретения процентная доля ВМС в составе меньше любого значения из около 0,8%, около 0,9 или около 1% после хранения при  $-20^{\circ}\text{C}$  в течение по меньшей мере около 6 месяцев, по меньшей мере около 12 месяцев, по меньшей мере около 18 месяцев или по меньшей мере около 24 месяцев. В некоторых вариантах реализации изобретения общее содержание агрегатов в составе меньше любого значения из около 2,5% или около 3% после хранения при  $-20^{\circ}\text{C}$  в течение по меньшей мере около 6 месяцев, по меньшей мере около 12 месяцев, по меньшей мере около 18 месяцев или по меньшей мере около 24 месяцев.

[0251] Составы, используемые для введения *in vivo*, должны быть стерильными. Это легко осуществимо путем фильтрации через стерильные фильтрационные мембраны до или после получения состава.

### III. Введение составов на основе антител

[0252] В некоторых вариантах реализации изобретения состав, который описаны в данном документе, предназначен для введения субъекту. Состав можно вводить млекопитающему, которое нуждается в лечении антителом, предпочтительно человеку, в соответствии с известными способами, такими как внутривенное введение в виде болюсной инъекции или путем непрерывной инфузии в течение определенного периода времени, путем внутримышечного, внутривентриального, внутриспинального, подкожного, интраокулярного, внутрисуставного, внутрисиновиального, интратекального, перорального, местного введения или ингаляции. В одном варианте реализации изобретения состав вводят млекопитающему путем внутривенного введения. Для таких целей состав можно вводить, например, с использованием шприца или через систему для внутривенного введения. В одном варианте реализации изобретения состав вводят млекопитающему путем подкожного введения.

[0253] Соответствующая дозировка («терапевтически эффективное количество») антитела будет зависеть, например, от типа заболевания, подлежащего лечению, тяжести и течения заболевания, от того, применяется антитело в профилактических либо в терапевтических целях, предшествующей терапии, истории болезни пациента и реакции на антитело, типа используемого антитела и усмотрения лечащего врача. Антитело подходит для введения пациенту однократно или в несколько приемов, и его можно вводить пациенту в любое время после постановки диагноза. Антитело можно вводить в виде монопрепарата или в сочетании с другими лекарственными препаратами или видами терапии, используемыми в лечении рассматриваемого заболевания.

[0254] В качестве общей нормы, терапевтически эффективное количество антитела для введения будет находиться в диапазоне от около 0,1 до около 50 мг/кг массы тела пациента либо в виде одного, либо более приемов, причем типичное количество антитела, которое используется в сутки, составляет, например, от около 0,3 мг/кг до около 20 мг/кг, предпочтительно от около 0,3 до около 15 мг/кг. В то же время можно

применять другие схемы приема. В одном варианте реализации изобретения в качестве антагониста используют антитело к VEGF, которое вводят в дозе около 100 или 400 мг каждые 1, 2, 3 или 4 недели или вводят в дозе около 1, 3, 5, 7.5, 10, 15 или 20 мг/кг каждые 1, 2, 3 или 4 недели. Дозу можно вводить в виде однократной дозы или в виде многократных доз (например, 2 или 3 дозы), например, в виде инфузий. Ход лечения без труда можно контролировать с помощью обычных методик.

#### IV. Изделия

[0255] В другом варианте реализации настоящего изобретения представлено изделие, содержащее емкость, которая включает в себе водный фармацевтический состав по настоящему изобретению и опционально инструкцию о его применении. Подходящие емкости включают, например, бутылки, флаконы, и шприцы. Емкость можно изготовить из различных материалов, таких как стекло или пластик. Типичная емкость представляет собой одноразовый стеклянный флакон вместимостью 3-20 мл. В альтернативном варианте для состава для многократного применения емкость может представлять собой стеклянный флакон вместимостью 3-100 мл. Емкость включает в себя состав, и вкладыш на емкости или прилагаемый к ней может содержать инструкции по применению. Изделие может содержать другие материалы, желательные с коммерческой и пользовательской точки зрения, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы, шприцы, вкладыши в упаковку и инструкции по применению.

[0256] Предполагается, что данного описания достаточно для предоставления специалистам в данной области возможности использовать настоящее изобретение на практике. Различные модификации данного изобретения в дополнение к показанным и раскрытым в данном документе станут очевидными специалистам в данной области из вышеизложенного описания и подпадают в объем охраны прилагаемой формулы изобретения. Все публикации, патенты и заявки на патенты, цитируемые в данном документе, целиком и в полном объеме включены в данный документ посредством ссылки.

#### ПРИМЕРЫ

[0257] Данное изобретение станет более понятным со ссылкой на следующие примеры. Тем не менее, их не следует рассматривать как ограничивающие объем данного изобретения. Предполагается, что примеры и варианты реализации, описанные в данном документе, приведены только с иллюстративными целями и, что различные модификации или изменения в соответствующем свете будут предложены специалистам в данной области и должны быть включены в пределах сути и области применения этой заявки и объема охраны прилагаемой формулы изобретения.

**Пример 1: Влияние растворимости вспомогательных веществ на стабильность мАт в замороженных составах, содержащих трегалозу.**

[0258] Целью исследований было оценить влияние скорости замораживания, температуры хранения и композиции состава на распределение фаз трегалозы и стабильность белков в замороженных растворах. Помимо выявления распределения фаз при кристаллизации трегалозы в замороженных растворах, результаты этого исследования могут найти различное применение на практике. Предположительно эффективность трегалозы в качестве стабилизатора белков зависит от фазового распределения трегалозы в растворе. Следовательно, понимание фазового распределения трегалозы, которое обусловлено разными композициями, скоростями замораживания и температурами хранения, дает представление о разработке составов и процессов замораживания повышенной надежности.

Материалы и способы

*Материалы и приготовление образцов*

[0259] Три полноразмерных моноклональных антитела IgG1 (mAb1, бевацизумаб и mAb3) с приблизительной молекулярной массой 145 килодальтон клонировали, экспрессировали в линиях клеток яичника китайского хомячка и подвергали очистке.

5 [0260] В случае исследований температуры хранения и скоростей замораживания был получен препарат mAb1 при 25 мг/мл в 2,1% (масс./об.) трегалозы, 5 мМ гистидина-гидрохлорида при pH 6,0 с 0,01% полисорбата 20 (масс./об.) и воды для инъекций, USP; был получен препарат бевацизумаба при 25 мг/мл в 5,4% (масс./об.) трегалозы, 51 мМ фосфата натрия при pH 6,2 с 0,04% полисорбата 20 (масс./об.) и воды для инъекций,  
10 USP; и был получен препарат mAb3 при 20 мг/мл в 8,2% (масс./об.) трегалозы, 20 мМ гистидина-ацетата при pH 6,2 с 0,02% полисорбата 20 (масс./об.) и воды для инъекций, USP.

[0261] В случае исследования растворимости вспомогательного вещества был получен препарат бевацизумаба при 25 мг/мл в 51 мМ фосфата натрия при pH 6,2 с 0,04%  
15 полисорбатом 20 (масс./об.), водой для инъекций, USP (контрольный образец) с 6,0 (масс./об.) либо сахарозы, трегалозы, либо маннита.

[0262] Для исследования получения препаратов оценивали бевацизумаб в трех концентрациях мАт (0, 25 и 100 мг/мл) в 20 мМ гидрохлориде гистидина при pH 6,0 с различными количествами трегалозы (0%, 1,7%, 3,4%, 5,1%, 6,8%, 8,6%, 10,3%, 12,0%,  
20 13,7%, 15,4%, 17,1%, 20,5%, 24,0%, 27,4%, 30,8% и 34,2% масс./об.) в присутствии или в отсутствие 0,04% полисорбата 20. Из этих 64 разных составов, а также 32 образцов растворителя, содержащих 0 мг/мл бевацизумаба, получали препарат в 96-луночных микропланшетах Greiner.

[0263] Были приготовлены дополнительные растворы с 0,0, 2,0, 4,0 и 8,0% (масс./об.)  
25 трегалозы в 20 мМ ацетате гистидина при pH 5,5 и воде для инъекций. Пятьдесят микролитров pHydration (диапазон pH: 0-7), pH-индикаторного красителя (Micro Essential Laboratory, NY) вносили в стеклянный флакон вместимостью 10 мл и давали возможность испариться. Приблизительно четыре миллилитра различных составов, содержащих трегалозу, добавляли и красителю давали возможность раствориться в растворе.  
30 Фотографии замороженных растворов трегалозы получали с использованием цифровой фотокамеры Olympus Stylus 770SW (Olympus America Inc., NJ) в режиме supermacro (супермакро).

[0264] Буферные смеси для всех образцов получали с использованием химических реагентов фармакопейного качества (USP, NP, EP) и деионизированной воды, очищенной  
35 с использованием системы для очистки воды Elga PURELAB Ultra (Целле, Германия). Образцы, использованные в исследованиях по получению препаратов, были тщательно диализированы в буферные смеси с использованием кассет для диализа Pierce Slide-A-Lyzer или микроцентрифужных пробирок Millipore (Billerica, MA) Amicon Ultra (10 кДа НОММ), и pH маточного раствора мАт проверяли для каждого диализируемого образца.  
40 После диализа, образцы концентрировали путем ультрафильтрации использованием фильтрационных устройств Amicon Ultra (10 кДа НОММ).

*Замораживание с контролируемой скоростью*

[0265] Для приготовления образцов для замораживания с низкой и нормальной скоростью два миллилитра аликвот образцов вносили в автоклавируемые стеклянные  
45 флаконы вместимостью 5 мл и герметизировали с использованием 20 мм пробок для лиофилизации в стерильных условиях в вентилируемом боксе с ламинарным потоком воздуха. Медленное замораживание осуществляли путем помещения флаконов с образцами в лиофилизатор на предварительно охлажденные полки и выдерживали



между -1 °С и -3 °С в течение 24 часов. Для контроля переохлаждения нуклеацию льда осуществляли с применением охлажденного СО<sub>2</sub> к стенке каждого флакона до образования льда и затем температуру линейно уменьшали до -40 °С в течение 144 часов со скоростью приблизительно -0,3 °С /мин.

