

МОНОКЛОНАЛЬНОЕ АНТИТЕЛО, КОТОРОЕ СПЕЦИФИЧЕСКИ СВЯЗЫВАЕТСЯ С CD20

Область техники

Настоящее изобретение относится к области биотехнологии, а именно к антителам к CD20 или их антигенсвязывающим фрагментам, а также их применению для лечения заболеваний, которые связаны с В-клетками. Более конкретно, настоящее изобретение относится к моноклональным антителам, которые специфически связываются с CD20 (В-лимфоцитарный антиген CD20). Изобретение также относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей данное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вектору экспрессии, способу получения антитела и применению антитела для лечения заболеваний или нарушений, связанных с В-клетками, а именно с В-лимфоцитарным антигеном CD20.

Уровень техники

Лимфоциты представляют собой одну из нескольких популяций лейкоцитов; они специфично распознают и реагируют на чужеродный антиген. Тремя основными классами лимфоцитов являются В-лимфоциты (В-клетки), Т-лимфоциты (Т-клетки) и естественные клетки-киллеры (NK). В-лимфоциты представляют собой клетки, ответственные за производство антител и гуморальный иммунный ответ. В-клетки созревают в костном мозге и покидают его, экспрессируя антигенсвязывающее антитело на клеточной поверхности. Когда ранее не подвергавшаяся никакому воздействию В-клетка впервые сталкивается с антигеном, для которого связанное с мембраной антитело является специфическим, клетка начинает быстро делиться и ее потомство дифференцируется с образованием В-клеток памяти и эффекторных клеток, называемых «плазматитами». В-клетки памяти имеют большую продолжительность жизни и продолжают экспрессировать связанное с мембраной антитело с такой же специфичностью, что и у исходной родительской клетки. Плазматиты не продуцируют связанное с мембраной антитело, но вместо этого продуцируют секретлируемую форму антитела. Секретлируемые антитела представляют собой главные эффекторные молекулы гуморального иммунного ответа.

Антиген CD20 (который называют также антигеном, дифференцировка которого характерна только для человеческих В-лимфоцитов, Вp35) представляет собой гидрофобный трансмембранный белок с молекулярной массой примерно 35 кДа, локализованный на пре-В- и зрелых В-лимфоцитах (Valentine и др., J. Biol. Chem. 264(19), 1989, сс.11282-11287; и Einfeld и др., EMBO J. 7(3), 1988, сс.711-717). Антиген экспрессируется также на поверхности более чем 90% В-клеток при неходжкинских лимфомах (НХЛ) (Anderson и др., Blood 63(6), 1984, сс.1424-1433), но он не обнаружен на гематопозитических стволовых клетках, про-В-клетках, здоровых плазматитах или в других здоровых тканях (Tedder и др., J. Immunol. 135(2), 1985, сс. 973-979). Вероятно CD20 регулирует раннюю (ие) стадию (ии) процесса активации цикла клеточной инициации и дифференцировки (Tedder и др., выше) и возможно функционирует в качестве кальциевых ионных каналов (Tedder и др., J. Cell. Biochem. 14D, 1990, с. 195).

С учетом того, что экспрессия CD20 происходит в В-клетках при лимфомах, этот антиген может представлять собой ценную терапевтическую мишень при лечении указанных лимфом.

Антитело ритуксимаб (RITUXAN, Мабтера, Ацеллбия), которое представляет собой созданное с помощью генной инженерии химерное мышинное/человеческое моноклональное антитело к человеческому антигену CD20 применяют для лечения пациентов, которые страдают характеризующейся наличием рецидивов или слабой рефрактерной или фолликулярной CD20-позитивной В-клеточной не ходжкинской лимфомой. Ритуксимаб представляет собой антитело, обозначенное как «C2B8» в US 5736137 и в US 5776456. Изучение механизма действия *in vitro* продемонстрировало, что ритуксимаб связывает человеческий комплемент и лизирует линии лимфоидных В-клеток в результате комплементзависимой цитотоксичности (CDC) (Reff и др., Blood 83(2), 1994, сс. 435-445). Кроме того, это антитело обладает выраженной активностью при анализе антитело-обусловленной клеточнозависимой цитотоксичности (ADCC). В доклинических испытаниях *in vivo* установлено, что ритуксимаб уменьшает количество В-клеток в периферической крови, лимфатических узлах и костном мозге яванских макак-крабоедов (*Macaca fascicularis*) (циномолгус), вероятно из-за процессов, опосредуемых комплементом и клеткой (Reff и др., Blood 83(2), 1994, сс. 435-445).

Кроме того, позднее выяснилось, что антитела к CD20, например, ритуксимаб, также является эффективным терапевтическим средством при лечении различных аутоиммунных заболеваний, например, ревматоидного артрита (патенты RU2358762, RU2489166 и RU2457860) или гранулематоза Вегенера (патент RU2326127).

Основным ограничением, связанным с применением мышинных антител для лечения человека, является образование человеческих антимышинных антител (НАМА) (см., например Miller R.A. и др. «Monoclonal antibody therapeutic trials in seven patients with T-cell lymphoma», Blood, 62, 1983, сс. 988-995; и Schroff R.W. и др. «Human anti-murine immunoglobulin response in patients receiving monoclonal antibody therapy», Cancer Res., 45, 1985, сс. 879-885). Даже химерные молекулы, в которых переменные (V) области антител грызунов слиты с человеческими константными (C) областями, еще сохраняют способность вызывать сильный иммунный ответ (НАСА, человеческий ответ на химерное антитело) (Neuberger и др., Nature (Лондон), 314, 1985, сс. 268-270).

Эффективным подходом, позволяющим преодолевать указанные ограничения при применении моноклональных антител в клинических условиях, является «гуманизация» мышинного антитела или антитела, полученного из видов кроме человека (Jones и др., Nature (Лондон), 321, 1986, сс. 522-525; Riechman и др., Nature (Лондон), 332, 1988, сс. 323-327).

Таким образом, представляется важным создание новых терапевтических антител к антигену CD20, которые при введении пациентам обладают минимальной антигенностью или не обладают ею вообще, предназначенных прежде всего для продолжительного лечения. В настоящем изобретении решена эта задача.

Моноклональное антитело BCD-132 селективно и специфически связывается с антигеном CD20 и является эффективным ингибитором антигена CD20, при этом антитело по изобретению обладает минимальной антигенностью при введении пациентам.

Краткое описание изобретения

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которое специфично связывается с CD20, и включает:

1) переменный домен тяжелой цепи, который имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 6;

2) переменный домен легкой цепи, который имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 8.

В некоторых вариантах моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включают:

1) переменный домен тяжелой цепи, который имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2;

2) переменный домен легкой цепи, который имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4.

В некоторых вариантах моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включают:

1) переменный домен тяжелой цепи, который имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6;

2) переменный домен легкой цепи, который имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8.

В некоторых вариантах моноклональное антитело включает:

1) тяжелую цепь, которая имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 5;

2) легкую цепь, которая имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 7.

В некоторых вариантах моноклональное антитело включает:

1) тяжелую цепь, которая имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1;

2) легкую цепь, которая имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах моноклональное антитело включает:

1) тяжелую цепь, которая имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5;

2) легкую цепь, которая имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7.

В некоторых вариантах моноклональное антитело, которое специфично связывается с CD20, представляет собой полноразмерное антитело IgG.

В некоторых вариантах моноклональное антитело относится к изотипу IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 человека.

В некоторых вариантах моноклональное антитело относится к изотипу IgG1 человека.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к нуклеиновой кислоте, которая кодирует вышеуказанное антитело.

В некоторых вариантах нуклеиновая кислота представляет собой ДНК.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к экспрессионному вектору, содержащему вышеуказанную нуклеиновую кислоту.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу получения клетки-хозяина для получения вышеуказанного антитела, который включает трансформирование клетки вышеуказанным вектором.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к клетке-хозяину для получения вышеуказанного антитела, содержащей вышеуказанную нуклеиновую кислоту.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу получения вышеуказанного антитела, который заключается в культивировании вышеуказанной клетки-хозяина в культуральной среде в условиях, достаточных для получения указанного антитела, при необходимости, с последующим выделением и очисткой полученного антитела.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для лечения заболевания или нарушения, опосредуемого CD20, содержащей вышеуказанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в терапевтически эффективном количестве, в сочетании с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми эксципиентами.

В некоторых вариантах фармацевтическая композиция предназначена для лечения заболевания или нарушения, где заболевание или нарушение выбрано из:

- а) онкологического заболевания или нарушения или
- б) аутоиммунного заболевания или нарушения.

В некоторых вариантах фармацевтическая композиция предназначена для лечения онкологического заболевания или нарушения, которое выбрано из группы, включающей: В-клеточную лимфому или лейкоз.

В некоторых вариантах фармацевтическая композиция предназначена для лечения В-клеточной лимфомы, которая выбрана из: неходжкинской лимфомы (НХЛ) или болезни Ходжкина (лимфомы Ходжкина).

В некоторых вариантах фармацевтическая композиция предназначена для лечения лейкоза, который выбран из: хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ) или мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы (МЛЛ).

В некоторых вариантах фармацевтическая композиция предназначена для лечения аутоиммунного заболевания или нарушения, которое выбрано из группы, включающей: ревматоидный артрит, ювенильный ревматоидный артрит (болезнь Стилла), системную красную волчанку (СКВ), волчаночный нефрит, неспецифический язвенный колит, болезнь Вегенера, воспалительное заболевание кишечника, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру (ИТП), тромботическую тромбогемолитическую пурпуру (ТТП), аутоиммунную тромбоцитопению, рассеянный склероз, псориаз, связанную с IgA нефропатию, связанные с IgM полиневропатии, тяжелую псевдопаралитическую миастению, васкулит, ANCA васкулитов, отторжение трансплантата паренхиматозных органов, реакцию «трансплантат против хозяина» (РТПХ), сахарный диабет, синдром Рейно, синдром Шегрена и гломерулонефрит.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к фармацевтической комбинации для профилактики или лечения заболевания или нарушения, опосредуемого CD20, которая содержит вышеуказанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и по меньшей мере одно другое терапевтически активное соединение.

В некоторых вариантах фармацевтическая комбинация включает другое терапевтически активное противоопухолевое соединение, которое выбирают из химиотерапевтического средства, антитела или противогормонального средства.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу ингибирования биологической активности CD20 у субъекта, нуждающегося в таком ингибировании, который включает введение субъекту эффективного количества вышеуказанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания или нарушения, опосредованного CD20, который включает введение субъекту, нуждающемуся в таком лечении, вышеуказанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или вышеуказанной фармацевтической композиции, в терапевтически эффективном количестве.

В некоторых вариантах способ лечения заболевания или нарушения относится к заболеванию или нарушению, которое выбрано из:

- а) онкологического заболевания или нарушения или
- б) аутоиммунного заболевания или нарушения.

В некоторых вариантах способ лечения заболевания или нарушения относится к онкологическому заболеванию или нарушению, которое выбрано из группы, включающей: В-клеточную лимфому или лейкоз.

В некоторых вариантах способ лечения заболевания или нарушения относится к В-клеточной лимфоме, которая выбрана из: неходжкинской лимфомы (НХЛ) или болезни Ходжкина (лимфомы Ходжкина).

В некоторых вариантах способ лечения заболевания или нарушения относится к лейкозу, который выбран из: хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ) или мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы (МЛЛ).

В некоторых вариантах способ лечения заболевания или нарушения относится к аутоиммунному заболеванию или нарушению, которое выбрано из группы включающей: ревматоидный артрит, ювенильный ревматоидный артрит (болезнь Стилла), системную красную волчанку (СКВ), волчаночный нефрит, неспецифический язвенный колит, болезнь Вегенера, воспалительное заболевание кишечника, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру (ИТП), тромботическую тромбогемолитическую пурпуру (ТТП), аутоиммунную тромбоцитопению, рассеянный склероз, псориаз, связанную с IgA нефропатию, связанные с IgM полиневропатии, тяжелую псевдопаралитическую миастению, васкулит, ANCA васкулитов, отторжение трансплантата паренхиматозных органов, реакцию «трансплантат против хозяина» (РТПХ), сахарный диабет, синдром Рейно, синдром Шегрена и гломерулонефрит.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к применению вышеуказанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или вышеуказанной фармацевтической композиции для лечения у субъекта, нуждающегося в таком лечении, заболевания или нарушения, опосредуемого CD20.

В некоторых вариантах вышеуказанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент применяют для лечения заболевания или нарушения, где заболевание или нарушение выбрано из:

- а) онкологического заболевания или нарушения или
- б) аутоиммунного заболевания или нарушения.

В некоторых вариантах вышеуказанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент применяют для лечения онкологического заболевания или нарушения, которое выбрано из группы, включающей: В-клеточную лимфому или лейкоз.

В некоторых вариантах вышеуказанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент применяют для лечения В-клеточной

лимфомы, которая выбрана из: неходжкинской лимфомы (НХЛ) или болезни Ходжкина (лимфомы Ходжкина).

В некоторых вариантах вышеуказанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент применяют для лечения лейкоза, который выбран из: хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ) или мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы (МЛЛ).

В некоторых вариантах вышеуказанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент применяют для лечения аутоиммунного заболевания или нарушения, которое выбрано из группы включающей: ревматоидный артрит, ювенильный ревматоидный артрит (болезнь Стилла), системную красную волчанку (СКВ), волчаночный нефрит, неспецифический язвенный колит, болезнь Вегенера, воспалительное заболевание кишечника, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру (ИТП), тромботическую тромбогемолитическую пурпуру (ТТП), аутоиммунную тромбоцитопению, рассеянный склероз, псориаз, связанную с IgA нефропатию, связанные с IgM полиневропатии, тяжелую псевдопаралитическую миастению, васкулит, ANCA васкулитов, отторжение трансплантата паренхиматозных органов, реакцию «трансплантат против хозяина» (РТПХ), сахарный диабет, синдром Рейно, синдром Шегрена и гломерулонефрит.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1. Карта экспрессионного вектора pEE СК.

Фиг. 2. Карта экспрессионного вектора pEE НС.

Фиг. 3. Схематическое изображение формата IgG1.

Фиг. 4. Схема синтеза комбинаторной наивной библиотеки человека.

Фиг. 5. Карта фагмиды для клонирования Fab фаговых дисплейных библиотек.

Фиг. 6. Карта экспрессионной плазмиды pLL для наработки Fab.

Фиг. 7. Анализ взаимодействия кандидатов BCD132L с биотинилированным пептидом CD20 на приборе Forte Bio Octet RED 386.

Фиг. 8. Анализ взаимодействия кандидатов BCD132L-026 с биотинилированным пептидом CD20 на приборе Forte Bio Octet RED 386.

Фиг. 9. Анализ взаимодействия кандидатов BCD132L-028 с биотинилированным пептидом CD20 на приборе Forte Bio Octet RED 386.

Фиг. 10. Анализ взаимодействия кандидатов BCD132L-075 с биотинилированным пептидом CD20 на приборе Forte Bio Octet RED 386.

Фиг. 11. Анализ взаимодействия кандидатов BCD132L-077 с биотинилированным пептидом CD20 на приборе Forte Bio Octet RED 386.

Фиг. 12. Анализ взаимодействия кандидатов BCD132L-028 с биотинилированным пептидом CD20 на приборе Forte Bio Octet RED 386.

Фиг. 13. Анализ взаимодействия кандидатов BCD132L-077 (1,2) с биотинилированным пептидом CD20 на приборе Forte Bio Octet RED 386.

Фиг. 14. Анализ взаимодействия кандидатов BCD132L-077 (3,4) с биотинилированным пептидом CD20 на приборе Forte Bio Octet RED 386.

Фиг. 15. Анализ взаимодействия кандидатов BCD132L-077 (5,6) с биотинилированным пептидом CD20 на приборе Forte Bio Octet RED 386.

Фиг. 16. Анализ взаимодействия кандидатов BCD132L-028 с FcγRIIIa-158F на приборе Forte Bio Octet RED 386.

Фиг. 17. Анализ взаимодействия кандидатов BCD132L-077 (1,2) с FcγRIIIa-158F на приборе Forte Bio Octet RED 386.

Фиг. 18. Анализ взаимодействия кандидатов BCD132L-077 (3,4) с FcyRIIIa-158F на приборе Forte Bio Octet RED 386.

Фиг. 19. Анализ взаимодействия кандидатов BCD132L-077 (5,6) с FcyRIIIa-158F на приборе Forte Bio Octet RED 386.

Фиг. 20. Анализ взаимодействия кандидатов BCD132L-028 с FcyRIIIa-158V на приборе Forte Bio Octet RED 386.

Фиг. 21. Анализ взаимодействия кандидатов BCD132L-077 (1,2) с FcyRIIIa-158V на приборе Forte Bio Octet RED 386.

Фиг. 22. Анализ взаимодействия кандидатов BCD132L-077 (3,4) с FcyRIIIa-158V на приборе Forte Bio Octet RED 386.