[0266] Замораживание с нормальной скоростью осуществляли путем помещения флаконов с образцами в камеру замораживания при -20 °С до полного замораживания образцов. Для контроля переохлаждения нуклеацию льда осуществляли с применением охлажденного СО<sub>2</sub> к стенке каждого флакона до образования льда.

[0267] Быстрое замораживание осуществляли путем быстрого покапельного охлаждения аликвот образцов объемом пятьдесят микролитров в жидком азоте. Конечную точку замораживания определяли по возрастающему помутнению и опусканию сферы с поверхности в сеточную корзину для сбора образцов из нержавеющей стали. После замораживания аликвоты замороженных гранул нефасованных лекарственных веществ объемом 1 миллилитр удаляли из жидкого азота и переносили в стерильные, предварительно охлажденные стеклянные флаконы вместимостью 5 мл. Флаконы затем хранили в замороженном СО<sub>2</sub> и герметизировали 20 мм пробками для лиофилизации. Образцы для скрининга составов замораживали с высокой скоростью в 96-луночных микропланшетах с использованием жидкого азота. Непосредственно сразу после замораживания микропланшетов осуществляли нуклеацию образцов путем нанесения царапины на поверхность льда с использованием игл наружного диаметра 24 (BD, Franklin Lakes, NJ).

#### *Изотермическая выдержка*

[0268] Образцы, замороженные с использованием трех скоростей замораживания (низкая, нормальная и высокая) по описанным способам, переносили в три устройства для замораживания с заданной температурой -20 °С, -14 °С и -8 °С с колебанием температуры  $\pm 2$  °С для хранения в замороженном виде. Контроль температуры устройства для замораживания осуществляли с использованием системы контроля температуры Yokogawa (Yokogawa Meters and Instruments Corporation, Токио, Япония). Содержимое флаконов с образцами объединяли через 0, 1, 2, 3, 6, 9 и 12 месяцев хранения в замороженном виде при постоянной температуре и помещали на лабораторный стол в условиях окружающей среды (приблизительно 22 °С) и размораживали до анализа.

[0269] Микропланшеты с образцами для скрининга составов хранили при двух температурах (-20 $\pm$ 2 °С и -40 $\pm$ 2 °С). Контроль температуры устройства для замораживания осуществляли с использованием системы контроля температуры Yokogawa (Yokogawa Meters and Instruments Corporation, Токио, Япония).

[0270] Микропланшет с образцами, хранившимися при постоянной температуре в течение до 365 дней, использовали для анализа методом ЭХ. После хранения в замороженном виде микропланшеты размораживали на лабораторном столе в условиях окружающей среды (приблизительно 22 °С) до анализа. Контрольные (день 0) образцы размораживали сразу же после завершения процесса замораживания. Содержимое стеклянных микропланшетов с образцами, хранившимися при постоянной температуре в течение 365 дней, объединяли и лиофилизовали для FTIR-анализа кристаллизации трегалозы. Контрольные (день 0) образцы лиофилизовали сразу же после завершения процесса замораживания.

#### *Ллиофилизация*

[0271] Образцы, предназначенные для определения кристаллизации трегалозы, сначала подвергали лиофилизации с использованием лиофилирующего устройства LyoStar II,

контролируемого программным обеспечением LyoManager II (FTS Systems, Stone Ridge, NY). Замороженные образцы помещали на предварительно охлажденные полки и выдерживали при  $-35^{\circ}\text{C}$  в течение 7 часов до первичной сушки. Первичную сушку проводили под давлением в системе 150 мкм рт. ст. путем линейного увеличения температуры полок до  $20^{\circ}\text{C}$  со скоростью  $0.2^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  с последующей выдержкой в течение 40 часов при  $20^{\circ}\text{C}$ . Вторичную сушку осуществляли путем линейного увеличения температуры полок до  $30^{\circ}\text{C}$  со скоростью  $0.2^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  с последующей выдержкой в течение 8 часов при  $30^{\circ}\text{C}$ . Термопары помещали в различные флаконы с образцами для контроля температуры на протяжении лиофилизации. После вторичной сушки флаконы с образцами закрывали пробками все еще в условиях вакуума для предотвращения гидратации образцов до анализа. Небольшой объем (300 микролитров) образцов для скрининга составов лиофилизировали в 96-луночных стеклянных планшетах (Zinsser, Германия) с использованием того же способа лиофилизации.

#### *Эксклюзионная хроматография*

[0272] Для измерения распределения по размеру молекул трех лекарственных веществ осуществляли ВЭЖХ (высокоэффективная эксклюзионная хроматография) с использованием колонки TosohHaas TSKgel G3000 SWxl (7,8 мм × 30 см, размер пор 250 Å, размер частиц 5 мкм) на системе Agilent 1200 HPLC system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) и эквивалентной использованием 0,2 М фосфата калия, 0,25 М хлорида калия, рН подвижной фазы раствора составляла 6,2. Скорость потока составляла 0,5 мл/мин, и время пробега составляло 30 минут. Температура камеры для образцов составляла  $5^{\circ}\text{C}$ , и масса вводимого образца составляла 100 микрограмм. Выходной сигнал с колонки контролировали с использованием детектора на диодной матрице, измеряющего поглощение при 280 нм с использованием 360 нм в качестве контрольного сигнала.

Анализ данных и интегрирование УФ-пиков затем осуществляли с использованием программного обеспечения Chromeleon (Dionex, Sunnyvale, CA) для определения процентной доли молекулярных агрегатов, мономеров и фрагментов, содержащихся в каждом образце. Образцы для скрининга составов, взятые в небольшом объеме, анализировали в 96-луночных полипропиленовых микропланшетах (GREINER INFO, CITY) с использованием описанного метода ЭХ со скоростью потока 1,0 мл/мин и временем пробега 15 минут. До анализа методом ЭХ образцы бевацизумаба разбавляли в 20 мМ гидрохлориде гистидина с рН 6,0 и выдерживали при  $30^{\circ}\text{C}$  в течение 24 часов для разделения диссоциируемых агрегатов до анализа методом ЭХ. Температура камеры для образцов составляла  $30^{\circ}\text{C}$ , и масса вводимого образца составляла 100 микрограмм.

#### *Измерение концентрации*

[0273] Поглощение каждого образца в УФ-области измеряли путем регистрации поглощения при 279 нм и 320 нм в кварцевой кювете с длиной пути 1 см на спектрофотометре Agilent 8453 с использованием программного обеспечения Chemstation (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Концентрацию по поглощению в УФ-области рассчитывали с использованием коэффициентов поглощения 1,50, 1,70 и 1,45 (мг/мл) $^{-1}$  см $^{-1}$  для mAb1, бевацизумаба и mAb3, соответственно. Из полученных значений для исследуемых образцов вычитали значения фона, полученные для соответствующих буферов.

#### *Анализ мутности*

[0274] Мутность образцов измеряли путем регистрации среднего поглощения при 340-360 нм в кварцевой кювете с длиной пути 1 см (Eckhardt, В.М., *et al.* (1991) *Pharm.Res.*8: 1360-4) на спектрофотометре HP8453 с использованием программного обеспечения Chemstation (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). В качестве фона для калибровки

прибора до анализа использовали стерильную пробу для инъекций. Анализ мутности образцов для скрининга составов осуществляли в прозрачных для УФ-лучей, 96-луночных микропланшетов с половинным объемом лунок с использованием прибора Spectramax M2 (Molecular Devices, Sunnyvale). Мутность измеряли против использованной в качестве фона стерильной воды для инъекций, и измеряли значения мутности по регистрации среднего поглощения при 340-360 нм.

#### БИК-спектроскопия с преобразованием Фурье

[0275] Процентную долю кристаллической трегалозы определяли с использованием спектроскопии диффузного отражения в ближней ИК-области спектра. Регистрация данных, калибровка и методы анализа, использованные в этом исследовании, были адаптированы с предыдущей работы, посвященной характеристике спектральных различий между полиморфами аморфной и кристаллической трегалозы (Connolly, B., *et al.* (2010) *Anal. Biochem.* 399(1):48-57). С использованием этих методов БИК-спектры образцов регистрировали при 10000-4000 см<sup>-1</sup> с использованием 32 усредненных сканов с разрешением 4 см<sup>-1</sup> на анализаторе Nicolet Antaris FT-Near IR Analyzer, оснащенный интегрирующей сферой (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Процентную долю кристаллической трегалозы рассчитывали с использованием соотношений интенсивностей нормализованных пиков спектров 4306 см<sup>-1</sup> и 4291 см<sup>-1</sup> (Connolly, B., *et al.* (2010) *Anal. Biochem.* 399(1):48-57). Анализ данных проводили с использованием линейно регрессионного анализа с помощью MATLAB (R2007a, The MathWorks, Натик, Массачусетс) (Connolly, B., *et al.* (2010) *Anal. Biochem.* 399(1):48-57). Небольшой объем (300 микролитров) образцов для скрининга составов лиофилизировали и затем в них анализировали процентную долю кристаллической трегалозы с использованием того же метода.

#### Результаты

[0276] Значительный интерес представляет понимание того, влияет ли кристаллизация трегалозы на стабильность белков в фармацевтически релевантных концентрациях ( $\leq 10\%$  масс./об.). Для оценки влияния номинальной концентрации трегалозы на кристаллизацию вспомогательных веществ готовили растворы с 0,0, 2,0, 4,0 и 8,0% (масс./об.) трегалозы в присутствии рН-индикаторного красителя для лучшей визуализации кристаллизации. Образцы замораживали с использованием номинальной скорости замораживания и хранили при -20 °С в течение 6 суток. После индуцированной нуклеации кристаллизацию трегалозы визуально наблюдали во всех замороженных растворах трегалозы **ФИГ. 1**). Визуальное исследование замороженных растворов указывает на то, что степень кристаллизации пропорционально увеличивается с номинальной концентрацией трегалозы. Например, использование при оценке наиболее высокой концентрации трегалозы (**ФИГ. 1D**: 8,0% масс./об.) приводило к существенно более выраженной кристаллизации по сравнению с растворами, которые содержали 0,0% (**ФИГ. 1A**), 2,0% (**ФИГ. 1B**) и 4,0% (**ФИГ. 1C**) трегалозы (масс./об.).

[0277] Хотя фармацевтически релевантные концентрации трегалозы ( $\leq 10\%$  масс./об.) значительно ниже предела растворимости в незамороженных растворах (**ФИГ. 2A**), на протяжении процесса замораживания происходит значительное концентрирование трегалозы и при более низких температурах растворимость трегалозы значительно ниже (Miller, D.P., *et al.* (1997) *Pharm. Res.* 14:578-90). Более высокая концентрация, начиная с комнатной температуры, определенно превышает растворимость при температуре хранения в замороженном виде. При использовании трегалозы в концентрациях, превышающих ее предел растворимости в замораживаемом концентрате, для инициации

кристаллизации понадобится только процесс нуклеации.

**Пример 2: Влияние кристаллизации вспомогательных веществ на стабильность мАт в замороженных составах, содержащих трегалозу.**

[0278] Кристаллизация углеводов на протяжении замораживания, лиофилизации и низкотемпературного хранения, как было показано, влияет на физическую стабильность белоксодержащих препаратов. Например, маннит, как было показано, кристаллизуется на протяжении лиофилизации, и это приводит к конформационным изменениям и потери активности различных белков (Sharma, V.K. and Kalonia, D.S. (2004) *AAPS PharmSciTech*.5: E10; Cavatur, R.K., *et al.* (2002) *Pharm.Res.*19:894-900); Izutsu, K., *et al.* (1994) *Chem.Pharm.Bull. (Tokyo)* 42:5-8); и Izutsu, K., *et al.* (1993) *Pharm.Res.*10:1232-7). Хотя при <40°C трегалоза более растворима, чем маннит, она значительно менее растворима, чем сахароза, которая, как правило, считается некристаллизуемым вспомогательным веществом (ФИГ. 2А).

[0279] Для оценки влияния растворимости вспомогательных веществ на стабильность белков в замороженных составах, были приготовлены растворы бевацизумаба с равными концентрациями сахарозы, трегалозы и маннита. Образцы замораживали при нормальной скорости замораживания, индуцированной нуклеации и хранили в замороженном виде при -20 °C в течение 28 суток. Данные по ЭХ демонстрируют, что после низкотемпературного хранения не наблюдалось никакого увеличения агрегации в составе, содержащем сахарозу; незначительное увеличение (~1%) агрегации наблюдалось в составе, содержащем трегалозу; и большое увеличение (~3%) наблюдалось в составе, содержащем маннит (ФИГ. 2В).

[0280] В этих результатах установлена ранговая корреляция между растворимостью вспомогательного вещества и агрегацией белков. Как и ожидалось, для углеводов с более низкой растворимостью при -20 °C характерно большее увеличение агрегации (ФИГ. 2В). В частности, представляет интерес то, что результаты указывают на то, что растворимость трегалозы при -20°C является достаточно низкой, что она может кристаллизоваться и приводить к агрегации белков в фармацевтически релевантных концентрациях (2-10% масс./об.).

**Пример 3: Влияние скорости замораживания на стабильность мАт в замороженных составах, содержащих трегалозу.**

[0281] Данные, полученные методом ЭХ для трех составов мАт, продемонстрировали, что скорость замораживания не влияет на стабильность белка (см. Таблицу 1 ниже).

**Таблица 1 - Краткая информация о фазах трегалозы через 12 месяцев хранения в замороженном состоянии**

Белок	Общее содержание трегалозы (% масс./об.)	Скорость замораживания	Δ Агрегация (%)			Кристаллизованная трегалоза (% масс./об.)			Аморфная трегалоза (% масс./об.)		
			-20°C	-14°C	-8°C	-20°C	-14°C	-8°C	-20°C	-14°C	-8°C
mAb1	2,1	Быстрая	0,1	0,6	0,2	0,2	0,1	0,2	1,8	1,9	1,9
		Нормальная	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1	0,1	2,0	2,0	2,1
		Медленная	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	2,0	2,0	2,1
Бевацизумаб	5,4	Быстрая	1,7	1,4	0,4	2,5	2,5	1,6	3,0	2,9	3,8
		Нормальная	0,1	0,0	0,1	0,3	0,3	0,3	5,1	5,1	5,2
		Медленная	0,2	0,2	0,1	0,3	0,3	0,2	5,1	5,2	5,2
mAb3	8,2	Быстрая	3,1	2,1	0,9	5,1	5,7	5,5	3,2	2,5	2,7
		Нормальная	0,0	0,0	0,1	0,1	0,5	0,2	8,1	7,7	8,0
		Медленная	0,0	0,0	0,1	0,3	0,2	0,2	7,9	8,1	8,0

[0282] В целом, наблюдалась агрегация моноклональных антител после замораживания с высокой скоростью (> 100 °C/мин) и при более низких скоростях

замораживания ( $<1$  °C/мин) агрегация отсутствовала. Отмечалось отсутствие значительной агрегации в любом из трех лекарственных веществ (mAb1, бевацизумаб и mAb3), замороженных при более низких скоростях замораживания ( $<1$  °C/мин) независимо от температуры длительного хранения (Таблица 1). Однако все образцы бевацизумаба и mAb3, замороженные при более высокой скорости замораживания ( $>100$  °C/мин) характеризовались значительным увеличением агрегации со временем (Таблица 1). Даже быстрозамороженное mAb1, использованное в качестве отрицательного контроля, характеризовалось незначительным увеличением степени агрегации на протяжении исследования (Таблица 1). В случае всех быстрозамороженных образцов более выраженная агрегация, наблюдаемая на протяжении хранения, по-видимому, происходила в течение первых шести месяцев (ФИГ. 3). Впоследствии скорость агрегации значительно уменьшается между шестью и двенадцатью месяцами - на протяжении этого периода наблюдается значительно меньше изменений, так что определяемая агрегация потенциально может объясняться вариабельностью образцов или анализа.

[0283] Безотносительно к какой-либо конкретной теории, предполагается, что высокая скорость является источником стресса для стабильности антитела. Например, при замораживании с высокой скоростью через один месяц наблюдалось изменение степени агрегации составов на основе антител, тогда как в условиях замораживания и хранения с использованием коммерчески доступных сред степень агрегации может оставаться постоянной в течение 9 месяцев и больше. Считается, что быстрое замораживание является источником стресса, в условия которого составы на основе антител подвергаются агрегации значительно быстрее, чем в условиях замораживания и хранения с использованием коммерчески доступных сред. В результате этого этот источник стресса может быть использован для оценки подверженности состава на основе антител агрегации независимо от интервала времени, на протяжении которого данный состав хранится.

[0284] Наложение полученных методом ЭХ хроматограмм образцов mAb3, замороженных с использованием трех скоростей замораживания и хранившихся при  $-20$  °C в течение 12 месяцев, демонстрирует отчетливое увеличение количества агрегированных молекул (димеров и высокомолекулярных соединений) в быстро замороженном образце mAb3 (ФИГ. 4А). В отличие от этого, в образцах, замороженных при низких и нормальных скоростях значительное увеличение процентной доли агрегатов не отмечалось, и данные тесно перекрываются в сравнении с исследуемыми контролями (ФИГ. 4А). Кроме того, в быстро замороженных образцах бевацизумаба отмечалось увеличение доли растворимых агрегатов (Таблица 1) и образование преципитатов, что было установлено с помощью анализа мутности визуального наблюдения. Ранее было показано, что эти преципитаты характеризуются белковой природой и параллельным уменьшением поглощения в УФ-области после удаления путем фильтрации с использованием ПВДФ-фильтра размером пор  $0,2$  микрометра.

[0285] Было доказано, что применение метода спектроскопии диффузного отражения в ближней ИК-области спектра в комбинации с линейной регрессионной моделью позволяет определить количество аморфной и кристаллической трегалозы в присутствии используя четкие различия в ранее охарактеризованной области спектра между  $4000$ - $4500$   $\text{cm}^{-1}$  (Connolly, B., *et al.* (2010) *Anal. Biochem.* 399(1):48-57). БИК-спектры чистых образцов трех известных фаз трегалозы проиллюстрировали ключевые спектральные различия между аморфным, кристаллическим ангидридом и кристаллическим дигидратом (ФИГ. 5). Анализ хранившихся в течение 12 месяцев образцов с помощью

БИК-спектроскопии с преобразованием Фурье продемонстрировал наличие кристаллической трегалозы в измеримом количестве в быстрозамороженных образцах для mAb1 (ФИГ. 6A3), бевацизумаб, (ФИГ. 6B3) и mAb3 (ФИГ. 6C3) (Таблица 1), отсутствие кристаллической трегалозы в измеримом количестве кристаллической трегалозы в образцах mAb1 (ФИГ. 6A1-2), бевацизумаба, (ФИГ. 6B1-2) или mAb3 (ФИГ. 6C1-2), замороженных с медленной и нормальной скоростями. Спектры быстрозамороженных образцов, полученные через двенадцать месяцев хранения в замороженном виде при различных температурах хранения, характеризуются резкими сдвигами пиков в ключевых спектральных областях, ассоциированных с дигидратом трегалозы (ФИГ. 6B3 и 6C3) и содержат от 30 до 70 процентов (от 1,6% до 5,7% масс./об.) кристаллического дигидрата трегалозы, при этом в замороженном растворе остается  $\geq 2.5\%$  (масс./об.) аморфной трегалозы.

[0286] Интересно заметить, что наблюдаемое увеличение агрегации белков было ассоциировано с увеличением кристаллизации трегалозы. Например, было установлено, что быстрозамороженные образцы mAb1, хранившиеся при  $-20^\circ\text{C}$  в течение 12 месяцев, содержали 0,2% (масс./об.) кристаллического дигидрата трегалозы и характеризовались увеличением агрегации на 0,1%, при этом было установлено, что быстрозамороженные и хранившиеся при  $-20^\circ\text{C}$  в течение 12 месяцев образцы бевацизумаба и mAb3 содержали 2,5% и 5,1% кристаллического дигидрата трегалозы и характеризовались увеличением агрегации на 1,7% и 3,1%, соответственно (Таблица 1). Ранговая корреляция и процентная доля дигидрата трегалозы с агрегацией мАт приводит к предположению, что концентрация кристаллической трегалозы влияет на стабильность белка.