Фиг. 23. Анализ взаимодействия кандидатов BCD132L-077 (5,6) с FcyRIIIa-158V на приборе Forte Bio Octet RED 386.

Фиг. 24. Карта экспрессионного вектора pSX.

Фиг. 25. Оценка специфического связывания BCD-132-L-028 и BCD-132-L-077 с рецептором CD20 на клеточной линии WIL2-S методом проточной цитометрии в сравнении с Мабтера.

Фиг. 26. Оценка комплемент-зависимой цитотоксичности BCD-132-L-028 и BCD-132-L-077 относительно Мабтера.

BCD-132-L-028

● Мабтера ■ BCD-132-L-028 ▼ BCD-132-L-077.

Фиг. 27. Оценка комплемент-зависимой цитотоксичности BCD-132-L-028 и BCD-132-L-077 относительно Мабтера.

BCD-132-L-077

● Мабтера ■ BCD-132-L-028 ▼ BCD-132-L-077.

Фиг. 28. Оценка антитело-зависимой клеточной цитотоксичности BCD-132-L-028 и BCD-132-L-077 относительно Мабтера. Репортерная линия с CD16 низкой аффинности, таргетная клеточная линия WIL2-S.

BCD-132-L-028

● Мабтера ■ BCD-132-L-028 ▼ BCD-132-L-077.

Фиг. 29. Оценка антитело-зависимой клеточной цитотоксичности BCD-132-L-028 и BCD-132-L-077 относительно Мабтера. Репортерная линия с CD16 низкой аффинности, таргетная клеточная линия WIL2-S.

BCD-132-L-077

● Мабтера ■ BCD-132-L-028 ▼ BCD-132-L-077.

Фиг. 30. Оценка антитело-зависимой клеточной цитотоксичности BCD-132-L-028 и BCD-132-L-077 относительно Мабтера. Репортерная линия с CD16 высокой аффинности, таргетная клеточная линия WIL2-S.

BCD-132-L-028

● Мабтера ■ BCD-132-L-028 ▼ BCD-132-L-077.

Фиг. 31. Оценка антитело-зависимой клеточной цитотоксичности BCD-132-L-028 и BCD-132-L-077 относительно Мабтера. Репортерная линия с CD16 высокой аффинности, таргетная клеточная линия WIL2-S.

BCD-132-L-077

● Мабтера ■ BCD-132-L-028 ▼ BCD-132-L-077.

Фиг. 32. Оценка деплеции CD19+ В-клеток, вызываемой антителами BCD-132-L-028 и BCD-132-L-077 в сравнении с Мабтера, на цельной крови здоровых доноров с аллотипом FF (A) FV (B) и VV (B).

Фиг. 33. Оценка антитело-зависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) BCD-132-L-028 и BCD-132-L-077 относительно коммерческого антитела Ритуксимаб.

Фиг. 34. Выраженность воспалительной реакции (BCD132-L-077).

Фиг. 35. Выраженность демиелинизации (BCD132-L-077).

Фиг. 36. Усредненные кривые изменений концентрации в сыворотке крови приматов при многократном внутривенном введении препарата BCD132-L-077 в дозах 22,0 мг/кг, 44,0 мг/кг, 88,0 мг/кг.

Описание изобретения

Определения и общие методы

Если иное не определено в настоящем документе, научные и технические термины, используемые в связи с настоящим изобретением, будут иметь значения, которые обычно понятны специалистам в данной области.

Кроме того, если по контексту не требуется иное, термины в единственном числе включают в себя термины во множественном числе, и термины во множественном числе включают в себя термины в единственном числе. Как правило, используемая классификация и методы культивирования клеток, молекулярной биологии, иммунологии, микробиологии, генетики, аналитической химии, химии органического синтеза, медицинской и фармацевтической химии, а также гибридизации и химии белка и нуклеиновых кислот, описанные в настоящем документе, хорошо известны специалистам и широко применяются в данной области. Ферментативные реакции и способы очистки осуществляют в соответствии с инструкциями производителя, как это обычно осуществляется в данной области, или как описано в настоящем документе.

Определения, связанные с антителом

CD20, или В-лимфоцитарный антиген CD20 — белок, корецептор, расположенный на поверхности В-лимфоцитов. Продукт гена человека MS4A1. Точная функция этого белка до сих пор не установлена, однако предполагают, что он принимает участие в активации и пролиферации В-лимфоцитов.

Ген MS4A1 принадлежит к семейству MS4A (англ. membrane-spanning 4A), в которое входят по крайней мере 25 других генов. Гены этого семейства сгруппированы в локусе 11q12-13. Предположительно, соответствующие белки имеют сходную пространственную структуру: это мембранные белки, которые пронизывают мембрану 4 раза и имеют N- и C-концевые цитоплазматические домены (JANAS E. ET ALL., Functional role of lipid rafts in CD20 activity?, Biochem Soc Symp. 2005; (72):165-75).

Амплификация этого гена и/или сверхэкспрессия его белка были обнаружены при многих раковых или аутоиммунных заболеваниях, в том числе при:

а) онкологических заболеваниях или нарушениях из группы, включающей: неходжкинскую лимфому (НХЛ), болезнь Ходжкина (лимфому Ходжкина), хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ) или мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому (МЛЛ).

б) аутоиммунных заболеваниях или нарушениях из группы, включающей: ревматоидный артрит, ювенильный ревматоидный артрит (болезнь Стилла), системную красную волчанку (СКВ), волчаночный нефрит, неспецифический язвенный колит, болезнь Вегенера, воспалительное заболевание кишечника, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру (ИТП), тромботическую тромбогемолитическую пурпуру (ТТП), аутоиммунную тромбоцитопению, рассеянный склероз, псориаз, связанную с IgA нефропатию, связанные с IgM полиневропатии, тяжелую псевдопаралитическую миастению,

васкулит, ANCA васкулитов, отторжение трансплантата паренхиматозных органов, реакцию «трансплантат против хозяина» (РТПХ), сахарный диабет, синдром Рейно, синдром Шегрена и гломерулонефрит.

Термин «связывающая молекула» включает в себя антитела и иммуноглобулины.

Термин «антитело» или «иммуноглобулин» (Ig), как использовано в данном описании, включает целые антитела и любой антигенсвязывающий фрагмент (т.е. «антигенсвязывающую часть») или его отдельные цепи. Термин «антитело» относится к гликопротеину, содержащему по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, взаимосвязанные дисульфидными связями, или его антигенсвязывающей части. Каждая тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи (сокращенно называемую в данном описании как VH) и константную область тяжелой цепи. Известно пять типов тяжелых цепей антител млекопитающих, которые обозначают греческими буквами: α , δ , ϵ , γ и μ . Присутствующий тип тяжелой цепи определяет класс антитела; указанные цепи обнаружены в антителах типа IgA, IgD, IgE, IgG и IgM соответственно. Различные тяжелые цепи отличаются по размеру и составу; α и γ содержат примерно 450 аминокислот, а μ и ϵ состоят примерно из 550 аминокислот. Каждая тяжелая цепь содержит две области, т.е. константную область и переменную область. Константная область является идентичной во всех антителах одного и того же изотипа, но отличается в антителах различного изотипа. Тяжелые цепи γ , α и δ содержат константную область, которая состоит из трех константных доменов CH1, CH2 и CH3 (выстроены в ряд) и шарнирной области, которая придает гибкость (Woof J., Burton D., Nat Rev Immunol 4, 2004, сс.89-99); тяжелые цепи μ и ϵ содержат константную область, которая состоит из четырех константных доменов CH1, CH2, CH3 и CH4. У млекопитающих известно только два типа легких цепей, которые обозначают как лямбда (λ) и каппа (κ). Каждая легкая цепь состоит из переменной области легкой цепи (сокращенно называемой в данном описании как VL) и константной области легкой цепи. Примерная длина легкой цепи составляет 211-217 аминокислот. Предпочтительно легкая цепь представляет собой легкую каппа (κ)-цепь, а константный домен CL предпочтительно представляет собой C-каппа (κ).

«Антитела» согласно изобретению могут представлять собой антитела любого класса (например, IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, предпочтительно IgG) или подкласса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2, предпочтительно IgG1).

Области VH и VL могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), разбросанные между областями, которые являются более консервативными, называемыми каркасными областями (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Переменные области тяжелой и легкой цепей содержат домен связывания, который взаимодействует с антигеном. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями хозяина или факторами, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторными клетками), и первый компонент (Clq) классической системы комплемента.

Термин «антигенсвязывающая часть» антитела или «антигенсвязывающий фрагмент» (или просто «часть антитела» или

«фрагмент антитела»), как использовано в данном описании, относится к одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном. Было показано, что антигенсвязывающая функция антитела может выполняться фрагментами полноразмерного антитела. Примеры связывающих фрагментов, включенных в термин «антигенсвязывающая часть» антитела включают (i) Fab-фрагмент, одновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH 1; (ii) F(ab')₂-фрагмент, двухвалентный фрагмент, содержащий два Fab-фрагмента, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) Fd-фрагмент, состоящий из доменов VH и CH 1; (iv) Fv-фрагмент, состоящий из доменов VL и VH в едином плече антитела, (v) dAb-фрагмент (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), который состоит из домена VH/VHH; и (vi) выделенная определяющая комплементарность область (CDR). Кроме того, две области Fv-фрагмента, VL и VH, кодируются разными генами, они могут быть соединены при помощи рекомбинантных способов с использованием синтетического линкера, который дает возможность получать их в виде единой белковой цепи, в которой области VL и VH спариваются с образованием одновалентных молекул (известных как одноцепочечный Fv (scFv); см., например, Bird et al. (1988) Science 242:423-426; и Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Предполагается, что такие одноцепочечные молекулы также включены в термин «антигенсвязывающая часть» антитела. Такие фрагменты антител получают с использованием общепринятых способов, известных специалистам в данной области, и эти фрагменты подвергают скринингу таким же образом, как и интактные антитела.

Предпочтительно CDR антигенсвязывающего участка или весь антигенсвязывающий участок антител по изобретению имеет происхождение из мыши, ламы или донорской человеческой библиотеки или по существу человеческое происхождение с определенными аминокислотными остатками, измененными, например, замещенными разными аминокислотными остатками с тем, чтобы оптимизировать конкретные свойства антитела, например KD, koff, IC₅₀, EC₅₀, ED₅₀. Предпочтительно каркасные участки антитела по изобретению имеют человеческое происхождение или по существу человеческое происхождение (по крайней мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% человеческого происхождения).

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий участок антитела по изобретению может происходить из других нечеловеческих видов, включая мыши, ламы, кролика, крысу или хомяка, но не ограничиваясь ими. Альтернативно, антигенсвязывающий участок может происходить из человеческих видов.

Термин «вариабельный» относится к тому факту, что определенные сегменты вариабельных доменов широко отличаются в последовательности среди антител. Домен V опосредует связывание антигена и определяет специфичность конкретного антитела к его конкретному антигену. Однако вариабельность неравномерно распределяется на участке вариабельных доменов из 110 аминокислот. Напротив, V области состоят из инвариантных фрагментов, называемых каркасными областями (FR) из 15-30 аминокислот, разделенных более короткими участками чрезвычайной вариабельности, называемых «гипервариабельными областями» или CDR. Каждый вариабельный домен нативных тяжелых и легких цепей содержит четыре FR, в основном принимающих конфигурацию бета-листов, связанных тремя гипервариабельными областями, которые

образуют петли, связывающие, и в некоторых случаях являющиеся частью бета-складчатой структуры. Гипервариабельные области в каждой цепи удерживаются вместе в тесной близости с помощью FR и с гипервариабельными областями другой цепи вносят вклад в образование антигенсвязывающего сайта антител. Константные домены не принимают непосредственного участия в связывании антитела с антигеном, но проявляют различные эффекторные функции, такие как участие антитела в антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ, ADCC).

Термин «гипервариабельная область» по данному описанию относится к аминокислотным остаткам антитела, которые отвечают за связывание антигена. Обычно гипервариабельная область содержит аминокислотные остатки из «области, определяющей комплементарность» или «CDR», и/или такие остатки из «гипервариабельной петли».

В некоторых случаях может также быть предпочтительным изменение одного или более остатков аминокислот CDR-участков с целью повышения аффинности связывания с целевым эпитопом. Это известно, как «созревание аффинности» и в некоторых случаях может выполняться в связи с гуманизацией, например, в ситуациях, когда гуманизация антитела приводит к снижению специфичности или аффинности связывания, и не представляется возможным в достаточной степени улучшить специфичность или аффинность связывания с помощью только обратных мутаций. Различные методы созревания аффинности известны в данной области техники, например, способ *in vitro* сканирующего насыщающего мутагенеза, описанный Burks et al., Proc Natl Acad Sci USA, 94:412-417 (1997), и способ пошагового *in vitro* созревания аффинности, предложенный Wu et al., Proc Natl Acad Sci USA 95:6037-6042 (1998).

«Каркасные области» (FR) представляют собой остатки вариабельного домена, отличные от CDR остатков. Обычно каждый вариабельный домен имеет четыре FR, определяемые как FR1, FR2, FR3 и FR4. Если CDR определяются согласно Kabat, FR остатки легкой цепи локализуются, приблизительно, в области остатков 1-23 (LCFR1), 35-49 (LCFR2), 57-88 (LCFR3) и 98-107 (LCFR4), а остатки FR тяжелой цепи локализуются, приблизительно, в области остатков 1-30 (HCFR1), 36-49 (HCFR2), 66-94 (HCFR3) и 103-113 (HCFR4) в тяжелой цепи. Если участки CDR содержат аминокислотные остатки из гипервариабельных петель, FR остатки легкой цепи локализуются, приблизительно, в остатках 1-25 (LCFR1), 33-49 (LCFR2), 53-90 (LCFR3) и 97-107 (LCFR4) в легкой цепи, а FR остатки тяжелой цепи локализуются, примерно, в остатках 1-25 (HCFR1), 33-52 (HCFR2), 56-95 (HCFR3) и 102-113 (HCFR4) в остатках тяжелой цепи. В некоторых примерах, когда CDR содержит аминокислоты как из CDR по Kabat, так и аминокислоты из гипервариабельной петли, FR соответствующим образом корректируются. Например, когда CDRH1 включает аминокислоты H26-H35, остатки FR1 тяжелой цепи находятся в положениях 1-25, а остатки FR2 находятся в положениях 36-49.

Кристаллизующийся фрагмент иммуноглобулина (англ. fragment crystallizable region, Fc region, Fc) — это концевая часть молекулы иммуноглобулина, которая взаимодействует с Fc-рецептором на поверхности клетки и с некоторыми белками системы комплемента. Данное свойство позволяет антителам активировать иммунную систему. Fc-участок IgG, IgA и IgD изотипов состоит из двух одинаковых белковых фрагментов, соответственно, второго и третьего константных доменов двух тяжелых цепей; в случае изотипов IgM и IgE Fc содержит

три константных домена тяжелых цепей (домены СН 2-4) в каждой полипептидной цепочке.

Антитело по данному изобретению, «которое связывает» целевой антиген, представляет собой антитело, которое связывает антиген с достаточной аффинностью так, что антитело можно применять в качестве диагностического и/или терапевтического агента при нацеливании на белок или клетку, или ткань, экспрессирующую антиген, и в незначительной степени перекрестно реагирует с другими белками. По данным аналитических методов: сортинга флуоресцентно-активированных клеток (FACS), радиоиммунопреципитации (RIA) или ИФА (ELISA), в таких вариантах изобретения степень связывания антитела с белком, не являющимся «мишенью» (с «нецелевым белком»), составляет менее 10% от связывания антитела с конкретным белком-мишенью. По отношению к связыванию антитела с молекулой-мишенью термин «специфическое связывание» или выражения «специфически связывается с» или «специфический к» конкретному полипептиду или эпитопу на конкретном полипептиде-мишени означает связывание, которое заметно (измеримо) отличается от неспецифического взаимодействия (например, в случае bH1-44 или bH1-81 неспецифическое взаимодействие представляет собой связывание с бычьим сывороточным альбумином, казеином, фетальной бычьей сывороткой или нейтравидином).

Специфическое связывание можно определять количественно, например, определяя связывание молекулы по сравнению со связыванием контрольной молекулы. Например, специфическое связывание можно определять конкурентной реакцией с другой молекулой, аналогичной мишени, например, с избытком немеченой мишени. В этом случае специфическое связывание указывается, если связывание меченой мишени с зондом конкурентно ингибируется избытком немеченой мишени. В данном описании термин «специфическое связывание» или выражения «специфически связывается с» или «специфический к» конкретному полипептиду или эпитопу на конкретном полипептиде-мишени можно характеризовать на примере молекулы, имеющей K_d к мишени по меньшей мере около 200 нМ, или же по меньшей мере около 150 нМ, или же по меньшей мере около 100 нМ, или же по меньшей мере около 60 нМ, или же по меньшей мере около 50 нМ, или же по меньшей мере около 40 нМ, или же по меньшей мере около 30 нМ, или же по меньшей мере около 20 нМ, или же по меньшей мере около 10 нМ, или же по меньшей мере около 8 нМ, или же по меньшей мере около 6 нМ, или же по меньшей мере около 4 нМ, или же по меньшей мере около 2 нМ, или же по меньшей мере около 1 нМ или выше. В одном варианте изобретения термин «специфическое связывание» относится к связыванию, при котором молекула связывается с конкретным полипептидом или эпитопом на конкретном полипептиде, практически не связываясь с каким-либо другим полипептидом или эпитопом на полипептиде.