[0287] В качестве контроля образцы замораживали с высокой скоростью и непосредственно анализировали с помощью ЭХ и БИК-Фурье для оценки непосредственного воздействия быстрого охлаждения и лиофилизации на образование кристаллов и агрегацию белков. Не наблюдалось никаких изменений в агрегации белков (данные не показаны). В дополнение к этому, по БИК-спектрам, полученным для набора быстро замороженных образцов  $T_0$ , была выявлена преимущественно аморфная природа сахара, содержащего менее пяти процентов кристаллического дигидрата трегалозы, что попадает в пределы обнаружения данного метода. Эти результаты демонстрируют, что непосредственное влияние на агрегацию белков и распределение фаз трегалозы после быстрого замораживания отсутствует. Следовательно, измеренное увеличение кристаллизации трегалозы и агрегации белков на протяжении этого исследования отражает изменения, которые происходят на протяжении хранения в зависимости от времени.

[0288] Результаты исследований с использованием различных скоростей замораживания дают представление о влиянии скорости замораживания как на кристаллизацию трегалозы, так и агрегацию мАт. Как обсуждалось выше, быстрое замораживание увеличивает площадь поверхности раздела жидкой фазы и кристаллов льда и приводит к образованию дополнительных сайтов нуклеации. Безотносительно к какой-либо конкретной теории, эти дополнительные сайты нуклеации, образующиеся в быстро замораживаемых образцах, как предполагается, увеличивают вероятность возникновения процесса нуклеации. В отличие от этого, большие кристаллы льда, образующиеся в образцах, замороженных при низких и нормальных скоростях замораживания, имеют меньшую площадь поверхности, что, как предполагается, уменьшает вероятность возникновения процесса нуклеации.

**Пример 4: Влияние температуры хранения на стабильность мАт в замороженных составах, содержащих трегалозу.**

[0289] Данные по агрегации, собранные в течение двенадцати месяцев, демонстрируют, что температура хранения не влияет на стабильность белка (ФИГ. 3). В целом, в образцах mAb3, которые были заморожены с высокой скоростью и хранились двенадцать месяцев при -20 °C, отмечалась более выраженная агрегация (ФИГ. 3C). Интересно заметить, что первоначальная скорость агрегации бевацизумаба и mAb3 была более высокой в быстросамороженных образцах, хранившихся при -14 °C, причем скорость агрегации уменьшалась ранее, чем скорость агрегации образцов, хранившихся при -20 °C (ФИГ. 3), что может быть обусловлено хаотичностью процесса нуклеации. Образцы, замороженные с высокой скоростью и хранившиеся при -8 °C, наиболее высокой температуре хранения, в целом, характеризовались наиболее низкой скоростью и степенью агрегации на протяжении всего исследования (ФИГ. 3). Наложение хроматограмм на ФИГ. 4B показывает наблюдаемые различия в ЭХ-профилях для быстросамороженных образцов mAb3, хранившихся при трех соответствующих температурах хранения. Быстросамороженные образцы, хранившиеся при более высоких температурах (например, -8 °C) агрегировали в меньшей степени; и наоборот, образцы бевацизумаба и mAb3, хранившиеся при более низких температурах (например, -20 °C) агрегировали в большей степени.

[0290] Зависимость агрегации белков от температуры хранения в этом исследовании дает дополнительное представление о механизме агрегации белков в замороженных растворах. Интересно заметить, что температура хранения определяет зависимость между агрегацией белков и кристаллизацией трегалозы (Таблица 1). В быстросамороженных и хранившихся при -8 °C, -14°C и -20°C образцах не было выявлено статистически значимых отличий в степени кристаллизации трегалозы, но тем не менее образцы, хранившиеся при более низкой температуре (-20 °C), агрегировали в большей степени, чем хранившиеся при более высоких температурах (-14°C и -8 °C, соответственно) (ФИГ. 3). Например, несмотря на то, что быстросамороженные образцы mAb3, хранившиеся в течение 12 месяцев, содержали 61% - 69% трегалозы, кристаллизованной при всех температурах хранения, уровень агрегации увеличивался при более отрицательных температурах хранения. Например, агрегировало 0,3%, 2,1%, и 3,1% замороженных образцов через 12 месяцев хранения при -8 °C, -14°C и -20 °C, соответственно (Таблица 1). Эта тенденция демонстрирует, что сопоставимое количество кристаллической трегалозы в двух образцах может приводить к большей агрегации белков в случае хранения при более низких температурах (-20 °C), чем при более высоких температурах (-14°C и -8 °C, соответственно).

[0291] Эти зависящие от температуры тенденции указывают на то, что молекулярная подвижность и физические свойства (т.е. морфология льда) замораживаемой среды может играть решающую роль в агрегации белков, обусловленной кристаллизацией трегалозы. Диапазон изученных температур хранения (-20 °C, -14°C и -8 °C) выше температуры стеклования для этих растворов (диапазон Tg': от -29,5 до -32 °C) и, следовательно, предполагается наличие некоторой подвижности. Все быстросамораживаемые образцы замораживают аналогичным образом, таким образом, предположительно образцы аналогичного состава характеризуются аналогичной морфологией льда и распределением растворенных веществ непосредственно после замораживания. Однако после замораживания температура хранения определяет концентрацию растворенных веществ в течение продолжительного времени и скорости диффузии трегалозы и белковых молекул в замороженном концентрате. Из-за различия в размерах между трегалозой (342 Да) и IgG1 ( $\geq 145000$  Да), можно предположить, что молекулы трегалозы диффундируют намного быстрее через замороженный концентрат,

чем большие глобулярные белки. В дополнительных исследованиях продемонстрировано, что кристаллизация трегалозы достигает плато в течение 2 недель низкотемпературного хранения (данные не показаны). Поскольку кристаллизация трегалозы происходит рано, и данные показывают кинетику агрегации со временем при различных температурах хранения, это может указывать на то, что молекулярная подвижность определяет скорость и степень перераспределения замороженной среды и тем самым определяет скорость и степень агрегации моноклональных антител IgG1. После быстрого замораживания образцы mAb3, хранившиеся при -14 °С, начинают рано агрегировать, но достигают плато через 3-6 месяцев, тогда как образцы, хранившиеся при -20 °С, начинают агрегировать вскоре после этого, но продолжают агрегировать в зависимости от времени и достигают плато через 6-12 месяцев (ФИГ. 3С). Предположительно, что образцы при более высоких температурах (-14°С и -8 °С) обладают большей молекулярной подвижностью, таким образом, белки изначально диффундируют вместе и образуют агрегаты. Однако по мере перераспределения разделенных на фазы компонентов раствора (т.е. трегалозы), происходит стабилизация белков путем взаимодействий с колоколизированными молекулами аморфной трегалозы.

**Пример 5: Влияние композиции составов на стабильность мАт в замороженных составах, содержащих трегалозу**

[0292] Для определения влияния композиции составов на кристаллизацию трегалозы и агрегацию мАт на протяжении низкотемпературного хранения, оценивали бевацизумаб при использовании диапазона концентраций трегалозы (диапазон концентраций [трегалозы]: от 0 до 34,2% (масс./об.) и диапазона концентраций бевацизумаб (диапазона концентраций [бевацизумаба]: 0, 25 и 100 мг/мл). Образцы замораживали с высокой скоростью и хранили в течение 12 месяцев при температуре выше (-20 °С) и ниже (-40 °С) температуры стеклования и анализировали в них кристаллизацию трегалозы и агрегацию белков с использованием БИК-спектроскопии с преобразованием Фурье и ЭХ, соответственно.

[0293] Результаты этого исследования продемонстрировали, что после быстрого замораживания происходит кристаллизация трегалозы в замороженных растворах, хранимых при -20 °С в течение 12 месяцев (ФИГ. 7). Однако кристаллизация трегалозы и агрегация мАт не наблюдалась в замороженных растворах, хранимых при -40 °С в течение 12 месяцев. Непосредственно сразу после быстрого замораживания и нанесения царапины наблюдалась незначительное количество кристаллической трегалозы (<10% масс./об.). Однако через 12 месяцев низкотемпературного хранения при -20 °С наблюдалось значительное увеличение кристаллизации трегалоза (ФИГ. 7А-С).

[0294] В целом, результаты демонстрируют, что увеличение концентрации трегалозы приводит к более высокой процентной доле кристаллической трегалозы. Например, процентная доля кристаллической трегалозы увеличивалась от 47% до 86% ([бевацизумаб]=0 мг/мл), от 22% до 61% ([бевацизумаб]=25 мг/мл) и от 10% до 47% ([бевацизумаб]=100 мг/мл) по мере увеличения концентрации трегалозы от 1,7% до 34,2% (масс./об.) (ФИГ. 7). Аналогичным образом агрегация бевацизумаба также увеличивалась через 12 месяцев низкотемпературного хранения при -20°С (ФИГ. 7D-E). В целом, результаты показывают, что существует определенный диапазон концентраций трегалозы, который способствует стабилизации растворов бевацизумаба на протяжении продолжительного хранения. В альтернативном варианте, соотношения трегалозы и мАт выше оптимального диапазона приводит к кристаллизации трегалозы и агрегации белков (ФИГ. 7D-E). При соотношении трегалозы и мАт ниже оптимального диапазона наблюдается увеличение агрегации белков, но отсутствует кристаллизация трегалозы-



предположительно вследствие другого механизма (например, недостаточное количество криопротектора).

[0295] Полученные данные указывают на то, что образование кристаллической трегалозы зависит от концентрации как белка, так и трегалозы. Интересно заметить, что использование более высокой концентрации бевацизумаба приводит к образованию более низких количеств кристаллической трегалозы. Например, при фиксированной концентрации трегалозы (1,7% масс./об.) увеличение концентрации бевацизумаба от 0 мг/мл до 100 мг/мл приводит к уменьшению процента кристаллической трегалозы от 53% до 9%.