Термин « K_a », как использовано в данном описании, относится к скорости ассоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген.

Термин « K_d », как использовано в данном описании, относится к скорости диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген.

«Аффинность связывания» обычно относится к силе совокупных нековалентных взаимодействий между единичным сайтом связывания молекулы (например, антитела) и ее партнером по связыванию (например, антигеном). Если не указано иначе, «аффинность связывания» относится к внутренней (характерной, истинной) аффинности связывания, которая отражает 1:1 взаимодействие между

членами пары связывания (например, антителом и антигеном). Аффинность молекулы X к своему партнеру Y обычно можно представить константой диссоциации (K_d). Желательно, чтобы величина K_d составляла, примерно, 200 нМ, 150 нМ, 100 нМ, 60 нМ, 50 нМ, 40 нМ, 30 нМ, 20 нМ, 10 нМ, 8 нМ, 6 нМ, 4 нМ, 2 нМ, 1 нМ или менее. Аффинность можно измерять обычными методами, известными в уровне техники, включая методы по данному описанию. Низкоаффинные антитела обычно медленно связываются с антигеном и имеют тенденцию легко диссоциировать, тогда как высокоаффинные антитела обычно быстрее связывают антиген и имеют тенденцию дольше оставаться в связанном состоянии. В уровне техники известны различные методы измерения аффинности связывания, любой из этих методов можно использовать для целей настоящего изобретения.

В одном варианте изобретения « K_d » или «величину K_d » по данному изобретению измеряют методами поверхностного плазмонного резонанса на приборе BIAcore™-2000 или BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) при 25°C, используя чипы с иммобилизованным антигеном CM5 при ~10 относительных единицах (единицах отклика, RU). Коротко говоря, биосенсорные чипы с карбоксиметилдекстраном (CM5, BIAcore Inc.) активируют гидрохлоридом N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)-карбодиимида (EDC) и N-гидроксисукцинимидом (NHS) в соответствии с инструкциями производителя. Антиген разводят 10 мМ раствором ацетата натрия, pH 4.8, до концентрации 5 мкг/мл (~0.2 мкМ), а затем вводят (инъекция) при скорости потока 5 мкл/минута до достижения, примерно, 10 относительных единиц (RU) связанного белка. После введения антигена вводят 1 М раствор этаноламина, чтобы блокировать непрореагировавшие группы. Для кинетических измерений двукратные серийные разведения Fab (например, от 0.78 нМ до 500 нМ) вводят в PBS с 0.05% Tween 20 (PBST) при 25°C при скорости потока, примерно, 25 мкл/мин. Величины скорости ассоциации (k_{on}) и скорости диссоциации (k_{off}) рассчитывают, применяя простую модель Ленгмюра для связывания один-плюс-один (BIAcore Evaluation Software версия 3.2), с помощью одновременного получения сенсограммы ассоциации и диссоциации. Константу равновесной диссоциации (K_d) рассчитывают как отношение k_{off}/k_{on} . См., например, Chen, Y., et al., (1999) J. Mol. Biol. 293: 865-881. Если по данным вышеуказанного метода поверхностного плазмонного резонанса скорость ассоциации превышает $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ сек}^{-1}$, тогда ее можно определять методом тушения флуоресценции, который измеряет увеличение или уменьшение интенсивности флуоресцентной эмиссии (возбуждение=295 нм; эмиссия (излучение)=340 нм, полоса 16 нм) при 25°C раствора антитела против антигена (Fab форма) с концентрацией 20 нМ в PBS, pH 7.2, в присутствии увеличивающихся концентраций антигена, измеряемых с помощью спектрометра, такого как спектрофотометр остановленного потока (Aviv Instruments) или спектрофотометр SLM-Aminco (ThermoSpectronic) серии 8000 с кюветой с перемешиванием.

Термин « k_{off} » относится к константе скорости диссоциации конкретного взаимодействия связывающей молекулы и антигена. Константу скорости диссоциации k_{off} можно измерить посредством биослойной интерферометрии, например, с помощью системы Octet™.

«Скорость ассоциации» («on-rate») или « k_{on} » по данному изобретению можно также определять тем же самым описанным выше методом поверхностного плазмонного резонанса на приборе BIAcore™-

2000 или BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) при 25°C, используя чипы с иммобилизованным антигеном CM5 при ~10 относительных единицах (единицах отклика, RU). Коротко говоря, биосенсорные чипы с карбоксиметилдекстраном (CM5, BIAcore Inc.) активируют гидрохлоридом N-этил-N'-(3-диметиламино пропил)-карбодиимида (EDC) и N-гидроксисукцинимидом (NHS) в соответствии с инструкциями производителя. Антиген разводят 10 mM раствором ацетата натрия, pH 4.8, до концентрации 5 мкг/мл (~0.2 мкМ), а затем вводят (инъекция) при скорости потока 5 мкл/минута до достижения, примерно, 10 относительных единиц (RU) связанного белка. После введения антигена вводят 1 M раствор этаноламина, чтобы блокировать непрореагировавшие группы.

Если специально не указано иначе, выражения «биологически активный», и «биологическая активность», и «биологические характеристики», по отношению к полипептиду по данному изобретению, означают обладание способностью связываться с биологической молекулой.

Выражение «биологическая молекула» относится к нуклеиновой кислоте, белку, углеводу, липиду и их комбинации. В одном варианте изобретения биологическая молекула существует в природе.

Участки антител, такие как Fab- и F (ab')₂-фрагменты, могут быть получены из целых антител с использованием традиционных методов, таких как папаиновый или пепсиновый гидролиз целых антител. Более того, антитела, части антител и молекулы иммунотадгезии могут быть получены с использованием стандартных методов рекомбинантной ДНК, например, как описано в настоящем документе.

Термин «рекомбинантное антитело» означает антитело, которое экспрессируется в клетке или клеточной линии, содержащей нуклеотидную последовательность (нуклеотидные последовательности), которая кодирует антитела, при этом указанная нуклеотидная последовательность (нуклеотидные последовательности) не ассоциирована с клеткой в природе.

Термин «вариантное» антитело, используемый в данном документе, относится к антителу, имеющему аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности его «родительского» антитела путем добавления, удаления и/или замены одного или более аминокислотных остатков относительно последовательности родительского антитела. В предпочтительном варианте осуществления изобретения вариантное антитело содержит по меньшей мере одно или более (например, от одного до двенадцати, например, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь или девять, десять, одиннадцать или двенадцать; и в некоторых вариантах осуществления изобретения от одного до примерно десяти) добавлений, делеций и/или замен аминокислот относительно родительского антитела. В некоторых вариантах осуществления изобретения добавления, делеции и/или замены осуществляются на CDR-участках вариантного антитела. Идентичность или гомология по отношению к последовательности вариантного антитела определяется в настоящем документе как процент аминокислотных остатков в последовательности вариантного антитела, которые идентичны остаткам родительского антитела, после выравнивания последовательностей и введения гэпов, если это необходимо, для достижения максимального процента идентичности последовательности. Вариантное антитело сохраняет способность связываться с тем же антигеном, и предпочтительно эпитопом, с которым

связывается родительское антитело, и в некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере одно свойство или биологическая активность превосходит аналогичные свойства родительского антитела. Например, вариантное антитело может иметь, например, более выраженную аффинность связывания, более длительный период полувыведения, более низкое значение ИК50 или повышенную способность подавлять биологическую активность антигена по сравнению с родительским антителом. Особый интерес в настоящем документе представляет вариантное антитело, показывающее биологическую активность, превышающую по меньшей мере в 2 раза (предпочтительно, по меньшей мере в 5 раз, 10 раз или 20 раз) биологическую активность родительского антитела.

Термин «биспецифическое антитело» означает антитело, содержащее антигенсвязывающий домен или антигенсвязывающие домены, которые способны к специфическому связыванию с двумя различными эпитопами на одной биологической молекуле или способны к специфическому связыванию с эпитопами на двух различных биологических молекулах. Биспецифическое антитело также упоминается в настоящем документе, как обладающее «двойной специфичностью» или как являющееся антителом с «двойной специфичностью».

Термин «химерное антитело» относится в широком смысле к антителу, которое содержит одну или более областей из одного антитела, и одну или более областей из одного или нескольких других антител, как правило, антитело, частично человеческого происхождения и частично нечеловеческого происхождения, то есть полученное частично из не относящегося к человеку животного, например, мыши, крысы или другого грызуна или верблюдовых, таких как лама или альпака. Химерные антитела являются предпочтительными по сравнению с нечеловеческими антителами для того, чтобы снизить риск иммунного ответа, направленного против антител у человека, например, ответа, направленного против мышинных антител у человека в случае мышиног антитела. Примером типичного химерного антитела является то, в котором последовательности вариабельного участка являются мышинными, в то время как последовательности константного участка являются человеческими. В случае химерного антитела нечеловеческие части могут быть подвергнуты дальнейшему изменению с целью гуманизации антитела.

Термин «гуманизация» относится к факту, что когда антитело имеет полностью или частично нечеловеческое происхождение, например, антитело мыши или ламы, полученное при иммунизации мышей или лам, соответственно, с представляющим интерес антигеном, или является химерным антителом на основе такого антитела мыши или ламы, можно заменить некоторые аминокислоты, например, в каркасных областях и константных доменах тяжелой и легкой цепей, с тем чтобы избежать или свести к минимуму иммунный ответ у человека. Специфичность взаимодействия антитела с антигеном-мишенью присуща главным образом аминокислотным остаткам, расположенных в шести CDR-участках тяжелой и легкой цепи. Поэтому аминокислотные последовательности внутри CDR-участков, являются гораздо более вариабельными между отдельными антителами, по сравнению с последовательностями вне CDR-участков. Поскольку последовательности CDR участков отвечают за большинство антитело-антиген взаимодействий, можно экспрессировать рекомбинантные антитела, которые имитируют свойства специфического природного антитела, или в более общем плане какого-либо

специфического антитела с данной аминокислотной последовательностью, например, путем конструирования экспрессионных векторов, которые экспрессируют последовательности CDR-участков из специфического антитела и каркасные последовательности другого антитела. В результате, можно «гуманизировать» нечеловеческое антитело и в значительной степени сохранить специфичность связывания и аффинность исходного антитела. Несмотря на то, что невозможно точно предсказать иммуногенность и тем самым иммунный ответ, направленный против антитела у человека на конкретное антитело, нечеловеческие антитела, как правило, более иммуногенны, чем человеческие антитела. Химерные антитела, у которых инородные (например, грызуна или верблюда) константные участки были заменены последовательностями человеческого происхождения, показали в целом более низкую иммуногенность, чем антитела полностью инородного происхождения, и существует тенденция использовать в терапевтических антителах гуманизированные или полностью человеческие антитела. Химерные антитела или другие антитела нечеловеческого происхождения, таким образом, могут быть гуманизированы, чтобы снизить риск иммунного ответа, направленного против антитела, у человека.

Для химерных антител, гуманизация обычно включает в себя модификацию каркасных участков последовательностей переменного участка. Аминокислотные остатки, которые являются частью участков, определяющих комплементарность (CDR участков), чаще всего не будут изменяться в связи с гуманизацией, хотя в некоторых случаях это может быть желательным, чтобы изменить отдельные аминокислотные остатки CDR-участка, например, чтобы удалить участок гликозилирования, участок дезамидирования, участок изомеризации аспартата или нежелательный остаток цистеина или метионина. N-связанное гликозилирование происходит путем присоединения олигосахаридной цепи к остатку аспарагина в трипептидной последовательности Asn-X-Ser или Asn-X-Thr, где X может быть любой аминокислотой, кроме Pro. Удаление участка N-гликозилирования может быть достигнуто путем мутирования Asn или Ser/Thr остатка другим остатком, предпочтительно путем консервативной замены. Дезамидирование остатков аспарагина и глутамина может происходить в зависимости от таких факторов, как pH и обнажение поверхности. Остатки аспарагина особенно восприимчивы к дезамидированию, прежде всего, если они присутствуют в последовательности Asn-Gly, и в меньшей степени в других дипептидных последовательностях, таких как Asn-Ala. При наличии такого дезамидированного участка, например, Asn-Gly в последовательности CDR-участка, может быть предпочтительным удалить этот участок, как правило, путем консервативной замены для удаления одного из вовлеченных остатков.

В данной области техники известны многочисленные способы гуманизации последовательности антитела. Одним из наиболее часто используемых методов является трансплантация CDR-участков. Трансплантация CDR участка может быть основана на определениях CDR-участков по Kabat, хотя в более поздней публикации (Magdelaine-Beuzelin et al., Crit Rev.Oncol Hematol. 64:210-225 (2007)) предполагается, что определение по IMGT® (the international Immunogenetics information system®, www.imgt.org) может улучшить результат гуманизации (см Lefranc et al., Dev. Comp Immunol. 27:55-77 (2003)). В некоторых случаях, трансплантация CDR-участка может уменьшить специфичность и аффинность связывания, и, следовательно,

биологическую активность, в CDR трансплантированном нечеловеческом антителе, по сравнению с родительским антителом, из которого получены CDR-участки. Обратные мутации (иногда именуемые «ремонт каркасного участка»), могут применяться в выбранных положениях CDR трансплантированного антитела, как правило, в каркасных участках, для того, чтобы восстановить специфичность и аффинность связывания родительского антитела. Определение позиций для возможных обратных мутаций может быть выполнено с использованием информации, имеющейся в литературе и в базах данных антител. Аминокислотные остатки, которые являются кандидатами для обратных мутаций, как правило, расположены на поверхности молекулы антитела, в то время как остатки, которые углублены или имеют низкую степень обнажения поверхности обычно не будут подвержены изменениям. Метод гуманизации, альтернативный трансплантации CDR-участка и обратной мутации, представляет собой изменение поверхности, при котором неэкспонированные на поверхности остатки нечеловеческого происхождения, сохраняются, в то время как экспонированные на поверхности остатки изменяются в человеческие остатки.

Существует две технологии получения полностью человеческих антител: с использованием *in vitro* собранных фаговых библиотек или *in vivo* иммунизацией гуманизированных животных (мышей, крыс и т.д.).

Конструирование комбинаторных фаговых библиотек антител начинается с выбора источника генного репертуара, в зависимости от которого можно выделить несколько видов библиотек антител: наивные, иммунные или синтетические. Наивные и иммунные библиотеки конструируют, используя естественным образом реорганизованные гены, кодирующие вариабельные домены иммуноглобулинов здоровых или иммунных к какому-либо антигену доноров, соответственно. Для этого выделяют мРНК клеток лимфоидного ряда, продуцирующих антитела. Чаще всего это лимфоциты периферической крови, но в некоторых случаях используют спленоциты [Sheets MD, Amersdorfer P, Finnern R, Sargent P, Lindquist E, Schier R, et al. Efficient construction of a large nonimmune phage antibody library: the production of high-affinity human single-chain antibodies to protein antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998,95:6157-6162 и de Haard HJ, van Neer N, Reurs A, Hufton SE, Roovers RC, Henderikx P, et al. A large non-immunized human Fab fragment phage library that permits rapid isolation and kinetic analysis of high affinity antibodies. *J Biol Chem* 1999,274:18218-18230.], клетки миндалин или лимфоциты костного мозга [Vaughan TJ, Williams AJ, Pritchard K, Osbourn JK, Pope AR, Earnshaw JC, et al. Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library. *Nat Biotechnol* 1996,14:309-314.]. На основе мРНК синтезируют кДНК, при этом для праймирования реакции могут быть взяты олиго-dT праймеры и статистические гексаолигонуклеотиды, что позволяет получать кДНК копии всех возможных вариантов генов, кодирующих вариабельные домены антител [Улитин АБ, Капралова МВ, Ламан АГ, Шепеляковская АО, Булгакова ЕВ, Фурсова КК, et al. Библиотека миниантител человека в формате фагового дисплея. Создание и апробация. ДАН: Изд-во «Наука»; 2005.].

Сразу могут использоваться один или несколько праймеров, ограничивающих набор амплифицируемых генов до одного или нескольких семейств генов вариабельных доменов или изотипов антител уже на уровне кДНК [Marks JD, Hoogenboom HR, Bonnert TP, McCafferty J,

Griffiths AD, Winter G. Bypassing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. J Mol Biol 1991, 222:581-597]. Праймеры, используемые для амплификации генов, кодирующих иммуноглобулины, комплементарны их наиболее консервативным участкам. Их последовательности выбирают из коллекций генов, которые организованы в базы данных, такие как база данных Kabat или V BASE. Дизайн праймеров также предусматривает наличие в них внутренних сайтов рестрикции, позволяющих клонировать ПЦР продукты в состав соответствующих векторов.