[0296] На **ФИГ. 8** продемонстрирована важность влияния соотношения трегалозы и мАт на кристаллизацию трегалозы (**ФИГ. 8А**) и агрегацию бевацизумаба (**ФИГ. 8В**). Как показано на **ФИГ. 8А** и **В**, анализ физической стабильности бевацизумаба продемонстрировал, что для стабилизации растворов бевацизумаба на протяжении продолжительного замораживания требуется достаточное соотношение трегалозы и мАт ( $\geq 0,2:1$  масс./масс.); однако избыточное соотношение трегалозы и мАт ( $\geq 2,4:1$  масс./масс.) приводит к образованию кристаллического дигидрата трегалозы в больших количествах и значительному увеличению агрегации бевацизумаба. Предположительно, что увеличение соотношения трегалозы и мАт приводит к перенасыщению трегалозой замораживаемых растворов и приводит к кристаллизации трегалозы и агрегации мат. Эти результаты позволяют установить оптимальный диапазон соотношения трегалозы и мАт ( $>0,2:1$  и  $<2,4:1$  масс./масс.), что требуется для стабилизации составов, содержащих бевацизумаб, с помощью трегалозы на протяжении продолжительного низкотемпературного хранения.

[0297] Эти результаты позволяют установить оптимальный диапазон соотношения трегалозы и мАт ( $>0,417:1$  и  $<5,0:1$  масс./масс.), что требуется для стабилизации составов, содержащих бевацизумаб, с помощью трегалозы на протяжении продолжительного низкотемпературного хранения. Например, как проиллюстрировано на **ФИГ. 7D**, при использовании 25 мг/мл бевацизумаба, диапазонов соотношения трегалозы и мАт между 0,49 и 1,47, наблюдалась незначительная агрегация белков и низкая вариация образцов. В качестве другого примера, как показано на **ФИГ. 7Е**, при использовании 100 мг/мл бевацизумаба, диапазонов соотношения трегалозы и мАт между 0,41 и 1,47, наблюдалась незначительная агрегация белков и низкая вариация образцов.

[0298] Интересно заметить, что полисорбат не влиял на стабильность белков или фазовое распределение трегалозы ни в каком из замороженных составов, содержащих бевацизумаб. В случае образцов с аналогичными составами добавление полисорбата (0,04% масс./об.) не приводило к каким-либо измеримым изменениям в кристаллизации трегалозы и агрегации белков.

[0299] Результаты по изучению композиции составов свидетельствуют о том, что увеличение концентрации белков приводит к уменьшению частоты и степени кристаллизации трегалозы в замороженных образцах. Эти результаты демонстрируют, что чрезмерно высокие соотношения трегалозы и мАт ( $\geq 2,4$  масс./масс.) приводят к кристаллизации трегалозы и агрегации белков, но чрезмерно низкие соотношения трегалозы и мАт ( $\leq 0,2$  масс./масс.) не оказывают достаточное крио защитное действие на бевацизумаб в концентрациях до 100 мг/мл. Эти результаты позволяют установить оптимальный диапазон соотношения трегалозы и бевацизумаба (масс./масс.), 0,2-2,4, что способно обеспечивать стабилизацию составов на протяжении продолжительного низкотемпературного хранения - даже в случае быстрозамороженных ( $>100^\circ\text{C}/\text{мин}$ ) составов. Другими словами, эти результаты позволяют установить оптимальный

диапазон соотношения бевацизумаба и трегалозы ( $>0,417:1$  и  $<5,0:1$  масс./масс.), что требуется для стабилизации составов, содержащих бевацизумаб, с помощью трегалозы на протяжении продолжительного низкотемпературного хранения.

[0300] Все патенты, патентные заявки, документы и статьи, процитированные здесь, включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

#### (57) Формула изобретения

1. Стабильный водный фармацевтический состав, содержащий моноклональное антитело, трегалозу и буфер,

10 где массовое соотношение указанного моноклонального антитела и указанной трегалозы в составе больше или равно 0,49 и меньше или равно 1,47,

где рН состава составляет от 5,5 до 7,0,

где состав хранят при  $-20^{\circ}\text{C}$  или  $-40^{\circ}\text{C}$  по меньшей мере 6 месяцев и

где моноклональное антитело связывается с VEGF.

15 2. Состав по п.1, где массовое соотношение указанного моноклонального антитела и указанной трегалозы составляет от 0,49 до 0,73.

3. Состав по п.1, где массовое соотношение указанного моноклонального антитела и указанной трегалозы составляет от 0,73 до 1,47.

4. Состав по любому из пп.1-3, где указанное моноклональное антитело в составе составляет от 25 мг/мл до 100 мг/мл.

20 5. Состав по п.4, где указанное моноклональное антитело в составе составляет от 35 мг/мл до 75 мг/мл.

6. Состав по п.5, где указанное моноклональное антитело в составе составляет от 45 мг/мл до 55 мг/мл.

25 7. Состав по любому из пп.1-6, где указанная трегалоза в составе составляет от 45 мМ до 634 мМ, от 50 мМ до 600 мМ или от 150 мМ до 400 мМ.

8. Состав по п.7, где указанная трегалоза в составе составляет от 45 мМ до 135 мМ.

9. Состав по п.7, где указанная трегалоза в составе составляет от 180 мМ до 634 мМ.

30 10. Состав по любому из пп.1-9, где указанный буфер содержится в количестве от 35 мМ до 100 мМ.

11. Состав по п.10, где указанный буфер содержит гистидин.

12. Состав по п.10, где указанный буфер содержит фосфат натрия.

13. Стабильный водный фармацевтический состав, содержащий:

(а) моноклональное антитело в количестве от 25 мг/мл до 100 мг/мл;

35 (b) трегалозу в количестве от 45 мМ до 634 мМ и

(с) фосфат натрия в количестве от 35 мМ до 100 мМ,

где рН указанного состава составляет от 5,5 до 7,0,

где массовое соотношение указанного моноклонального антитела и указанной трегалозы в составе больше или равно 0,49 и меньше или равно 1,47,

40 где состав хранят при  $-20^{\circ}\text{C}$  или  $-40^{\circ}\text{C}$  по меньшей мере 6 месяцев и где моноклональное антитело связывается с VEGF.

14. Состав по п.13, где массовое соотношение указанного моноклонального антитела и указанной трегалозы в составе составляет от 0,49 до 0,73.

45 15. Состав по п.13, где массовое соотношение указанного моноклонального антитела и указанной трегалозы в составе составляет от 0,73 до 1,47.

16. Состав по любому из пп.13-15, где указанное моноклональное антитело содержится в количестве от 35 мг/мл до 85 мг/мл.

17. Состав по любому из пп.13-15, где указанное моноклональное антитело

содержится в количестве от 45 мг/мл до 55 мг/мл.

18. Состав по любому из пп.13-15, где указанное моноклональное антитело содержится в количестве 50 мг/мл.

19. Состав по любому из пп.13-18, где указанная трегалоза содержится в количестве  
5 от 45 мМ до 135 мМ.

20. Состав по любому из пп.13-18, где указанная трегалоза содержится в количестве от 180 мМ до 634 мМ.

21. Состав по любому из пп.13-18, где указанная трегалоза содержится в количестве 60 мМ.

10 22. Состав по любому из пп.13-21, где указанный фосфат натрия содержится в количестве от 45 мМ до 90 мМ.

23. Состав по любому из пп.13-21, где указанный фосфат натрия содержится в количестве от 50 мМ до 75 мМ.

15 24. Состав по любому из пп.13-21, где указанный фосфат натрия содержится в количестве 51 мМ.

25. Состав по любому из пп.1-24, который дополнительно содержит поверхностно-активное вещество.

26. Состав по п.25, где указанное поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат или полоксамер.

20 27. Состав по п.26, где указанный полисорбат представляет собой полисорбат 20.

28. Состав по п.26, где указанный полоксамер представляет собой полоксамер 188.

29. Состав по любому из пп.25-28, где указанная концентрация поверхностно-активного вещества составляет от 0,01% до 0,1%.

25 30. Состав по любому из пп.25-28, где указанная концентрация поверхностно-активного вещества составляет от 0,01% до 0,05%.

31. Состав по любому из пп.25-28, где указанная концентрация поверхностно-активного вещества составляет 0,04%.

32. Состав по любому из пп.1-24, где pH указанного состава составляет от 5,9 до 6,5.

33. Состав по любому из пп.1-31, где указанный состав имеет pH 6,2 или 6,0.

30 34. Состав по пп.1-24, где указанное моноклональное антитело предварительно не подвергают лиофилизации.

35. Состав по любому из пп.1-24, где указанное моноклональное антитело представляет собой полноразмерное антитело.

35 36. Состав по любому из пп.1-24, где указанное моноклональное антитело представляет собой антитело IgG1.

37. Состав по любому из пп.1-24, где указанное моноклональное антитело представляет собой гуманизированное антитело.

38. Состав по любому из пп.1-34, 36, 37, где указанное моноклональное антитело представляет собой фрагмент антитела, содержащий антигенсвязывающий участок.

40 39. Состав по п.38, где фрагмент антитела представляет собой Fab- или F (ab')<sub>2</sub>-фрагмент.

40. Состав по любому из пп.1-24, где указанное моноклональное антитело представляет собой бевацизумаб.

45 41. Состав по любому из пп.1-24, где указанное моноклональное антитело подвержено агрегации.

42. Состав по любому из пп.1-24, где состав остается стабильным при -20°C в течение по меньшей мере 12 месяцев, по меньшей мере 18 месяцев или по меньшей мере 24 месяцев.

43. Состав по любому из пп.1-24, который является стерильным.

44. Состав по любому из пп.1-24, где указанный состав предназначен для введения субъекту.

45. Состав по любому из пп.1-24, который предназначен для внутривенного (IV), подкожного (SQ), интраокулярного (IO) или внутримышечного (IM) введения.

46. Изделие для лечения ангиогенного нарушения у пациента, содержащее емкость для хранения стабильного водного фармацевтического состава по любому из пп.1-24.