Конструирование синтетических библиотек основано на замене природных CDR на набор случайных последовательностей, что позволяет создавать огромное разнообразие антигенсвязывающих сайтов.

Фаговый дисплей является первой и самой широко распространенной *in vitro* технологией для поиска антител. В 1985 году Смит обнаружил, что последовательности чужеродной ДНК могут быть клонированы в нитевидный бактериофаг M13 таким образом, что клонированные последовательности генов экспрессируются на поверхности фаговых частиц как слитые белки (Smith GP: Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. Science 1985, 228:1315-1317.). Таким образом, можно проводить селекцию интересующих нас слитых белков на основе их способности связывать другие белки. Это открытие было скомбинировано с методами ПЦР-амплификации, что позволило клонировать кДНК репертуар генов иммуноглобулинов для создания разнообразных фаговых библиотек, содержащих вариативные домены, которые могут быть использованы для быстрого поиска мишень-специфичных моноклональных антител. Репертуар фаговых библиотек отражает репертуар антител В-лимфоцитов каждого человека или животного, кровь которого была использована при создании библиотеки. В 1995 году две статьи сообщили о создании генетически сконструированных мышей, которые экспрессировали полностью человеческие антитела, репертуар которых может быть сопоставим с полученным гибридомной технологией (Lonberg N, Taylor LD, Harding FA, Trumbull M, Higgins KM, Schramm SR, Kuo CC, Mashayekh R, Wymore K, McCabe JG et al.: Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications. Nature 1994, 368:856-859) У этих животных были целенаправленно разрушены гены своих собственных эндогенных тяжелых и κ легких цепей иммуноглобулинов и введены трансгены, представляющие собой сегменты генов тяжелых и κ легких цепей человека. Оказалось, что репертуар генов человека может быть использован мышью иммунной системой для создания высокоспецифичных и высокоаффинных антител ко большому разнообразию антигенов. Несмотря на то, что трансгенные мыши экспрессируют В-клеточные рецепторы, которые по существу являются гибридными мышинными и человеческими (человеческий иммуноглобулин, мышинные Ig α , Ig β и другие сигнальные молекулы), их В-клетки нормально развиваются и созревают.

Термин «моноклональное антитело» или «mAb» относится к антителу, которое синтезировано и выделено отдельной клональной популяцией клеток. Клональная популяция может быть клональной популяцией иммортализованных клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения иммортализованные клетки в клональной популяции являются гибридными клетками, гибридами, которые обычно получают путем слияния отдельных В-лимфоцитов от иммунизированных животных с отдельными клетками лимфоцитарной опухоли. Гибридомы

представляют собой тип сконструированных клеток и не встречаются в природе.

«Нативные антитела» обычно являются гетеротетрамерными гликопротеидами с молекулярной массой примерно 150000 дальтон, состоящие из двух идентичных легких (L) цепей и двух идентичных тяжелых (H) цепей. Каждая легкая цепь связана с тяжелой цепью одной ковалентной дисульфидной связью, тогда как количество дисульфидных связей между тяжелыми цепями варьирует в разных изоформах иммуноглобулинов. Каждая тяжелая и легкая цепь также имеет равномерно расположенные внутрицепочечные дисульфидные мостики. Каждая тяжелая цепь имеет на одном конце вариабельный домен (VH), за которым следует несколько константных доменов. Каждая легкая цепь имеет вариабельный домен на одном конце (VL) и константный домен на другом конце. Константный домен легкой цепи выровнен с первым константным доменом тяжелой цепи, и вариабельный домен легкой цепи выровнен с вариабельным доменом тяжелой цепи. Полагают, что конкретные аминокислотные остатки образуют поверхность раздела между вариабельными доменами легкой цепи и тяжелой цепи.

Определение «выделенный» («изолированный»), применяемое для описания различных антител по данному описанию, означает антитело, идентифицированное и выделенное и/или регенерированное из клетки или клеточной культуры, в которой оно экспрессируется. Примеси (загрязняющие компоненты) из природной среды представляют собой материалы, которые, как правило, мешают диагностическому или терапевтическому применению полипептида, и могут включать ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворенные вещества. В предпочтительных вариантах изобретения антитело очищают (1) до степени, достаточной для получения по меньшей мере 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности, при использовании секвенатора с вращающейся стеклянной чашечкой (секвенатора Эдмана), или (2) до гомогенности методом SDS-PAGE в невозстанавливающих или восстанавливающих условиях с применением окрашивания Кумасси бриллиантовым голубым или, предпочтительно, серебром. Выделенное антитело включает антитела *in situ* внутри рекомбинантных клеток, так как по меньшей мере один компонент природной среды полипептида отсутствует. Обычно выделенный полипептид получают в результате по меньшей мере одной стадии очистки.

«Выделенная» молекула нуклеиновой кислоты представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, которая идентифицирована и отделена от по меньшей мере одной молекулы нуклеиновой кислоты-примеси, с которой она обычно связана в естественном источнике нуклеиновой кислоты антитела. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты отличается от той формы или набора, в которых она находится в естественных условиях. Таким образом, выделенная молекула нуклеиновой кислоты отличается от молекулы нуклеиновой кислоты, существующей в клетках в естественных условиях. Однако выделенная молекула нуклеиновой кислоты включает молекулу нуклеиновой кислоты, находящуюся в клетках, в которых в норме происходит экспрессия антитела, например, в случае, если молекула нуклеиновой кислоты имеет локализацию в хромосоме, отличную от ее локализации в клетках в естественных условиях.

Термин «эпитоп» при использовании в данном документе относится к части (детерминанте) антигена, который специфически связывается со

связывающей молекулой (например, и антитело или родственная молекула, такие как биспецифичная связывающая молекула). Эпитопные детерминанты обычно состоят из химически активных поверхностных групп молекул, таких как аминокислоты или углеводы, или боковые цепи сахаров, и, как правило, имеют специфические трехмерные структурные характеристики, а также специфические характеристики зарядов. Эпитоп может быть «линейным» или «конформационным.» В линейном эпитопе, все точки взаимодействия между белком (например, антиген) и взаимодействующей молекулой (такой как антитело) происходит линейно вдоль первичной аминокислотной последовательности белка. В конформационном эпитопе, точки взаимодействия происходят через аминокислотные остатки на белке, отделенные друг от друга в первичной аминокислотной последовательности. Когда желаемый эпитоп антигена определен, можно генерировать антитела к этому эпитопу с использованием методик, хорошо известных в данной области техники. Кроме того, генерация и характеристика антител или других связывающих молекул могут пролить свет на информацию о желательных эпитопах. Основываясь на этой информации, можно затем конкурентно скринировать связывающие молекулы для связывания с теми же или аналогичными эпитопами, например, путем проведения исследований конкуренции, чтобы найти связывающие молекулы, которые конкурируют за связывание с антигеном.

Термин «пептидный линкер» в настоящем документе означает любой пептид с возможностью соединения доменов с длиной в зависимости от доменов, которые он связывает между собой, содержащий любую аминокислотную последовательность. Предпочтительно пептидный линкер имеет длину более 5 аминокислот и состоит из любого набора аминокислот, выбранного из G, A, S, P, E, T, D, K.

Термин «in vitro» относится к биологическому объекту, биологическому процессу или биологической реакции вне организма, смоделированному в искусственных условиях. Например, рост клеток in vitro должен пониматься как рост клеток в среде вне организма, например, в пробирке, культуральном флаконе или микропланшете.

Термин «IC₅₀» (50% ингибирующая концентрация) относится к концентрациям препарата, при которых измеряемая активность или отклик, например, рост или пролиферация клеток, таких как опухолевые клетки, ингибируется на 50%. Значение IC₅₀ может оцениваться с помощью соответствующих кривых зависимости ответа от логарифма дозы, с использованием специальных статистических программ для обработки кривых.

Термин «IC₅₀» (50% ингибирующая концентрация или концентрация полумаксимального ингибирования) относится к концентрациям препарата и показывает сколько вещества ингибитора необходимо для ингибирования биологического процесса на 50%. Значение IC₅₀ может оцениваться с помощью соответствующих кривых зависимости ответа от логарифма дозы, с использованием специальных статистических программ для обработки кривых.

Термин GI50 (50% ингибирование роста) относится к концентрациям препарата, при которых пролиферация клеток, таких как опухолевые клетки, ингибируется на 50%.

Термин ED50 (EC50) (50% эффективная доза/концентрация) относится к концентрациям препарата, при которых измеряемый

биологический эффект достигается на 50% (может включать цитотоксичность).

Термин «антипролиферативное действие» подразумевает остановку или ингибирование роста пролиферирующих клеток, таких как раковые клетки.

Понятие «эффекторная функция» антитела относится к видам биологической активности, связанным с Fc-областью (нативной последовательностью Fc-области или с вариантами аминокислотной последовательности Fc-области) антитела, и варьируют в зависимости от изотипа антитела. Примерами эффекторных функций антитела являются: Cl_q - связывание; комплементзависимая цитотоксичность; связывание Fc-рецептора; антитело-зависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (ADCC); фагоцитоз; понижающая регуляция рецепторов клеточной поверхности (например, В-клеточного рецептора, BCR) и В-клеточная активация.

«Антитело-зависимая клеточная цитотоксичность» или «ADCC» относится к опосредованному клетками ответу, при котором неспецифические цитотоксические клетки, которые экспрессируют рецепторы Fc (FcR) (например, природные клетки-киллеры (NK), нейтрофилы и макрофаги), узнают связанное антитело на клетке-мишени и затем вызывают лизис или фагоцитоз клетки-мишени. Первичные клетки для опосредования ADCC, NK-клетки, экспрессируют только Fc γ RIII, тогда как моноциты экспрессируют Fc γ RI, Fc γ RII и Fc γ RIII. Экспрессия FcR на гематопозитических клетках суммирована в таблице 3 на странице 464 в публикации Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9: 457-92 (1991). Чтобы оценить активность в ADCC представляющей интерес молекулы можно осуществить анализы ADCC *in vitro*, такие как анализы, описанные в патентах США № 5500362 или 5821337. Применимые эффекторные клетки для таких анализов включают моноклеарные клетки периферической крови (PBMC) и природные клетки-киллеры (NK). Альтернативно или дополнительно ADCC-активность представляющей интерес молекулы можно оценить *in vivo*, например, в животной модели, такой как модель, описанная в Clynes et al. *PNAS (USA)* 95: 652-656 (1998).

«Эффекторными клетками человека» являются лейкоциты, которые экспрессируют один или несколько FcR и осуществляют эффекторные функции. Предпочтительно клетки экспрессируют, по меньшей мере, Fc γ RIII и осуществляют ADCC-эффекторную функцию. Примеры лейкоцитов человека, которые опосредуют ADCC, включают моноклеарные клетки периферической крови (PBMC), природные клетки-киллеры (NK), моноциты, цитотоксические Т-клетки и нейтрофилы; при этом предпочтительны PBMC и NK-клетки. Эффекторные клетки могут быть выделены из их природного источника, например из крови или PBMC, как описано в настоящей публикации.

Термины «Fc-рецептор» и «FcR» используют для описания рецептора, который связывается с Fc-областью антитела. Предпочтительным FcR является FcR человека с нативной последовательностью. Кроме того, предпочтительным FcR является FcR, который связывает IgG-антитело (гамма-рецептор), и к предпочтительным рецепторам относятся рецепторы подклассов Fc γ RI, Fc γ RII и Fc γ RIII, включая аллельные варианты и альтернативно сплайсируемые формы указанных рецепторов. Рецепторы Fc γ RII включают Fc γ RIIA («активирующий рецептор») и Fc γ RIIB («ингибирующий рецептор»), которые имеют сходные аминокислотные последовательности,

которые отличаются главным образом своими цитоплазматическими доменами. Активирующий рецептор FcγRIIA содержит в своем цитоплазматическом домене основанный на тирозине мотив активации иммунорецептора (ITAM). Ингибирующий рецептор FcγRIIB содержит в своем цитоплазматическом домене основанный на тирозине мотив ингибирования иммунорецептора (ITIM) (см. обзор в Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15: 203-234 (1997)). Обзор, посвященный FcR, представлен в Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991). Другие FcR, включая FcR, которые будут идентифицированы в будущем, включены в настоящем описании в термин «FcR». Термин также включает неонатальный рецептор, FcRn, который отвечает за перенос материнских IgG в плод.

«Комплемент-зависимая цитотоксичность» и «CDC» относятся к способности молекулы лизировать мишень в присутствии комплемента. Путь активации комплемента инициируется связыванием первого компонента системы комплемента (C1q) с молекулой (например, антителом) в комплексе со своим антигеном. Чтобы оценить активацию комплемента можно осуществить анализ CDC, например, как описано в Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202: 163 (1996).

Термин «идентичность» или «гомологичность» следует толковать как означающее процентное содержание остатков аминокислот в кандидатной последовательности, которые идентичны остаткам соответствующей последовательности, с которой ее сравнивают, после сравнения последовательностей и введения «брешей», если необходимо достичь максимального процента идентичности для полной последовательности и не учитывая любые консервативные замещения как часть идентичности последовательности. Ни N- или C-концевой удлиняющей, ни инсерционные сегменты не следует толковать как уменьшающие идентичность или гомологичность. Методы и компьютерные программы для сравнения хорошо известны. Идентичность последовательности можно определить, используя программное обеспечение для анализа последовательности (например, Sequence Analysis Software Package, Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Ave., Madison, WI 53705). Данное программное обеспечение подходит для подобных последовательностей путем определения степени гомологичности для разнообразных замещений, делеций (элиминирований) и других модификаций.

Фразу «гомологичный», что касается полипептидной последовательности антитела, следует толковать как антитело, проявляющее по крайней мере, 70%-ную, предпочтительно 80%-ную, более предпочтительно 90%-ную и наиболее предпочтительно 95%-ную идентичность последовательности относительно полипептидной последовательности. Термин в отношении последовательности нуклеиновой кислоты следует толковать как последовательность нуклеотидов, проявляющих, по крайней мере, 85%-ную, предпочтительно 90%-ную, более предпочтительно 95%-ную и наиболее предпочтительно 97%-ную идентичность последовательности относительно последовательности нуклеиновой кислоты.

Предлагается модификация(и) аминокислотных последовательностей антител, описанных в настоящей публикации. Например, может быть желательным улучшение аффинности связывания и/или других биологических свойств антитела. Варианты аминокислотной последовательности антитела получают введением соответствующих

изменений нуклеотидов в нуклеиновую кислоту антитела или пептидным синтезом. Такие модификации включают, например, делеции, и/или инсерции, и/или замены остатков в аминокислотных последовательностях антитела. Осуществляют любое сочетание делеции, инсерции и замены, чтобы получить конечную конструкцию, при условии, что конечная конструкция обладает требуемыми характеристиками. Изменения аминокислот также могут изменять посттрансляционные процессы в антителе, такие как изменение количества или положения сайтов гликозилирования.

Вариант модификации аминокислотных последовательностей антител с помощью аминокислотных замен. Такой вариант представляет собой замену, по меньшей мере, одного аминокислотного остатка в молекуле антитела на другой остаток. Места, представляющие наибольший интерес для мутагенеза путем замен, включают гипервариабельные области или CDR, но также предполагаются изменения и в области FR или Fc. Консервативные замены показаны в таблице А под заголовком «предпочтительные замены». Если такие замены приводят к изменению биологической активности, то могут быть введены дополнительные существенные изменения, названные «примерами заменам» в таблице А, или изменения, дополнительно описанные ниже при описании классов аминокислот, и может быть проведен скрининг продуктов.

Таблица А		
Исходный остаток	Примеры замены	Предпочтительные замены
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gin; Asn	Lys
Asn (N)	Gin; His; Asp, Lys; Arg	Gin
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gin	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gin; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Норлейцин	Leu
Leu (L)	Норлейцин; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gin; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Норлейцин	Leu

Термины «нуклеиновая кислота», «нуклеиновая последовательность» или «нуклеиновокислотная последовательность», «полинуклеотид», «олигонуклеотид», «полинуклеотидная последовательность» и «нуклеотидная последовательность», которые используются равнозначно в данном описании, обозначают четкую последовательность нуклеотидов, модифицированных или не модифицированных, определяющую фрагмент или участок нуклеиновой кислоты, содержащую или не содержащую неприродные нуклеотиды и являющуюся либо двухцепочечной ДНК или РНК, либо одноцепочечной ДНК или РНК, либо продуктами транскрипции указанных ДНК.

Здесь также следует упомянуть, что данное изобретение не относится к нуклеотидным последовательностям в их природной хромосомной среде, т.е. в природном состоянии. Последовательности данного изобретения были выделены и/или очищены, т.е. были взяты прямо или косвенно, например, путем копирования, при этом их среда была по меньшей мере частично модифицирована. Таким образом, также здесь следует подразумевать изолированные нуклеиновые кислоты, полученные путем генетической рекомбинации, например, с помощью принимающих клеток (клеток-хозяев), или полученные путем химического синтеза.

Ссылка на нуклеотидную последовательность охватывает его комплимент, если не указано иное. Таким образом, ссылка на нуклеиновую кислоту, имеющую определенную последовательность следует понимать как охватывающие ее комплементарную цепь с ее комплементарной последовательностью.

Выражение «контролирующие последовательности» относится к последовательностям ДНК, необходимым для экспрессии функционально связанной кодирующей последовательности в определенном организме-хозяине. Пригодные для прокариот контролирующие последовательности представляют собой, например, промотор, необязательно оператор и сайт связывания рибосомы. Как известно, в эукариотических клетках присутствуют промоторы, сигналы полиаденилирования и энхансеры.

Нуклеиновая кислота «функционально связана», если она находится в функциональной связи с другой нуклеотидной последовательностью. Например, ДНК предпоследовательности или секреторной лидерной последовательности функционально связывают с ДНК полипептида, если он экспрессируется в виде предпротеина, который принимает участие в секреции полипептида; промотор или энхансер функционально связывают с кодирующей последовательностью, если он оказывает воздействие на транскрипцию последовательности; сайт связывания рибосомы функционально связывают с кодирующей последовательностью, если он расположен так, что может облегчать трансляцию. Как правило, «функционально связан» обозначает, что связанные последовательности ДНК являются смежными, а в случае секреторной лидерной последовательности являются смежными и находятся в фазе считывания. Однако энхансеры не обязательно должны быть смежными.

Термин «вектор» при использовании в настоящем документе означает молекулу нуклеиновой кислоты, способную транспортировать другую нуклеиновую кислоту, с которой она соединена. В некоторых вариантах осуществления изобретения вектор представляет собой плазмиду, т.е. кольцевую двухцепочечную часть ДНК, в которую могут быть лигированы дополнительные сегменты ДНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения вектор представляет собой вирусный вектор,

в котором дополнительные сегменты ДНК могут быть лигированы в вирусный геном. В некоторых вариантах осуществления изобретения векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они введены (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальный сайт инициации репликации и эписомные векторы млекопитающих). В других вариантах осуществления изобретения векторы (например, неэписомальные векторы млекопитающих) могут быть интегрированы в геном клетки-хозяина при введении в клетку-хозяина, и таким образом реплицируются вместе с геном хозяина. Более того, некоторые векторы способны направлять экспрессию генов, с которыми они функционально соединены. Такие векторы упоминаются в данном документе как «рекомбинантные экспрессирующие векторы» (или просто «экспрессирующие векторы»).

Термин «рекомбинантная клетка-хозяин» (или просто «клетка-хозяин») при использовании в данном документе означает клетку, в которую введен рекомбинантный экспрессионный вектор. Настоящее изобретение относится к клеткам-хозяевам, которые могут включать, например, вектор в соответствии с настоящим изобретением, описанным выше. Настоящее изобретение относится также к клеткам-хозяевам, которые включают, например, нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь или ее антигенсвязывающие части, нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь или ее антигенсвязывающие части, или обе из них, первого связывающего домена и/или второго связывающего домена связывающей молекулы по данному изобретению. Следует понимать, что «рекомбинантная клетка-хозяин» и «клетка-хозяин» означают не только конкретную заявленную клетку, но также и потомство такой клетки. Поскольку модификации могут проходить в последующих поколениях вследствие мутации или воздействий окружающей среды, такое потомство не может, на самом деле, быть идентичным родительской клетке, но такие клетки по-прежнему включены в объем термина «клетка-хозяин» при использовании в настоящем документе.

Термин «эксципиент» используется в данном документе для описания любого ингредиента, отличающегося от соединения(-ий) по данному изобретению.

Термин «заболевание или нарушение, опосредованное CD20» подразумевает все заболевания или нарушения, которые либо прямо, либо косвенно связаны с CD20, включая этиологию, развитие, прогресс, персистентность или патологию заболевания или нарушения. «Лечить», «лечение» и «терапия» относятся к методу смягчения или устранения биологического расстройства и/или по меньшей мере одного из сопутствующих ему симптомов. Используемый в данном документе, термин «облегчить» болезнь, заболевание или состояние, означает уменьшение тяжести и/или частоты возникновения симптомов заболевания, расстройства или состояния. Кроме того, содержащиеся в данном документе ссылки на «лечение» включает ссылки на лечебную, паллиативную и профилактическую терапию.

В одном аспекте субъект лечения или пациент является млекопитающим, предпочтительно человеческим субъектом. Вышеупомянутый субъект может быть мужского или женского пола любого возраста.

Термин «нарушение» означает любое состояние, которое можно улучшить в результате лечения по настоящему изобретению. В определение данного термина входят хронические и острые нарушения

или заболевания, включающие в себя патологические состояния, которые вызывают предрасположенность млекопитающего к возникновению данного нарушения.

Термины «рак» или «раковый» относятся к физиологическому состоянию или описывают физиологическое состояние у млекопитающих, которое, как правило, характеризуется нерегулируемым(/-ой) ростом/пролиферацией клеток. Это определение охватывает доброкачественные и злокачественные раковые заболевания. Примеры раковых заболеваний включают, но без ограничения, карциному, лимфому, бластому, саркому и лейкоз. Более конкретные примеры таких раковых заболеваний включают плоскоклеточный рак, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, аденокарциному легкого, плоскоклеточную карциному легкого, рак брюшины, печеночноклеточный рак, рак желудка, включая рак ЖКТ, рак поджелудочной железы, глиобластому, глиому, цервикальный рак, рак яичника, рак печени, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак толстой кишки, колоректальный рак, карциному эндометрия и матки, карциному слюнных желез, рак почки (почечноклеточную карциному), рак предстательной железы (рак простаты), рак наружных женских половых органов, рак щитовидной железы, печеночную карциному, карциному анального канала, карциному пениса, меланому и различные типы рака головы и шеи.

Термины «иммунный ответ», «аутоиммунная реакция», «аутоиммунное воспаление» относятся, например, к действию лимфоцитов, антиген-представляющих клеток, фагоцитирующих клеток, гранулоцитов и растворимых макромолекул, вырабатываемых указанными клетками или клетками печени (включая антитела, цитокины и комплемент, образующиеся в результате селективного повреждения, разрушения или элиминации из человеческого организма инвазивных патогенов, клеток или тканей, инфицированных патогенами, раковых клеток или, в случаях аутоиммунитета или патологического воспаления, нормальных человеческих клеток или тканей).

Термины «иммунный ответ», «аутоиммунная реакция», «аутоиммунное воспаление» относятся, например, к действию лимфоцитов, антиген-представляющих клеток, фагоцитирующих клеток, гранулоцитов и растворимых макромолекул, вырабатываемых указанными клетками или клетками печени (включая антитела, цитокины и комплемент, образующиеся в результате селективного повреждения, разрушения или элиминации из человеческого организма инвазивных патогенов, клеток или тканей, инфицированных патогенами, раковых клеток или, в случаях аутоиммунитета или патологического воспаления, нормальных человеческих клеток или тканей).

Под термином «аутоантитела» в данном описании понимается – антитела, направленные против аутоантигенов. Аутоантигены включают, но не ограничиваются нуклеиновыми кислотами (например двунитчатые ДНК или РНК, однонитчатые ДНК или РНК или их комбинация), ядерными протеинами (например SS-A(Ro), SS-B(La), Scl-70, центромеры, Jo-1, гистадил-тРНК синтетаза, треонил-тРНК синтетаза, PM-1, Mi-2, гистоны или хроматин), клеточными рецепторами (например рецептор к ацетилхолину, рецептор к тиретропину), клеточные белки (например кардиолипид, β 2GPI), белки клеточной мембраны (например аквапорин, десмоглеин) комплексы РНК-белок (например рибонуклеопротеины и Sm), гликопротеины рецепторов эритроцитов и тромбоцитов.

Термин «аутоиммунное заболевание» в контексте настоящего описания обозначает не злокачественное заболевание или нарушение, возникающее и направленное против собственных (ауто) антигенов и/или тканей индивидуума.

Это определение охватывает, но без ограничения, ревматоидный артрит, ювенильный хронический артрит, септический артрит, артроз Лайма, псориаз, реактивный артрит, спондилоартропатия, системная красная волчанка, болезнь Крона, язвенный колит, воспалительные заболевания кишечника, сахарный диабет, тиреоидит, астма, аллергические заболевания, псориаз, атопический дерматит, склеродермия, реакция «трансплантат против хозяина», отторжение трансплантата, острые или хронические иммунные заболевания, связанные с трансплантацией, саркоидоз, болезнь Кавасаки, болезнь Грейвса, нефротический синдром, синдром хронической усталости, гранулематоз Вегенера, пурпура Геноха-Шенлейна, микроскопический почечный васкулит, хронический активный гепатит, uveitis, септический шок, синдром токсического шока, септический синдром, кахексия, синдром приобретенного иммунодефицита, острый поперечный миелит, хорей Гентингтона, болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, инсульт, первичный билиарный цирроз, гемолитическая анемия, взрослых (острый) респираторный дистресс-синдром, алопеция, очаговая алопеция, серонегативная артропатия, артропатии, болезнь Рейтера, псориаз, связанная с язвенным колитом артропатия, атопические аллергии, аутоиммунные буллезные заболевания, пузырчатка vulgaris, листовидная пузырчатка, болезнь пемфигоида, линейные IgA, IgG-ассоциированные заболевания, аутоиммунная гемолитическая анемия, Кумбс-позитивная гемолитическая анемия, злокачественная анемия, ювенильная злокачественная анемия, гигантоклеточный артериит, артрит, первичный склерозирующий гепатит А, криптогенный аутоиммунный гепатит, фиброзирующие заболевания легких, криптогенный фиброзный альвеолит, поствоспалительные интерстициальные заболевания легких, интерстициальный пневмонит, хроническая эозинофильная пневмония, постинфекционные интерстициальные заболевания легких, подагрический артрит, аутоиммунный гепатит, аутоиммунный гепатит I типа (классический аутоиммунный гепатит или липоид), аутоиммунный гепатит II типа, остеоартрит, первичный склерозирующий холангит, псориаз, идеопатическая лейкопения, аутоиммунная нейтропения, ренальные NOS заболевания [renal NOS-disease], гломерулонефрит, микроскопический ренальный васкулит, дискоидный волчаночный эритематоз, идеопатическая или мужская NOS фертильность [autoimmunity to sperm], все подтипы рассеянного склероза, симпатическая офтальмия, вторичная легочная гипертензия при заболеваниях соединительной ткани, синдром Гудпасчера, легочная манифестация узлового полиартрита, острая ревматическая лихорадка, ревматоидный спондилит, анкилозирующий спондилит, болезнь Стилла, системная склеродермия, очаговая склеродермия, синдром Шенгрена, болезнь Шенгрена, болезнь Бехчета, анкилозирующий спондилит, спондилоартриты, аксиальный энтезит, рецидивирующий полихондрит, синдром Такаясу, аутоиммунная тромбоцитопения, идиопатическая тромбоцитопения, аутоиммунный тиреоидит, аутоиммунный гастрит, аутоиммунный полигландулярный синдром, гипертириоз, болезнь Хошимото, аутоиммунный атрофический гипотиреоз, первичная мексидема, факогенный увеит, первичный васкулит, витилиго, острые

заболевания печени, хронические заболевания печени, аллергии, астма, психические заболевания (включая депрессию и шизофрению), заболевания опосредованные Th2 типом и Th1 типом, конъюнктивиты, аллергические контактные дерматиты, аллергические риниты, дефицит альфа-1-антитрипсина, амиотрофический латеральный склероз, анемия, цистический фиброз, заболевания, ассоциированные с цитокиновой терапией, демиелизирующие заболевания, дерматиты, иридоциклит/увеит/оптический неврит, повреждение ишемической реперфузии, ишемический инсульт, ювенильный ревматоидный артрит, аутоиммунная энтеропатия, аутоиммунная потеря слуха, аутоиммунный лимфопролиферативный синдром, аутоиммунный миокардит, аутоиммунная кардиомиопатия, миокардит Коксаки, синдром Дресслера, люпус-нефрит, ангионевротический отек, в том числе наследственный, крапивница, поверхностный гидраденит, плоский лишай, склерозирующий лишай, лихеноидный питириаз, витилиго, болезнь Аддисона, аутоиммунный полиэндокринный синдром, аутоиммунный панкреатит, целиакия, микроскопический колит, антифосфолипидный синдром, аутоиммунный лимфопролиферативный синдром, холодовая агглютининовая болезнь, эссенциальная криоглобулинемия, синдром Эванса, пернициозная анемия, красноклеточная аплазия, CREST-синдром, эозинофильный фасциит, синдром Фелти, перекрестный синдром, хроническая болезнь Лайма, синдром Парри-Ромберга, палиндромный ревматизм, ревматизм, острая ревматическая лихорадка, ретроперитонеальный синдром, саркоидоз, синдром Шнитцлера, недифференцируемое заболевание соединительной ткани, дерматомиозит, полимиозит, фибромиалгия, миастения gravis, нейромитотония, острый диссеминированный энцефаломиелит, синдром Гийена-Барре, оптикомиелит Дейвика, энцефалопатия Хашимото, миастенический синдром Ламберта-Итона, эозинофильный груанулематоз с полиангиитом, лейкоцитокластический васкулит, люпус-васкулит, ревматоидный васкулит, узловой полиангиит, аутоиммунная преждевременная недостаточность яичника и блефарит. Антитело может также лечить любую комбинацию из перечисленных выше расстройств.

«Терапевтически эффективным количеством» считается количество вводимого в процессе лечения терапевтического агента, которое избавит в определенной степени от одного или нескольких симптомов заболевания, по поводу которого проводится лечение.

Понятие «хроническое» применение относится к непрерывному (продолжительному) применению агента(ов) в противоположность острому (кратковременному) пути введения, так чтобы поддерживать первоначальное терапевтическое действие (активность) в течение длительного периода времени.

«Прерывистое» применение обозначает лечение, которое не осуществляют последовательно без перерывов, но которое скорее по своей природе является периодическим.

В настоящем описании и в последующей формуле изобретения, если контекстом не предусмотрено иное, слова «иметь», «включать» и «содержать» или их вариации, такие как «имеет», «имеющий», «включает», «включающий», «содержит» или «содержащий», следует понимать как включение указанного целого или группы целых, но не исключение любого другого целого или группы целых.

Подробное описание изобретения

Антитело

Настоящее изобретение относится к моноклональному антителу, которое специфически связывается с CD20.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которое специфично связывается с CD20, и включает:

1) вариабельный домен тяжелой цепи, который имеет аминокислотную последовательность
EVQLVQPGAEEVVKPGASVKVSKASGYTFTSYNMHWVRQAPGRGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKG
RVTMTRDKSTSTVYMEISSLRSEDTAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 2);

или

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYNMHWVRQAPGRGLEWMGAIYPGNGDTSYN
QKFKGRATLTRDTSTSTVYMEISSLRSEDTAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 6);

2) вариабельный домен легкой цепи, который имеет аминокислотную последовательность

QIVLSQSPAILSASPGERVTLTCRASSSVSYIHWFQKPGKAPKPLIYATSNLASGVPSRFSGSGS
GTDFTLTISRVEPEDFAVYYCQQWTSNPPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 4)

или

QIVLSQSPATLSASPGERATMTCRASSSVSYIHWFQKPGKAPKPLIYATSNLASGVPSRF
SGSGSGTDFTLTISRLEPEDFATYYCQQWTSNPPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 8).

В некоторых вариантах моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включают:

1) вариабельный домен тяжелой цепи, который имеет аминокислотную последовательность

EVQLVQPGAEEVVKPGASVKVSKASGYTFTSYNMHWVRQAPGRGLEWMGAIYPGNGDTSYN
QKFKGRVTMTRDKSTSTVYMEISSLRSEDTAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 2);

2) вариабельный домен легкой цепи, который имеет аминокислотную последовательность

QIVLSQSPAILSASPGERVTLTCRASSSVSYIHWFQKPGKAPKPLIYATSNLASGVPSRFSGSGS
GTDFTLTISRVEPEDFAVYYCQQWTSNPPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 4).

В некоторых вариантах моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включают:

1) вариабельный домен тяжелой цепи, который имеет аминокислотную последовательность

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYNMHWVRQAPGRGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKG
RATLTRDTSTSTVYMEISSLRSEDTAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 6);

2) вариабельный домен легкой цепи, который имеет аминокислотную последовательность

QIVLSQSPATLSASPGERATMTCRASSSVSYIHWFQKPGKAPKPLIYATSNLASGVPSRFSGSGS
GTDFTLTISRLEPEDFATYYCQQWTSNPPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 8).