47. Способ уменьшения агрегации терапевтического моноклонального антитела, включающий получение состава указанного моноклонального антитела, содержащего трегалозу в количестве от 45 мМ до 634 мМ и фосфат натрия в количестве от 35 мМ до 100 мМ, и

где рН указанного состава составляет от 5,5 до 7,0,

где указанное моноклональное антитело вводят в состав в количестве от 25 мг/мл до 100 мг/мл,

где массовое соотношение указанного моноклонального антитела к указанной трегалозе в составе больше или равно 0,49 и меньше или равно 1,47,

где состав хранят при -20°C или -40°C по меньшей мере 6 месяцев и

где моноклональное антитело связывается с VEGF.

48. Способ по п.47, где массовое соотношение указанного моноклонального антитела и указанной трегалозы в составе составляет от 0,49 до 0,73.

49. Способ по п.47, где массовое соотношение указанного моноклонального антитела и указанной трегалозы в составе составляет от 0,73 до 1,47.

50. Способ по любому из пп.47-49, где указанный фосфат натрия содержится в количестве от 50 мМ до 75 мМ.

51. Способ по любому из пп.47-49, где указанный фосфат натрия содержится в количестве 51 мМ.

52. Способ уменьшения агрегации терапевтического моноклонального антитела, включающий получение состава указанного моноклонального антитела, содержащего трегалозу и буфер,

где массовое соотношение указанного моноклонального антитела и указанной трегалозы в составе больше или равно 0,49 и меньше или равно 1,47,

где рН состава составляет от 5,5 до 7,0,

где состав хранят при -20°C или -40°C по меньшей мере 6 месяцев и

где моноклональное антитело связывается с VEGF.

53. Способ по п.52, где массовое соотношение указанного моноклонального антитела и указанной трегалозы в составе является любым из 0,49, 0,58, 0,65, 0,73, 0,74, 0,83, 0,97, 1,16 и 1,47.

54. Способ по п.52, где массовое соотношение указанного моноклонального антитела и указанной трегалозы в составе составляет от 0,49 до 0,73.

55. Способ по п.52, где массовое соотношение указанного моноклонального антитела и указанной трегалозы в составе составляет от 0,73 до 1,47.

56. Способ по любому из пп.47-55, где указанное моноклональное антитело содержится в количестве от 35 мг/мл до 75 мг/мл.

57. Способ по любому из пп.47-55, где указанное моноклональное антитело содержится в количестве от 45 мг/мл до 55 мг/мл.

58. Способ по п.57, где указанное моноклональное антитело содержится в количестве от 50 мг/мл.

59. Способ по любому из пп.47-55, где указанная трегалоза содержится в количестве

от 45 мМ до 135 мМ.

60. Способ по любому из пп.47-55, где указанная трегалоза содержится в количестве 60 мМ.

61. Способ по любому из пп.47-55, где указанная трегалоза содержится в количестве от 180 мМ до 634 мМ.

62. Способ по любому из пп.47-55, где указанный состав дополнительно содержит поверхностно-активное вещество.

63. Способ по п.62, где указанное поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат или полуксамер.

64. Способ по п.63, где указанный полисорбат представляет собой полисорбат 20.

65. Способ по п.63, где указанный полуксамер представляет собой полуксамер 188.

66. Способ по любому из пп.62-65, где указанная концентрация поверхностно-активного вещества составляет от 0,01% до 0,1%.

67. Способ по любому из пп.62-65, где указанная концентрация поверхностно-активного вещества составляет от 0,01% до 0,05%.

68. Способ по любому из пп.62-65, где указанная концентрация поверхностно-активного вещества составляет 0,04%.

69. Способ по любому из пп.47-55, где указанный состав имеет рН от 5,9 до 6,5.

70. Способ по любому из пп.47-68, где рН указанного состава составляет 6,2 или 6,0.

71. Способ по любому из пп.52-55, где указанный буфер содержит фосфат натрия в количестве от 35 мМ до 100 мМ.

72. Способ по любому из пп.47-55, где указанное моноклональное антитело представляет собой бевацизумаб.

73. Способ получения фармацевтического состава, включающий:

(а) получение состава по любому из пп.1-24;

(b) хранение состава при -20°C или -40°C по меньшей мере 6 месяцев и

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

74. Способ лечения ангиогенного нарушения у субъекта, включающий введение субъекту состава по любому из пп.1-24 в количестве, эффективном для лечения заболевания или ангиогенного нарушения.

75. Стабильный водный фармацевтический состав для внутривенного введения, содержащий:

(а) моноклональное антитело в количестве меньше или равном 100 мг/мл и

(b) трегалозу в количестве от 50 мМ до 600 мМ,

где рН указанного состава составляет от 5,5 до 7,0,

где состав хранят при -20°C или -40°C по меньшей мере 6 месяцев и

где массовое соотношение указанного моноклонального антитела и указанной трегалозы в составе больше или равно 0,49 и меньше или равно 1,47.

76. Стабильный водный фармацевтический состав для внутривенного или интраокулярного введения, который содержит:

(а) моноклональное антитело в количестве меньше или равно 100 мг/мл и

(b) трегалозу в количестве от 150 мМ до 400 мМ,

где указанный состав имеет рН от 5,5 до 7,0,

где состав хранят при -20°C или -40°C по меньшей мере 6 месяцев и

где массовое соотношение указанного моноклонального антитела и указанной трегалозы в составе больше или равно 0,49 и меньше или равно 1,47.

## СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> LE, Ian  
CONNOLLY, Brian

<120> СОСТАВЫ НА ОСНОВЕ АНТИТЕЛ

<130> 146392028240

<140> Не назначен  
<141> Одновременно с

<150> US 62/050739  
<151> 2014-09-15

<160> 22

<170> FastSEQ версии 4.0 для Windows

<210> 1  
<211> 112  
<212> PRT  
<213> Mus sp.

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> аминокислотная последовательность вариабельной области  
тяжелой цепи (VH) моноклонального антитела к CD20  
B-Ly1

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

<210> 2  
<211> 103  
<212> PRT  
<213> Mus sp.

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> аминокислотная последовательность вариабельной области  
лёгкой цепи (VL) моноклонального антитела к CD20  
B-Ly1

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

2

```

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

```

```

<210> 3
<211> 119
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> аминокислотная последовательность вариабельной области
      тяжелой цепи (VH) гуманизированного антитела B-Ly1 (B-NH2)

```

```

<400> 3
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
      1      5      10      15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
      20      25      30
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
      35      40      45
Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
      50      55      60
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
      65      70      75      80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85      90      95
Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
      100      105      110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
      115

```

```

<210> 4
<211> 119
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> аминокислотная последовательность вариабельной области
      тяжелой цепи (VH) гуманизированного антитела B-Ly1 (B-NH3)

```

```

<400> 4
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
      1      5      10      15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
      20      25      30
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
      35      40      45
Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
      50      55      60
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
      65      70      75      80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Leu Cys
      85      90      95
Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
      100      105      110

```

3

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 5  
<211> 119  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> аминокислотная последовательность вариабельной области  
тяжелой цепи (VH) гуманизированного антитела B-Ly1 (B-HH4)

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

<210> 6  
<211> 119  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> аминокислотная последовательность вариабельной области  
тяжелой цепи (VH) гуманизированного антитела B-Ly1 (B-HH5)

<400> 6  
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser  
1 5 10 15  
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser  
20 25 30  
Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45  
Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe  
50 55 60  
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80  
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95  
Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110  
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 7  
<211> 119  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность



<220>  
 <223> аминокислотная последовательность вариабельной области  
 тяжелой цепи (VH) гуманизированного антитела B-Ly1 (B-HH6)

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

<210> 8  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> аминокислотная последовательность вариабельной области  
 тяжелой цепи (VH) гуманизированного антитела B-Ly1 (B-HH7)

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

<210> 9  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> аминокислотная последовательность вариабельной области  
 тяжелой цепи (VH) гуманизированного антитела B-Ly1 (B-HH8)

<400> 9  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

5

```

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

```

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 119

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

<223> аминокислотная последовательность вариабельной области  
тяжелой цепи (VH) гуманизированного антитела B-Ly1 (B-HH9)

&lt;400&gt; 10

```

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

```

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 119

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

<223> аминокислотная последовательность вариабельной области  
тяжелой цепи (VH) гуманизированного антитела B-Ly1 (B-HL8)

&lt;400&gt; 11

```

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

```

6

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

<210> 12  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> аминокислотная последовательность вариабельной области  
 тяжелой цепи (VH) гуманизированного антитела B-Ly1 (B-HL10)

```
<400> 12
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1      5      10      15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Tyr Ser
      20      25      30
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
      35      40      45
Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
      50      55      60
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
      65      70      75      80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85      90      95
Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
      100      105      110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
      115
```

<210> 13  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> аминокислотная последовательность вариабельной области  
 тяжелой цепи (VH) гуманизированного антитела B-Ly1 (B-HL11)

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

7

<210> 14  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> аминокислотная последовательность вариабельной области  
 тяжелой цепи (VH) гуманизированного антитела B-Ly1 (B-HL12)

<400> 14  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Ser  
 20 25 30  
 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110  
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 15  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> аминокислотная последовательность вариабельной области  
 тяжелой цепи (VH) гуманизированного антитела B-Ly1 (B-HL13)

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

<210> 16  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> аминокислотная последовательность вариабельной области  
 тяжелой цепи (VH) гуманизированного антитела B-Ly1 (B-HL14)

8

&lt;400&gt; 16

```

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

```

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 119

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

<223> аминокислотная последовательность вариабельной области  
тяжелой цепи (VH) гуманизированного антитела B-Ly1 (B-HL15)

&lt;400&gt; 17

```

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

```

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 119

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

<223> аминокислотная последовательность вариабельной области  
тяжелой цепи (VH) гуманизированного антитела B-Ly1 (B-HL16)

&lt;400&gt; 18

```

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

```

9

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

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 119

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

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

&lt;400&gt; 19

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

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 115

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

<223> аминокислотная последовательность вариабельной области  
 лёгкой цепи (VL) гуманизированного антитела B-Ly1 B-KV1

&lt;400&gt; 20

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

10

100 105 110

Arg Thr Val  
115

<210> 21  
<211> 449  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая конструкция