В некоторых вариантах моноклональное антитело включает:

1) тяжелую цепь, которая имеет аминокислотную последовательность

EVQLVQPGAEEVVKPGASVKVSKASGYTFTSYNMHWVRQAPGRGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKG
RVTMTRDKSTSTVYMEISSLRSEDTAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPL
APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLG
TQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT

CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 1)

или

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAPGRGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRATLTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGQGTLLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 5);

2) легкую цепь, которая имеет аминокислотную последовательность

QIVLSQSPAILSASPGERVTLTCRASSSVSYIHWFQQKPGKAPKPLIYATSNLASGVPSRFSGSGSGTDFSLTISRVEPEDFAVYYCQQWTSNPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 3)

или

QIVLSQSPATLSASPGERATMTTCRASSSVSYIHWFQQKPGKAPKPLIYATSNLASGVPSRFSGSGSGTDFSLTISRLEPEDFAVYYCQQWTSNPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 7).

В некоторых вариантах моноклональное антитело, которое специфически связывается с CD20, представляет собой BCD132-077.

Моноклональное антитело BCD132-077 включает:

1) тяжелую цепь, которая имеет аминокислотную последовательность

EVQLVQPGAEEVVKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAPGRGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMTRDKSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGQGTLLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 1);

2) легкую цепь, которая имеет аминокислотную последовательность

QIVLSQSPAILSASPGERVTLTCRASSSVSYIHWFQQKPGKAPKPLIYATSNLASGVPSRFSGSGSGTDFSLTISRVEPEDFAVYYCQQWTSNPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 3).

В некоторых вариантах моноклональное антитело, которое специфически связывается с CD20, представляет собой BCD132-L-028.

Моноклональное антитело BCD132-028 включает:

1) тяжелую цепь, которая имеет аминокислотную последовательность

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAPGRGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRATLTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGQGTLLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 5);

2) легкую цепь, которая имеет аминокислотную последовательность QIVLSQSPATLSASPGERATMTCRASSSVSYIHWFQQKPGKAPKPLIYATSNLASGVPSRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFATYYCQQWTSNPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 7).

В некоторых вариантах моноклональное антитело, которое специфично связывается с CD20, представляет собой полноразмерное антитело IgG.

В некоторых вариантах моноклональное антитело относится к изотипу IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 человека.

В некоторых вариантах моноклональное антитело относится к изотипу IgG1 человека.

Молекулы нуклеиновых кислот

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновых кислот, а именно к последовательностям, кодирующим моноклональное антитело, которое специфически связывается с CD20, по данному изобретению, которые описаны в данном документе, необязательно включающим любую последовательность соединяющего их пептидного линкера.

Ссылка на нуклеотидную последовательность, охватывает его комплимент, если не указано иное. Таким образом, ссылка на нуклеиновую кислоту, имеющую определенную последовательность следует понимать, как охватывающие ее комплементарную цепь с ее комплементарной последовательностью. Термин «полинуклеотид», упоминаемый в данном документе, означает полимерную форму нуклеотидов, по меньшей мере 10 оснований в длину, либо рибонуклеотидов, либо дезоксинуклеотидов или модифицированную форму любого типа нуклеотида. Термин включает в себя одно- и двухцепочечные формы.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-8. Молекула нуклеиновой кислоты может также содержать любую комбинацию указанных нуклеотидных последовательностей.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, которая кодирует моноклональное антитело или его антигенсвязывающему фрагменту, которое специфично связывается с CD20, и включает:

1) вариабельный домен тяжелой цепи, который имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 6;

2) вариабельный домен легкой цепи, который имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 8.

В некоторых вариантах молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включают:

1) вариабельный домен тяжелой цепи, который имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2;

2) вариабельный домен легкой цепи, который имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4.

В некоторых вариантах молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включают:

1) вариабельный домен тяжелой цепи, который имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6;

2) вариабельный домен легкой цепи, который имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8.

В некоторых вариантах молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует моноклональное антитело, которое включает:

1) тяжелую цепь, которая имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 5;

2) легкую цепь, которая имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 7.

В некоторых вариантах молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует моноклональное антитело, которое включает:

1) тяжелую цепь, которая имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1;

2) легкую цепь, которая имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует моноклональное антитело, которое включает:

1) тяжелую цепь, которая имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5;

2) легкую цепь, которая имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7.

В любом из указанных выше вариантах осуществления изобретения молекулы нуклеиновых кислот могут быть выделенными.

Молекула нуклеиновой кислоты по данному изобретению может быть выделена из любого источника, который продуцирует моноклональное антитело, которое специфически связывается с CD20. В определенных вариантах осуществления изобретения молекула нуклеиновой кислоты данному изобретению может быть синтезирована, а не выделена.

В одном варианте осуществления изобретения молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие домены VH (SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 6) или VL (SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 8) преобразуются в гены антитела по всей длине путем вставки в экспрессионный вектор, уже кодирующей константные домены тяжелой цепи (CH) или легкой цепи (CL), соответственно, так что VH сегмент функционально соединен с CH сегментом(-ами) в векторе и/или VL сегмент оперативно соединен с CL сегментом в векторе. В другом варианте осуществления изобретения молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие VH и/или VL домены преобразуются в гены по всей длине антитела путем соединения, например, лигирования, молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей VH и/или VL домены, к молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей CH и/или CL домены с использованием стандартных молекулярно-биологических методов. Молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие по всей длине тяжелую и/или легкую цепи, могут затем экспрессироваться из клетки, в которую они были введены.

Молекулы нуклеиновой кислоты могут использоваться для экспрессии большого количества рекомбинантного моноклонального антитела, которое специфически связывается с CD20.

Вектор

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к вектору, подходящему для экспрессии любой из нуклеотидных последовательностей, описанных в настоящем документе.

Настоящее изобретение относится к векторам, содержащим молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют любую из аминокислотных последовательностей моноклонального антитела, которое специфически связывается с CD20, или их частей (например, последовательностей тяжелой цепи первого и/или тяжелой и/или легкой цепи второго связывающих доменов) как описано в настоящем документе. Настоящее изобретение далее относится к векторам, содержащим молекулы нуклеиновых кислот, кодирующих слитые белки, модифицированные антитела, фрагменты антител.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, моноклональное антитело, которое специфически связывается с CD20, по данному изобретению экспрессируются путем вставки ДНК, кодирующей частично или полностью последовательность первого и второго связывающего домена (например, последовательности тяжелой и легкой цепи, где связывающий домен содержит последовательности тяжелой и легкой цепи), полученный, как описано выше, в экспрессионных векторах таким образом, что гены функционально соединены с необходимыми последовательностями, контролирующими экспрессию, такими как транскрипционные и трансляционные контрольные последовательности. Экспрессионные векторы включают плазмиды, ретровирусы, аденовирусы, аденоассоциированные вирусы (AAV), вирусы растений, такие как вирус мозаики цветной капусты, вирусы табачной мозаики, космиды, YAC, EBV полученные эписомы и тому подобное. Молекулы ДНК могут быть лигированы в вектор таким образом, что последовательности, контролирующие транскрипцию и трансляцию в векторе, выполняют предусмотренную функцию регуляции транскрипции и трансляции ДНК. Экспрессионный вектор и последовательности контроля экспрессии могут быть выбраны таким образом, чтобы быть совместимыми с используемой экспрессирующей клеткой-хозяином. Молекулы ДНК, кодирующие частично или по всей длине последовательности первого и второго связывающих доменов (например, последовательности тяжелой и легкой цепи, где связывающий домен содержит последовательность тяжелой и легкой цепи) могут быть введены в отдельные векторы. В одном варианте осуществления изобретения любая комбинация указанных выше молекул ДНК вводится в тот же экспрессионный вектор. Молекулы ДНК могут быть введены в экспрессионный вектор стандартными способами (например, лигированием комплементарных сайтов рестрикции на фрагменте гена антитела и вектора или лигированием тупых концов, если сайты рестрикции отсутствуют).

Подходящим вектором является тот, который кодирует функционально законченные последовательности CH или CL человеческого иммуноглобулина с конструированием соответствующего места рестрикции так, что любая последовательность VH или VL может быть легко включена и экспрессирована, как описано выше. HC - и LC-кодирование генов в таких векторах может содержать интронные последовательности, что приводит к общему увеличению белковых продуктов антитела путем стабилизации соответствующей мРНК. Интронные последовательности находятся в окружении сплайс-донора и сплайс-акцептора сайтов, которые определяют, где будет происходить сплайсинг РНК. Расположение интронных последовательностей может быть либо в

вариабельных или константных участках цепей антитела, или как в вариабельных, так и константных участках, когда используются несколько интронов. Прекращение полиаденилирования и транскрипции может произойти вниз по ходу сайта нативной хромосомы кодируемых участков. Рекомбинантный экспрессионный вектор также может кодировать сигнальный пептид, который облегчает выработку цепочки антитела клеткой-хозяином. Ген цепочки антитела может быть клонирован в вектор таким образом, что сигнальный пептид соединен с рамкой считывания аминоконца цепи иммуноглобулина. Сигнальным пептидом может быть сигнальный пептид иммуноглобулина или гетерологичный сигнальный пептид (то есть, сигнальный пептид белка не иммуноглобулиновой природы).

Помимо цепочки генов антител, рекомбинантная экспрессия векторов по данному изобретению может нести регулирующие последовательности, которые контролируют экспрессию генов цепи антител в клетке-хозяине. Специалистам в этой области будет понятно, что дизайн экспрессионного вектора, включая выбор регулирующих последовательностей, может зависеть от таких факторов, как селекция клетки-хозяина для трансформации, уровень экспрессии желаемого белка, и т.д. Предпочтительные регулирующие последовательности для экспрессирующей клетки-хозяина млекопитающих включают вирусные элементы обеспечивающие высокий уровень экспрессии белков в клетках млекопитающих, таких как промоторы и/или энхансеры, полученные из ретровирусной LTR, цитомегаловируса (CMV) (например, CMV промотора/энхансера), обезьяньего вируса 40 (SV40) (например, SV40 промотора/энхансера), аденовируса, (например, большого позднего промотора аденовируса (AdMLP)), вирус полиомы, а также сильных промоторов млекопитающих, таких как промотор нативных иммуноглобулинов или промотор актина. Для дальнейшего описания вирусных регулирующих элементов и их последовательностей см., например, патенты США 5,168,062, 4,510,245 and 4,968,615. Способы экспрессии связывающих молекул, таких как антитела растений, в том числе описание промоторов и векторов, а также трансформация растений, известны в данной области техники. См., например, патент США 6,517,529. Методы экспрессии полипептидов в бактериальных клетках или клетках грибов, например, дрожжевых клетках, также хорошо известны в данной области техники.

В дополнение к генам цепи антитела и регулирующим последовательностям, рекомбинантные векторы экспрессии изобретения могут нести дополнительные последовательности, такие как последовательности, которые регулируют репликацию вектора в клетках-хозяевах (например, точки начала репликации) и гены селектируемого маркера. Ген селектируемого маркера облегчает селекцию клеток-хозяев, в которые был введен вектор (см., например, патенты США 4,399,216, 4,634,665 и 5,179,017). Например, обычно ген селектируемого маркера придает устойчивость к лекарственным средствам, таким как G418, гигромицин или метотрексат, клетке-хозяину, в которую вектор введен. Например, гены селектируемого маркера включают ген дигидрофолат редуктазы (DHFR) (для использования в dhfr-клетках-хозяевах при селекции/амплификации метотрексата), ген нео (для селекции G418) и ген синтетазы глутамата.

Термин «последовательность контроля экспрессии», используемый в данном описании, означает полинуклеотидные последовательности, которые необходимы для воздействия на экспрессию и процессинг

кодирующих последовательностей, к которым они лигированы. Контролирующие экспрессию последовательности включают соответствующие последовательности инициации транскрипции, терминации, промотора и энхансера; эффективные сигналы процессинга РНК, такие как сплайсинг и сигналы полиаденилирования; последовательности, которые стабилизируют цитоплазматическую мРНК; последовательности, которые повышают эффективность трансляции (т.е. консенсусная последовательность Козака); последовательности, которые повышают стабильность белка; и, при желании, последовательности, которые усиливают секрецию белка. Характер таких контролируемых последовательностей различается в зависимости от организма-хозяина; в прокариотах такие контролируемые последовательности, как правило, включают промотор, сайт связывания рибосомы, а также последовательности терминации транскрипции; в эукариотах, как правило, такие контролируемые последовательности включают промоторы и последовательности терминации транскрипции. Термин «контролируемые последовательности» включает, как минимум, все компоненты, наличие которых имеет важное значение для экспрессии и процессинга, и может также включать дополнительные компоненты, чье присутствие является полезным, например, лидирующие последовательности и последовательности слившихся клеток.

Клетки-хозяева

Дополнительный аспект настоящего изобретения относится к способам получения моноклонального антитела, которое специфически связывается с CD20, по данному изобретению. Один вариант осуществления изобретения относится к способу получения моноклонального антитела, которое специфически связывается с CD20, как определено в настоящем документе, содержащему получение рекомбинантной клетки-хозяина, способной экспрессировать моноклональное антитело, которое специфически связывается с CD20, культивированию указанной клетки-хозяина в условиях, подходящих для экспрессии продукции моноклонального антитела, которое специфически связывается с CD20, и выделение полученного моноклонального антитела, которое специфически связывается с CD20. Моноклональное антитело, которое специфически связывается с CD20, полученное такой экспрессией в таких рекомбинантных клетках-хозяевах упоминается в данном документе как «рекомбинантное моноклональное антитело, которое специфически связывается с CD20». Изобретение также относится к потомству клеток таких клеток-хозяев и моноклональному антителу, которое специфически связывается с CD20, полученному аналогично.

Молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие моноклональное антитело, которое специфически связывается с CD20, по изобретению и векторы, содержащие эти молекулы нуклеиновой кислоты, могут быть использованы для трансфекции подходящего млекопитающего или его клетки, растения или его клетки, бактериальной или дрожжевой клетки-хозяина. Преобразование может происходить любым известным способом для введения полинуклеотидов в клетку-хозяина. Способы введения гетерологичных полинуклеотидов в клетки млекопитающих хорошо известны в данной области техники и включают декстран-опосредованную трансфекцию, трансфекцию комплексом нуклеиновой кислоты и позитивно заряженного полимера, трансфекцию преципитатом нуклеиновой кислоты и фосфата кальция, полибрен-опосредованную трансфекцию, слияние

протопластов, трансфекцию инкапсулированными в липосомы полинуклеотидами и прямую микроинъекцию ДНК в ядра. В дополнение, молекулы нуклеиновых кислот могут быть введены в клетки млекопитающих вирусными векторами. Способы трансфекции клеток хорошо известны в данной области техники. См., например, патенты США, 4,399,216, 4,912,040, 4,740,461 и 4,959,455. Способы трансформации клеток растений хорошо известны в данной области техники, включая, например, *Agrobacterium*-опосредованную трансформацию, биолистическую трансформацию, прямую инъекцию, электропорацию и вирусную трансформацию. Методы трансформации клеток бактерий и дрожжей также хорошо известны в данной области техники.

Клеточные линии млекопитающих, используемые в качестве хозяев для трансформации, хорошо известны в данной области техники и включают множество иммортализованных доступных клеточных линий. К ним относятся, например, клетки яичников китайского хомячка (CHO), NS0 клетки, клетки SP2, HEK-293T клетки, 293 Фристайл клетки (Invitrogen), NIH-3T3 клетки, клетки HeLa, клетки почек хомячка (BHK), клетки почек африканских зеленых мартышек (COS), клетки гепатоцеллюлярной карциномы человека (например, Hep G2), A549 клетки и ряд других клеточных линий. Клеточные линии выбираются путем определения, какие клеточные линии имеют высокие уровни экспрессии и обеспечивают необходимые характеристики продуцируемого белка. Другими клеточными линиями, которые могут быть использованы, являются клеточные линии насекомых, такие как Sf9 или Sf21 клетки. Когда векторы рекомбинантной экспрессии, кодирующие моноклональное антитело, которое специфически связывается с CD20, вводятся в клетки-хозяева млекопитающих, антитела продуцируются путем культивирования клеток-хозяев в течение времени, достаточного для экспрессии антител в клетках-хозяевах или, предпочтительнее, выделения антител в питательную среду, в которой выращиваются клетки-хозяева. Моноклональное антитело, которое специфически связывается с CD20, может быть выделено из питательной среды с использованием стандартных методов очистки белка. Клетки-хозяева растений, например, включают *Nicotiana*, *Arabidopsis*, ясню, кукурузу, пшеницу, картофель и т.д. Клетки бактерий хозяина включают виды *Escherichia* и *Streptomyces*. Дрожжевые клетки-хозяева включают *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* и *Pichia pastoris*.