<400> 21

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser	1	5	10	15
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ala	Phe	Ser	Tyr	Ser	20	25	30	
Trp	Ile	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	35	40	45	
Gly	Arg	Ile	Phe	Pro	Gly	Asp	Gly	Asp	Thr	Asp	Tyr	Asn	Gly	Lys	Phe	50	55	60	
Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	65	70	75	80
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95	
Ala	Arg	Asn	Val	Phe	Asp	Gly	Tyr	Trp	Leu	Val	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	100	105	110	
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	115	120	125	
Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	130	135	140	
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	145	150	155	160
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	165	170	175	
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	180	185	190	
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	195	200	205	
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	210	215	220	
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	225	230	235	240
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	245	250	255	
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	260	265	270	
Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	275	280	285	
Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	290	295	300	
Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	305	310	315	320
Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	325	330	335	
Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	340	345	350	
Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	355	360	365	
Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	370	375	380	
Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	385	390	395	400

11

```

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

```

```

<210> 22
<211> 219
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

```

```

<220>
<223> Синтетическая конструкция

```

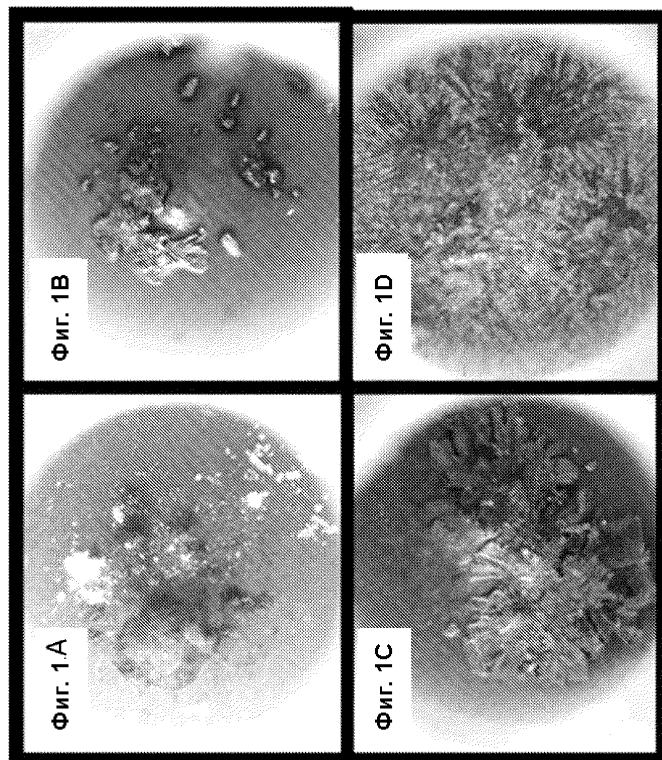
```

<400> 22
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1      5      10      15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
      20      25      30
Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
      35      40      45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Val Ser Gly Val Pro
 50      55      60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65      70      75      80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn
      85      90      95
Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
      100      105      110
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
      115      120      125
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
      130      135      140
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145      150      155      160
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
      165      170      175
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
      180      185      190
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
      195      200      205
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
      210      215

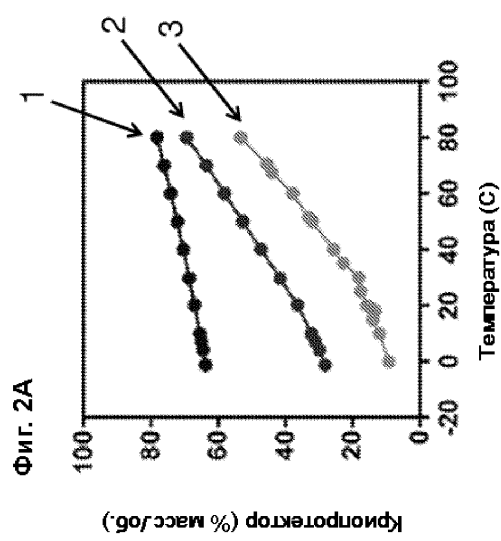
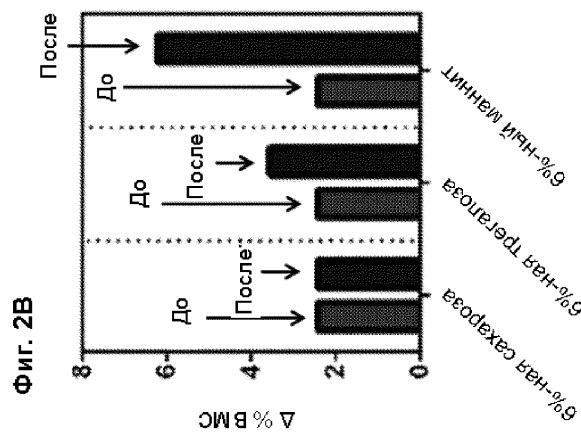
```