Кроме того, уровень продукции моноклонального антитела, которое специфически связывается с CD20, по данному изобретению из продуцирующей клеточной линии можно усилить с помощью ряда известных методов. Например, система экспрессии гена глутамин синтетазы (система GS) является достаточно распространенной для усиления экспрессии при определенных условиях. Система GS обсуждается в целом или частично в связи с патентами EP 0216846, 0256055, 0323997 и 0338841.

Вполне вероятно, что моноклональное антитело, которое специфически связывается с CD20, полученное из различных клеточных линий или трансгенных животных будут отличаться друг от друга профилем гликозилирования. Однако моноклональное антитело, которое специфически связывается с CD20, кодируемое молекулами нуклеиновой кислоты, описанными в данном документе, или содержащее аминокислотные последовательности, приведенные в настоящем документе, являются частью данного изобретения, независимо от

состояния гликозилирования связывающих молекул и в целом, независимо от наличия или отсутствия пост-трансляционных модификаций.

Получение антител

Изобретение относится также к способам и процессам получения моноклонального антитела, которое специфически связывается с CD20, и их антигенсвязывающих фрагментов.

Моноклональные антитела

Моноклональные антитела можно создавать, например, с помощью метода на основе гибридом, который впервые описан Kohler и др., *Nature*, 256, 1975, с. 495, или с помощью методов рекомбинантной ДНК (US 4816567).

При использовании метода на основе гибридом, мышь или другое пригодное животное-хозяин, такое как хомячок, иммунизируют согласно описанной выше методике, для того, чтобы вызывать образование лимфоцитов, которые продуцируют или могут продуцировать антитела, обладающие способностью специфически связываться с белком, применяемым для иммунизации. Согласно другому варианту лимфоциты можно получать в результате иммунизации *in vitro*. После иммунизации лимфоциты выделяют и затем сливают с клеточной линией миеломы с помощью приемлемого связывающего агента, такого как полиэтиленгликоль, с получением клетки гибридомы.

Полученные таким образом клетки гибридомы высевают и выращивают в пригодной культуральной среде, которая предпочтительно содержит одно или несколько веществ, ингибирующих рост или выживание неслитых родительских клеток миеломы. Например, если родительские клетки миеломы не содержат фермента гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазы (HGPRT или HPRT), то культуральная среда для гибридом, как правило, должна включать гипоксантин, аминоптерин и тимидин (HAT-среда), т.е. вещества, которые препятствуют росту клеток с дефицитом HGPRT.

Предпочтительными применяемыми в качестве компонента для слияния клетками миеломы являются клетки, которые легко поддаются слиянию, поддерживают стабильный высокий уровень производства антител выбранными продуцирующими антитела клетками и чувствительны к избирательной среде, на которой происходит отбор несвязанных родительских клеток. Предпочтительными линиями клеток миеломы являются линии мышинной миеломы, такие как созданные на основе мышинных линий опухолевых клеток линии MOPC-21 и MPC-11, которые можно получать из Salk Institute Cell Distribution Center, Сан-Диего, шт. Калифорния, США, и линии SP-2 или X63-Ag8-653, которые можно получать из Американской коллекции типовых культур, Роквилл, шт. Мэриленд, США. Описано также применение линий клеток человеческой миеломы и гетеромиеломы типа «мышь-человек» для производства моноклональных антител (Kozbor, J. Immunol., 133, 1984, с. 3001).

Предпочтительно специфичность связывания моноклональных антител, полученных с использованием клеток гибридомы, определяют методом иммунопреципитации или с помощью анализа связывания *in vitro*, такого как радиоиммунный анализ (РИА) или твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA).

Аффинность связывания моноклонального антитела можно, например, определять с помощью Скэтчард-анализа, описанного у Munson и др., *Anal. Biochem.*, 107, 1980, с. 220.

После выявления клеток гибридомы, которые продуцируют антитела требуемой специфичности, аффинности и/или активности, клоны можно субклонировать с помощью метода лимитирующих разведений и выращивать стандартными методами. Пригодные для этой цели среды включают, например, среду DMEM или RPMI-1640. Кроме того, клетки гибридомы можно выращивать *in vivo* в виде асцитных опухолей в организме животных, например, путем внутрибрюшинной (*i.p.*) инъекции клеток мышам.

Моноклональные антитела, секретируемые субклонами, можно отделять от культуральной среды, асцитной жидкости или сыворотки с помощью обычных методов очистки антител, например, аффинной хроматографией (например, с использованием протеин А- или протеин Q-сефарозы), или ионообменной хроматографии, хроматографии на гидроксилапатитах, гель-электрофореза, диализа и т.д.

ДНК, кодирующую моноклональные антитела, можно легко выделять и секвенировать с помощью общепринятых процедур (например, с использованием олигонуклеотидных зондов, которые обладают способностью специфически связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи мышиных антител). В качестве предпочтительного источника такой ДНК служат клетки гибридомы. После выделения ДНК можно включать в экспрессионные векторы, которыми затем трансфектируют клетки-хозяева, такие как клетки *E. coli*, обезьяньи COS-клетки, клетки яичника китайского хомячка (CHO) или клетки миеломы, которые без трансфекции не продуцируют белок антитела, что приводит к синтезу моноклональных антител в рекомбинантных клетках-хозяевах.

Согласно еще одному варианту осуществления изобретения моноклональные антитела или фрагменты антител можно выделять из фаговых библиотек антител, созданных с помощью методов, описанных у McCafferty и др., *Nature*, 348, 1990, сс. 552-554. У Clackson и др., *Nature*, 352, 1991, сс. 624-628 и Marks и др., *J. Mol. Biol.*, 222, 1991, сс. 581-597 описано выделение мышиных и человеческих антител соответственно с помощью фаговых библиотек. В последующих публикациях было описано производство высокоаффинных (нМ-диапазон) человеческих антител с помощью перестановки цепи (Marks и др., *Bio/Technology*, 10, 1992, сс. 779-783), а также комбинаторная инфекция и рекомбинация *in vivo* в качестве стратегии конструирования очень больших фаговых библиотек (Waterhouse и др., *Nucl. Acids. Res.*, 21, 1991, сс. 2265-2266). Таким образом, эти методы представляют собой реальную альтернативу традиционным методам выделения моноклональных антител на основе гибридом моноклональных антител.

ДНК, кодирующую антитело, можно также модифицировать, например таким образом, чтобы получать химерные или слитые полипептиды антител, например, путем замены последовательностей константных областей тяжелой и легкой цепи (Сн и CL) на гомологичные мышиные последовательности (US 4816567 и Morrison и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: 81, 1984, с. 6851) или с помощью ковалентного связывания кодирующей последовательности иммуноглобулина со всей или с частью кодирующей последовательности полипептида, не относящегося к иммуноглобулину (гетерологичного полипептида). Не относящиеся к иммуноглобулину полипептидные последовательности можно заменять на константные области антитела или заменять на переменные области антигенсвязывающего центра антитела, создавая химерное бивалентное антитело, которое содержит один антигенсвязывающий центр, обладающий

специфичностью в отношении антигена, и другой антигенсвязывающий центр, обладающий специфичностью в отношении другого антигена.

Человеческие антитела и методика, основанная на применении фаговой дисплейной библиотеки

В настоящее время можно получать трансгенных животных (например, мышей), которые после иммунизации могут продуцировать полный спектр человеческих антител без производства эндогенного иммуноглобулина. Например, было описано, что гомозиготная делеция областей стыка гена тяжелой цепи антитела (JH-сегмента) в организме химерных мышей и мышей с мутацией в зародышевой линии приводит к полному ингибированию производства эндогенного антитела. Перенос набора зародышевой линии гена человеческого иммуноглобулина в такую мутантную зародышевую линию мышей приводит к производству человеческих антител после контрольного заражения антигеном (US 5545806, 5569825, 5591669 (все на имя фирмы GenPharm); 5545807; и WO 97/17852).

В альтернативном варианте для получения человеческих антител и фрагментов антител *in vitro* из спектра генов варибельной области (V) иммуноглобулина из организма иммунизированных доноров можно использовать фаговую дисплейную технологию (McCafferty и др., *Nature*, 348, 1990, сс. 552-553). Согласно этой методике гены V-области антитела клонируют в рамке считывания либо с основным, либо с минорным геном оболочечного белка нитчатого бактериофага, такого как M13 или fd, и презентируют в виде функциональных фрагментов антитела на поверхности фаговой частицы. Поскольку нитчатая частица содержит копию одноцепочечной ДНК фагового генома, селекции по признаку функциональных свойств антитела, также приводят к отбору гена, кодирующего антитело, которое обладает указанными свойствами. Таким образом, фаг имитирует некоторые свойства В-клетки. Фаговую презентацию можно осуществлять в различных форматах. Для фаговой презентации можно использовать различные источники сегментов V-генов. Clackson и др., *Nature*, 352, 1991, сс. 624-628 выделили различные наборы антител к оксазолону из небольшой произвольной комбинаторной библиотеки V-генов, полученной из селезенки иммунизированных мышей. Можно конструировать спектр V-генов, полученных из организма иммунизированных людей-доноров, и антитела к различному набору антигенов (включая аутоантигены) можно выделять в целом согласно методам, описанным у Marks и др., *J. Mol. Biol.*, 222, 1991, сс. 581-597.

Как описано выше, человеческие антитела могут продуцироваться также *in vitro* активированными В-клетками (см. US 5567610 и 5229275).

Фрагменты антител

В определенных обстоятельствах целесообразно применять фрагменты антител, а не полные антитела. Меньший размер фрагментов способствует их быстрому клиренсу и может способствовать лучшему проникновению в плотные опухоли.

Для получения фрагментов антител разработаны различные методы. Традиционно эти фрагменты получали путем протеолитического расщепления интактных антител. Однако в настоящее время эти фрагменты можно получать непосредственно с помощью рекомбинантных клеток-хозяев. Fab-, Fv- и scFv-фрагменты антител можно экспрессировать и секретировать из *E. coli*, что позволяет облегчать производство больших количеств указанных фрагментов. Фрагменты

антител можно выделять из описанных выше фаговых библиотек антител. Согласно другому варианту Fab'-SH-фрагменты можно непосредственно выделять из *E. coli* и химически сшивать с получением F(ab')₂-фрагментов (Carter и др., *Bio/Technology*, 10, 1992, сс. 163-167). Согласно другому подходу F(ab')₂ - фрагменты можно выделять непосредственно из культуры рекомбинантных клеток-хозяев. Fab- и F(ab')₂-фрагмент с повышенным временем полужизни *in vivo*, в которых сохранены остатки эпитопсвязывающего рецептора, описаны в US 5869046. Специалистам в данной области должны быть очевидны другие методики получения фрагментов антител. В других вариантах осуществления изобретения выбранное антитело представляет собой одноцепочечный Fv-фрагмент (scFv) (см. WO 93/16185; US 5571894 и US США 5587458). Fv и scFv представляют собой единственные виды с интактными связывающими сайтами, лишенные константных областей; в результате их можно применять для пониженного неспецифического связывания при применении *in vivo*. Слитые белки, несущие scFv, можно конструировать для получения слияния эффекторного белка либо на N-, либо на C-конце scFv. Фрагмент антитела может представлять собой также «линейное антитело», например, описанное в US 5641870. Такие фрагменты линейного антитела могут быть моноспецифическими или биспецифическими.

Фармацевтические композиции

Другим аспектом изобретения является фармацевтическая композиция, содержащая в качестве активного ингредиента (или в качестве единственного активного ингредиента) моноклональное антитело, которое специфически связывается с CD20.

Фармацевтическая композиция может включать по меньшей мере одно моноклональное антитело, которое специфически связывается с CD20 и, по крайней мере, один из компонентов, выбранных из группы, состоящей из фармацевтически приемлемых и фармакологически совместимых эксипиентов.

Фармацевтическая композиция может включать по меньшей мере одно моноклональное антитело, которое специфически связывается с CD20, и одну или более дополнительных связывающих молекул (например, антител), которые нацелены на один или более соответствующих поверхностных рецепторов. В некоторых вариантах осуществления изобретения композиции предназначены для улучшения, профилактики или лечения нарушений, которые могут быть связаны с CD20.

«Фармацевтическая композиция» обозначает композицию, включающую в себя моноклональное антитело, которое специфически связывается с CD20, согласно изобретению и, по крайней мере, один из компонентов, выбранных из группы, состоящей из фармацевтически приемлемых и фармакологически совместимых эксипиентов, таких как наполнители, растворители, разбавители, носители, вспомогательные, распределяющие, средства доставки, консерванты, стабилизаторы, эмульгаторы, суспендирующие агенты, загустители, регуляторы пролонгированной доставки, выбор и соотношение которых зависит от природы и способа назначения и дозировки. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению и способы их изготовления будут бесспорно очевидными для специалистов в этой области. Производство фармацевтических композиций предпочтительно должно соответствовать требованиям GMP (надлежащей производственной практики). Композиция

может включать буферную композицию, тонические агенты, стабилизаторы и солюбилизаторы. Пролонгированное действие композиции может быть обеспечено с помощью агентов, замедляющих абсорбцию активного фармацевтического ингредиента, например, моностеарат алюминия и желатин. Примерами подходящих носителей, растворителей, разбавителей и средств доставки являются вода, этанол, полиспирты, а также их смеси, масла и инъекционные органические сложные эфиры.

«Лекарственное средство (препарат)» – вещество или смесь веществ в виде фармацевтической композиции в виде таблеток, капсул, порошков, лиофилизатов, инъекций, инфузий, мазей и др. готовых форм, предназначенное для восстановления, исправления или изменения физиологических функций у человека и животных, а также для лечения и профилактики болезней, диагностики, анестезии, контрацепции, косметологии и прочего. Любой способ введения пептидов, белков или антител, принятый в данной области, может соответствующим образом использоваться для моноклонального антитела, которое специфически связывается с CD20, по данному изобретению.

Термин «фармацевтически приемлемый» означает один или несколько совместимых жидких или твердых компонентов, которые подходят для введения млекопитающему, предпочтительно человеку.

Термин «эксципиент» или «вспомогательное вещество» используется в данном документе для описания любого компонента, отличающегося от ранее описанных по данному изобретению. Это вещества неорганического или органического происхождения, используемые в процессе производства, изготовления лекарственных препаратов для придания им необходимых физико-химических свойств.

Под термином «буфер», «буферная композиция», «буферный агент» понимается раствор, способный сохранять значение pH, благодаря взаимодействию кислотных и щелочных компонентов, входящих в его состав, который дает возможность препарату моноклонального антитела, которое специфически связывается с CD20, проявлять устойчивость к изменениям pH. В общем случае, преимущественными являются значения pH фармацевтической композиции от 4,0 до 8,0. В качестве буферных агентов могут быть использованы, например, ацетатный, фосфатный, цитратный, гистидиновый, сукцинатный и т.п. буферные растворы, но, не ограничиваясь ими.

Термины «тонический агент», «осмолитик» или «осмотический агент» в том виде, как они здесь использованы, относятся к эксципиенту, который может подводить осмотическое давление жидкого препарата антитела. «Изотоничный» препарат представляет собой препарат, который имеет осмотическое давление, эквивалентное давлению человеческой крови. Изотоничные препараты обычно имеют осмотическое давление от примерно 250 до 350 мОсм/кг. В качестве изотонических агентов могут быть использованы полиолы, моно- и дисахара, аминокислоты, соли металлов, например, хлорид натрия, и т.п., но, не ограничиваясь ими.

Под «стабилизатором» понимается вспомогательное вещество или смесь двух и более вспомогательных веществ, которые обеспечивают физическую и/или химическую стабильность активного агента. В качестве стабилизаторов могут быть использованы аминокислоты, например, аргинин, гистидин, глицин, лизин, глутамин, пролин, но, не ограничиваясь ими; поверхностно-активные вещества, например, полисорбат 20 (торговое наименование Tween 20), полисорбат 80 (торговое наименование Tween 80), полиэтилен-полипропилен гликоль и

его кополимеры (торговые наименования Поллоксамер (Poloxamer), Плуроник (Pluronic)), натрия додецилсульфат (SDS), но, не ограничиваясь ими; антиоксиданты, например, метионин, ацетилцистеин, аскорбиновая кислота, монотиоглицерол, соли серистых кислот, и т.п., но не ограничиваясь ими; хелатирующие агенты, например, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), диэтиленetriаминпентауксусная кислота (ДТПА), цитрат натрия и т.п., но не ограничиваясь ими.

Фармацевтическая композиция является «стабильной», если активный агент сохраняет свою физическую стабильность и/или химическую стабильность и/или биологическую активность в течение заявленного срока годности при температуре хранения, например, при 2–8 °С. Предпочтительно, чтобы активный агент сохранял и физическую, и химическую стабильность, а также биологическую активность. Период хранения выбирается на основании результатов исследования стабильности при ускоренном и естественном хранении.