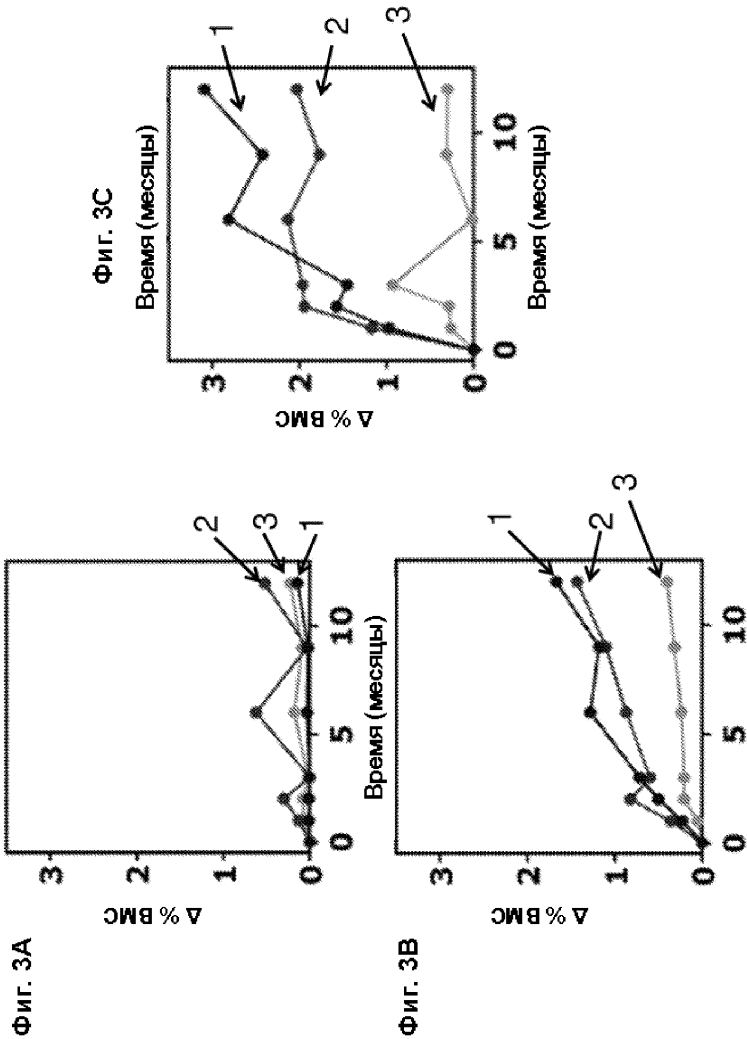
1/10



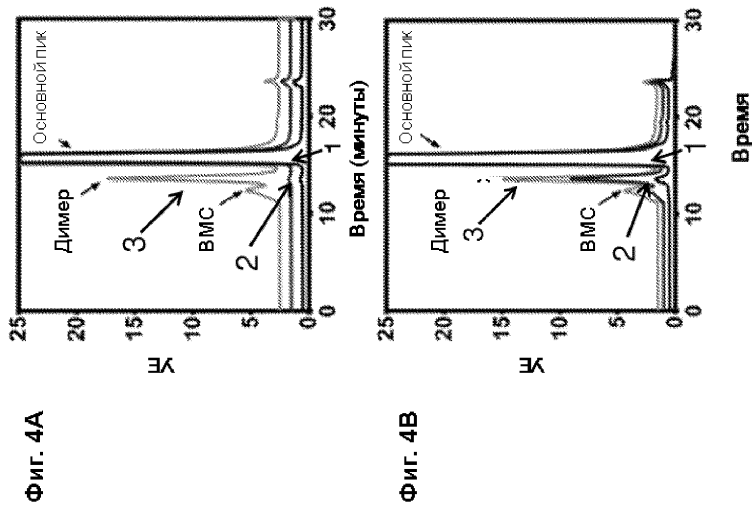
2/10



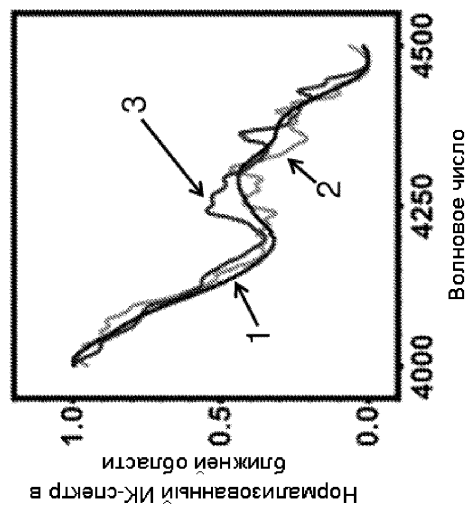
3/10



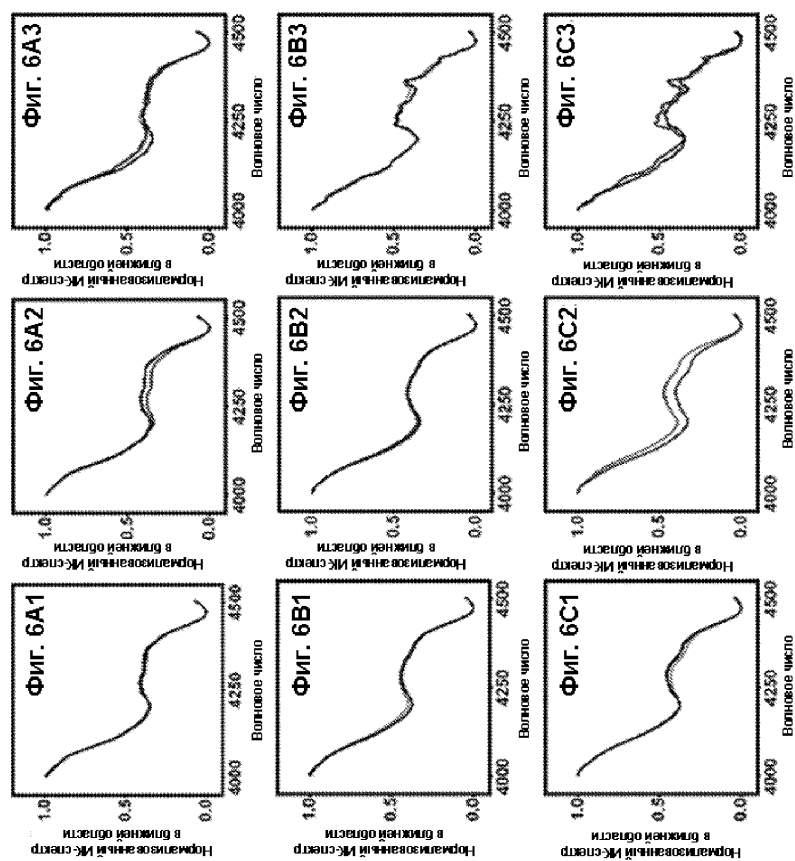
4/10



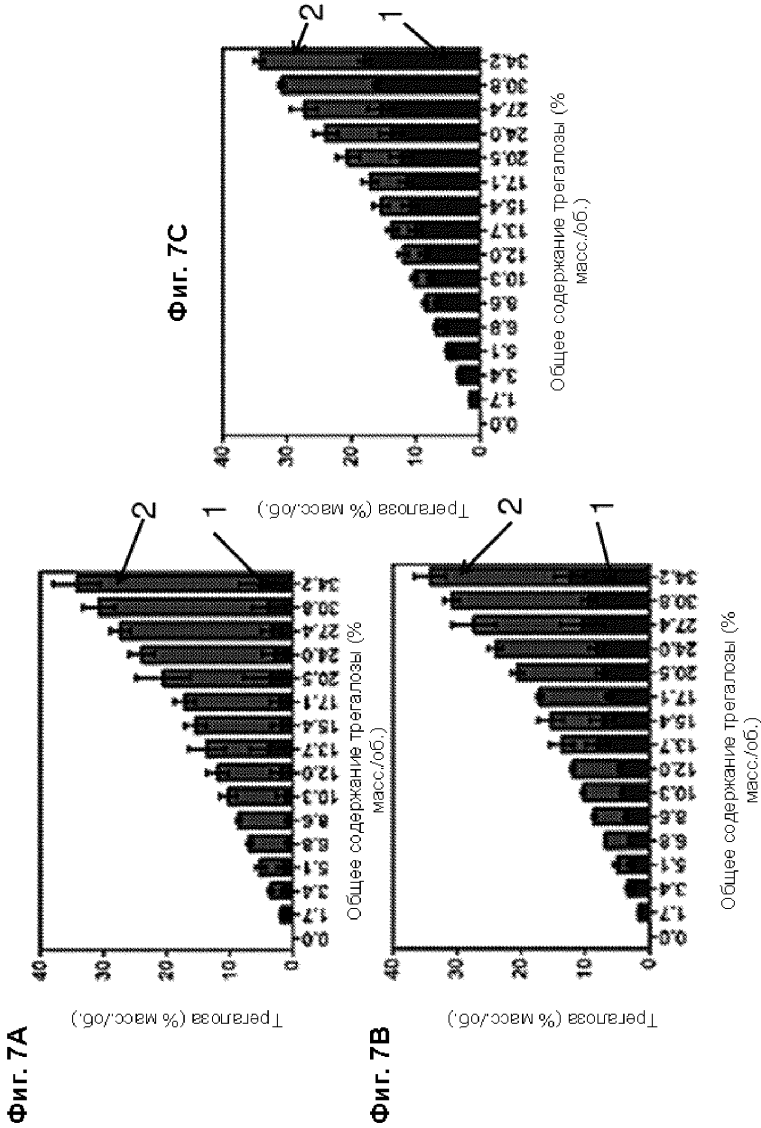
5/10

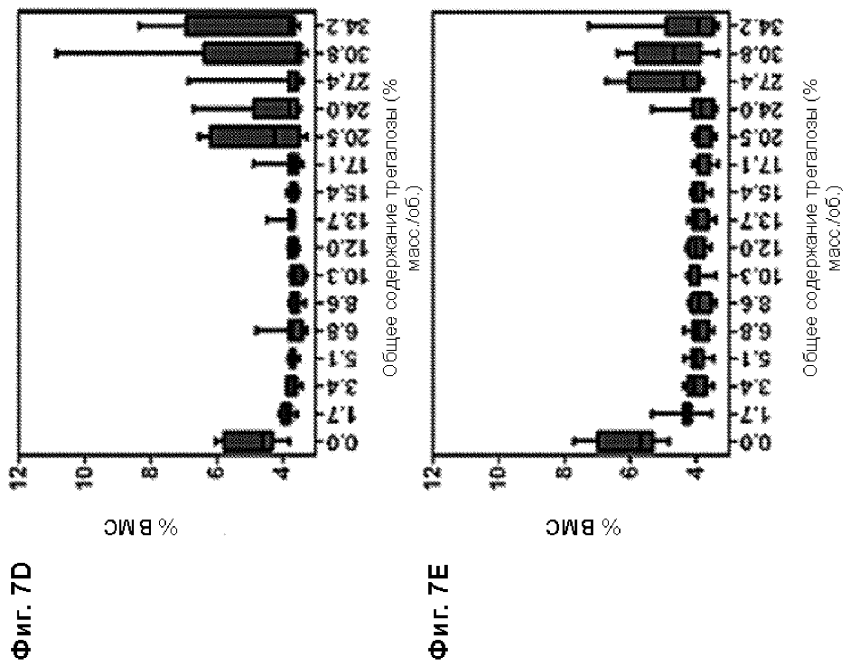


Фиг. 5

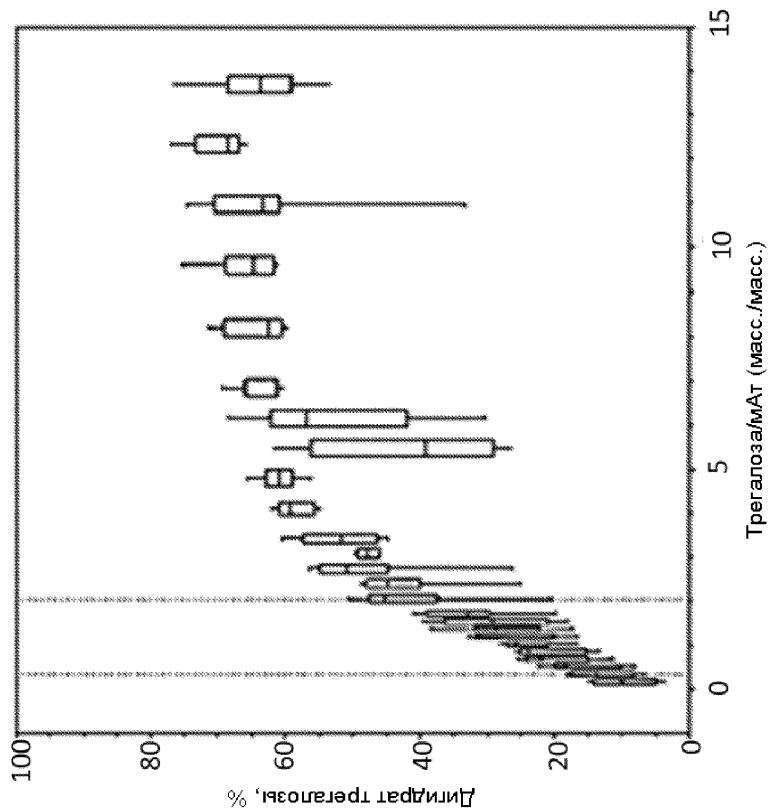


7/10



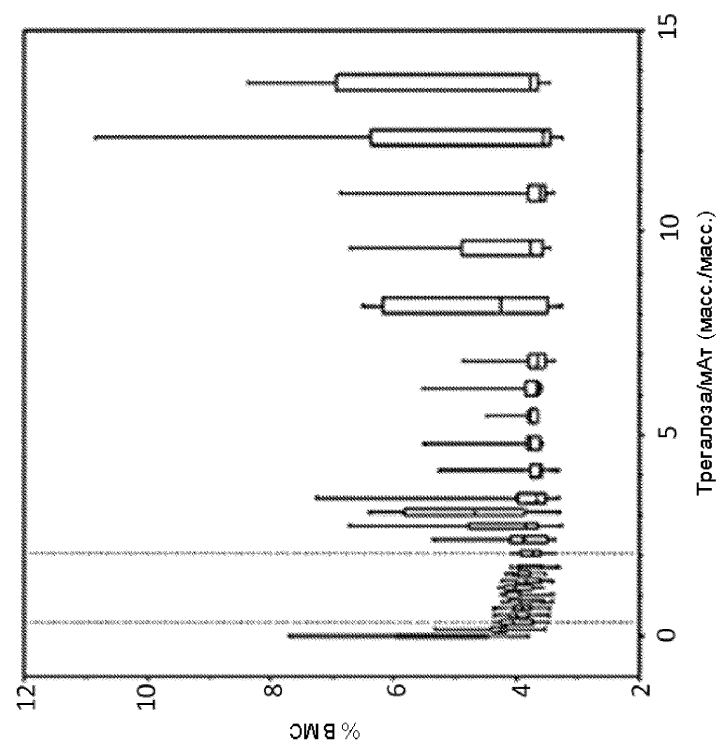






Фиг. 8А

10/10



Фиг. 8В