Фармацевтическая композиция по данному изобретению может изготавливаться, упаковываться или широко продаваться в виде единичной стандартной дозы или множества единичных стандартных доз в виде готовой лекарственной формы. Используемый в данном документе термин «единичная стандартная доза» означает дискретное количество фармацевтической композиции, содержащей заранее определенное количество активного ингредиента. Количество активного ингредиента обычно равно дозировке активного ингредиента, который будет вводиться субъекту, или удобной части такой дозировки, например, половине или трети такой дозировки.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению, как правило, пригодны для парентерального введения в виде стерильных лекарственных средств, предназначенных для введения в организм человека с нарушением целостности кожных покровов или слизистых оболочек, минуя желудочно-кишечный тракт путем инъекций, инфузий или имплантации. Например, предполагается, что парентеральное введение включает, помимо прочего, подкожную, внутрибрюшинную, внутримышечную, внутривенную, внутриартериальную, интратекальную, внутрижелудочковую, интрауретральную, внутричерепную, внутрисуставную, трансдермальную инъекцию или инфузи.; и почечные диализные инфузионные методики. Внутриопухолевая доставка, например, внутриопухолевая инъекция, также может быть применима. Также предусмотрена региональная перфузия. Предпочтительные варианты осуществления изобретения включают внутривенный и подкожный пути. Любой способ введения пептидов или белков, принятый в данной области, может соответствующим образом использоваться для моноклонального антитела, которое специфически связывается с CD20, по данному изобретению.

Инъекционные лекарственные средства могут быть изготовлены, упакованы или проданы в стандартной лекарственной форме, например, в ампулах, флаконах, полимерных контейнерах, преднаполненных шприцах, устройствах для автоинъекции, но, не ограничиваясь ими. Лекарственные средства для парентерального введения включают, помимо прочего, суспензии, растворы, эмульсии в масляных или водных основах, пасты и тому подобное.

Еще одним вариантом осуществления изобретения является лекарственное средство для парентерального введения, где фармацевтическая композиция предоставлена в сухой форме, то есть,

порошка или гранул для растворения в подходящем растворителе (например, стерильной апиrogenной воде) перед введением. Такое лекарственное средство может быть получено, например, с помощью лиофилизации, т.е. процесса, известного в данной области техники как сушка из замороженного состояния, включающая в себя замораживание препарата и последующее удаление растворителя из замороженного содержимого.

Моноклональное антитело, которое специфически связывается с CD20, по данному изобретению может также вводиться интраназально или ингаляционно, самостоятельно, в виде смеси с подходящим фармацевтически приемлемым наполнителем из ингалятора, такого как аэрозольный контейнер под давлением, помпа, спрей, распылитель) или небулайзер, в котором используется или не используется подходящий пропеллент, или в виде назальных капель или спрея.

Лекарственное средство для парентерального введения может быть немедленного или модифицированного высвобождения. Лекарственные средства с модифицированным высвобождением включают отсроченное, замедленное, пульсирующее, контролируемое, нацеленное и программируемое высвобождение.

Терапевтическое применение моноклонального антитела, которое специфически связывается с CD20, по данному изобретению

В одном аспекте моноклональное антитело, которое специфически связывается с CD20, по данному изобретению применяется в лечении нарушений, которые связаны (опосредованы) с активностью CD20.

В одном аспекте субъект лечения или пациент является млекопитающим, предпочтительно человеческим субъектом. Вышеупомянутый субъект может быть мужского или женского пола и любого возраста.

В случае опухоли (например, раковой опухоли) терапевтически эффективное количество антитела или фрагмента антитела (например, антитела или фрагмента антитела, которое специфически связывает CD20) может уменьшать число раковых клеток; уменьшать начальный размер опухоли; ингибировать (т.е. до некоторой степени замедлять и, предпочтительно, прекращать) инфильтрацию раковыми клетками периферических органов; ингибировать (т.е. до некоторой степени замедлять и, предпочтительно, прекращать) метастазирование опухоли; ингибировать, до некоторой степени, рост опухоли; и/или облегчать, до некоторой степени, один или более симптомов, обусловленных расстройством. Антитело или фрагмент антитела может, до некоторой степени, предупреждать рост и/или убивать имеющиеся раковые клетки, оно может вызывать цитостатический и/или цитотоксический эффект. При терапии рака эффективность *in vivo* можно определять, например, оценивая продолжительность жизни, время до прогрессирования заболевания (TTP), частоту ответа опухоли на лечение (RR), продолжительность ответа и/или качество жизни.

Используемые в данном документе термины «совместное назначение», «совместно назначенный» и «в сочетании с» относятся к моноклональному антителу, которое специфически связывается с CD20, с одним или более другими терапевтическими агентами, как предполагается, означают, ссылаются или включают:

1) одновременное введение такой комбинации моноклонального антитела, которое специфически связывается с CD20, по данному изобретению и терапевтического агента пациенту, который нуждается в

лечении, когда такие компоненты сформулированы вместе в одной лекарственной форме, из которой указанные компоненты высвобождаются практически одновременно указанному пациенту,

2) одновременное введение такой комбинации моноклонального антитела, которое специфически связывается с CD20, по данному изобретению и терапевтического агента пациенту, который нуждается в лечении, когда такие компоненты сформулированы отдельно в разных лекарственных формах, введение которых происходит практически в одно и то же время указанному пациенту, после чего указанные компоненты высвобождаются практически одновременно указанному пациенту,

3) последовательное введение такой комбинации моноклонального антитела, которое специфически связывается с CD20, по данному изобретению и терапевтического агента пациенту, который нуждается в лечении, когда такие компоненты сформулированы отдельно друг от друга в отдельных лекарственных формах, которые принимаются в последовательно по времени указанным пациентом со значимым временным интервалом между каждым введением, после чего указанные компоненты высвобождаются в практически разное время указанному пациенту; а также

4) последовательное введение такой комбинации моноклонального антитела, которое специфически связывается с CD20, по данному изобретению и терапевтического агента пациенту, который нуждается в лечении, когда такие компоненты сформулированы вместе в единой лекарственной форме, из которой высвобождение указанных компонентов происходит контролируемым образом, после чего они одновременно, последовательно или совместно высвобождаются в одно и то же время и/или разное время указанному пациенту, где каждая часть может быть введена одним или разными путями.

Моноклональное антитело, которое специфически связывается с CD20, по данному изобретению могут назначаться без дополнительного терапевтического лечения, т.е. в качестве самостоятельной терапии. Кроме того, лечение моноклональным антителом, которое специфически связывается с CD20, по данному изобретению может включать по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое лечение (комбинированная терапия). В некоторых вариантах осуществления изобретения, моноклональное антитело, которое специфически связывается с CD20, может вводиться совместно или быть сформулирована с другим медикаментом/препаратом для лечения рака или аутоиммунного заболевания.

Термин «цитотоксическое средство» в используемом в настоящем описании смысле относится к веществу, которое ингибирует или предотвращает функционирование клеток и/или вызывает разрушение клеток. Подразумевается, что термин включает радиоактивные изотопы (например, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³² и радиоактивные изотопы Lu), химиотерапевтические средства и токсины, такие как низкомолекулярные токсины или ферментативно активные токсины, имеющие происхождение из бактерий, грибов, растений или животных, включая их фрагменты и/или варианты.

«Химиотерапевтическим средством» является химическое соединение, применимое для лечения злокачественной опухоли. Примеры химиотерапевтических средств включают алкилирующие агенты, такие как тиотепа и циклофосфамид (CYTOXAN®); алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодоба, карбохинон, метуредоба и уредоба; этиленимины и

метилмеламины, включая алтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилентифосфорамид и триметилмеламин; ацетогенины (например, буллатацин и буллатацинон); дельта-9-тетрагидроканнабинол (дронабинол, MARINOL®); бета-лапахон; лапахол; колхицины; бетулиновую кислоту; камптотецин (включая синтетический аналог топотекан (HUSAMTIN®), CPT-11 (иринотекан, CAMPTOSAR®), ацетилкамптотецин, скополектин и 9-аминокамптотецин); бриостатин; каллистатин; CC-1065 (включая его синтетические аналоги адозелезин, карзелезин и бизелезин); подофиллотоксин; подофиллиновую кислоту; тенипозид; криптофицины (например, 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, холофосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлорэтамин, гидрохлорид оксида мехлорэтамина, мелфалан, новембихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урамустин; нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин и ранимнустин; антибиотики, такие как энединовые антибиотики (например, калихеамицин, например, калихеамицин гамма II и калихеамицин омега II (см., например, Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994))); динемидин, включая динемидин А; эсперамицин; а также хромофор неокарциностатина и родственные хромофоры хромопротеинов – энединовые антибиотики, аклациномизины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, карабицин, карминомицин, карзинофилин, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин (включая ADRIAMICIN®, морфолинодоксорубицин, цианоморфолинодоксорубицин, 2-пирролинодоксорубицин, доксорубициноHCl в инъектируемых липосомах (DOXOL®), липосомный доксорубицин TLC D-99 (MYOCET®), пегилированный липосомный доксорубицин (CAELYX®) и дезоксидоксорубицин), эпирубицин, эзрубицин, идарубицин, марцелломицин, митомицины, такие как митомицин С, микофеноловую кислоту, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, потфиروмицин, пурумицин, квеламицин, родорубицин, 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, тигуанин; аналоги пиримидина, такие как анцитабин, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин; средства, подавляющие функции надпочечников, такие как аминоглютетимид, митотан, трилостан; компенсатор фолиевой кислоты, такой как фолиевая кислота; ацеглатон; гликозид альдофосфамида; аминоклевулиновую кислоту; энилурацил; амсакрин; бестрабуцил; бисантрон; эдатраксат; дефофамин; демеколцин; диазихон; элфорнитин; ацетат эллиптиния; этоглуцид; нитрат галлия; гидроксимочевину; лентинан; лонидаинин; майтанзиноиды, такие как майтанзин и ансамитоцины; митогуазон; митоксантрон; мопиданмол; нитразерин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; лозоксантрон; 2-этилгидразид; прокарбазин; полисахаридный комплекс PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); разоксан; ризоксин; сизофирин; спирогерманий; тенуазоновую кислоту; триазиквон; 2,2',2»-трихлортриэтиламин; трихотецены (например, токсин Т-2, верракурин А, роридин А и

ангуидин); уретан; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид («ara-C»); тиотепа; таксоид, например паклитаксел (TAXOL®), препарат паклитаксела на основе сконструированных связанных с альбумином наночастиц (ABRAXANETM) и доцетаксел (TAXOTERE®); хлорамбуцил; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; средства на основе платины, такие как цисплатин, оксалиплатин и карбоплатин; алкалоиды барвинка, которые предотвращают полимеризацию тубулина из образующихся микротрубочек, включая винбластин (VELBAN®), винкристин (ONCOVIN®), виндезин (ELDISINE®, FILDESIN®) и винорелбин (NAVELBINE®); этопозид (VP-16); ифосфамид; митоксантрон; лейковорин; новантрон; эдатрексат; дауномицин; аминоптерин; ибандронат; ингибитор топоизомеразы RFS 2000; диформетилорнитин (DMFO); ретиноиды, такие как ретиноевая кислота, включая бексаротен (TARGRETIN®); бифосфонаты, такие как клодронат (например, BONEFOS® или OSTAC®), этидронат (DIDROCAL®), NE-58095, золедроновую кислоту/золедронат (ZOMETA®), алендронат (FOSAMAX®), памидронат (AREDIA®), тилудронат (SKELID®) или ризендронат (ACTONEL®); троксацитабин (1,3-диоксолановый нуклеозидный аналог цитозина); антисмысловые олигонуклеотиды, например олигонуклеотиды, которые ингибируют экспрессию генов в путях передачи сигналов, вовлеченных в пролиферацию аберрантных клеток, таких как, например, PKC-альфа, Raf, H-Ras и рецептора эпидермального фактора роста (EGF-R); вакцины, такие как вакцина THERATOPE® и вакцины для генной терапии, например вакцина ALLOVECTIN®, вакцина LEUVECTIN® и вакцина VAXID®; ингибитор топоизомеразы 1 (например, LURTOTECAN®); rmRH (например, ABARELIX®); BAY439006 (сорафениб; Bayer); SU-11248 (Pfizer); перифосин, ингибитор ЦОГ-2 (например, целекоксиб или эторикооксиб), ингибитор протеасом (например, PS341); бортезомиб (VELCADE®); CCI-779; типифарниб (811577); орафениб, ABT510; ингибитор Bcl-2, такой как облимерсен натрия (GENASENSE®); пиксантрон; ингибиторы EGFR (см. определение ниже); ингибиторы тирозинкиназ (см. определение ниже); и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из указанных выше средств; а также сочетания двух или более указанных выше средств, такие как CHOP, сокращенное название комбинированной терапии циклофосфамидом, доксорубицином, винкристином и преднизолоном, и FOLFOX, сокращенное название схемы лечения оксалиплатином (ELOXATINTM) в сочетании с 5-FU и лейковорином.

Также в указанное определение включены противогормональные средства, которые действуют, регулируя или ингибируя действие гормонов на опухоли, такие как антиэстрогены со смешанным профилем агонист/антагонист, включая тамоксифен (NOLVADEX®), 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, торемифен (FARESTON®); идоксифен, дролоксифен, ралоксифен (EVISTA®), триоксифен, кеоксифен и избирательные модуляторы рецепторов эстрогена (SERM), такие как SERM3; чистые антиэстрогены без агонистических свойств, такие как фулвестрант (FASLODEX®) и EM800 (такие средства могут блокировать димеризацию рецепторов эстрогена (ER), ингибировать связывание ДНК, усиливать метаболизм ER и/или снижать уровни ER); ингибиторы ароматазы, включая стероидные ингибиторы ароматазы, такие как форместан и эксместан (AROMASIN®), и нестероидные ингибиторы ароматазы, такие как анастразол (ARIMIDEX®), летрозол (FEMARA®) и аминоглутетимид и другие ингибиторы ароматазы, включая ворозол (RIVISOR®), ацетат мегестрола (MEGASE®), фадрозол, имидазол; агонисты

рилизинг-гормона лютеинизирующего гормона, включая лейпролид (LUPRON® и ELIGARD®), гозерелин, бузерелин и триптерелин; половые стероиды, включая прогестины, такие как ацетат мегестрола и ацетат медроксипрогестерона, эстрогены, такие как диэтилstilбестрол и премарин и андрогены/ретиноиды, такие как флуоксиместерон, полностью трансретиноевая кислота и фенретинид; онапристон; антипрогестероны; понижающие регуляторы рецепторов эстрогенов (ERD); антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид и бикалутамид; тестолактон; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из указанных выше средств; а также сочетания двух или более указанных выше средств.

Для лечения указанных выше аутоиммунных заболеваний или родственных аутоиммунных состояний пациенту можно вводить моноклональное антитело, которое специфически связывается с CD20, предлагаемое в настоящем изобретении, в сочетании с другим терапевтическим агентом, таким как иммуносупрессор, противовоспалительное лекарственное средство, системное гормональное лекарственное средство, антинеопластические и иммуномодулирующее лекарственное средство или другим, используя схему лекарственного лечения на основе нескольких средств. Моноклональное антитело, которое специфически связывается с CD20, можно вводить одновременно, последовательно или попеременно с другим терапевтическим агентом или после проявления устойчивости к другой терапии. Другой терапевтический агент можно вводить в таких же или более низких дозах по сравнению с применяемыми в данной области. Выбор предпочтительного другого терапевтического агента должен зависеть от многих факторов, в том числе от типа заболевания, подлежащего лечению, а также от истории болезни пациента.

В контексте настоящего описания понятие «иммуносупрессор», применяемый для дополнительной терапии, относится к субстанциям, действие которых заключается в подавлении или маскировке иммунной системы пациента. Такие агенты могут представлять собой субстанции, которые подавляют производство цитокинов, осуществляют понижающую регуляцию или подавляют экспрессию аутоантигенов или маскируют антигены главного комплекса гистосовместимости (ГКГ). Примерами таких агентов являются стероиды, такие как глюкокортикостероиды, например преднизон, метилпреднизолон и дексаметазон; 2-амино-6-арил-5-замещенные пиримидины (см. US 4665077), азатиоприн (или циклофосфамид, если существует отрицательная реакция на азатиоприн); бромкриптин; глутаровый альдегид (который маскирует антигены ГКГ, что описано в US 4120649); антиидиотипические антитела к антигенам ГКГ и фрагментам ГКГ; циклоспорин А; цитокин или антагонисты рецептора цитокина, в том числе антитело к интерферону- γ - β или - α ; антитела к фактору- α некроза опухолевых клеток, антитела к фактору- β некроза опухолевых клеток; антитела к интерлейкину-2 и антитела к рецептору IL-2; антитела к L3T4; гетерологичный антилимфоцитарный глобулин; рап-Т-антитела, предпочтительно антитела к CD3 или антитела к CD4/CD4a; растворимый пептид, содержащий LFA-3-связывающий домен (WO 90/08187, опубликована 26 июля 1990 г.); стрептокиназа; TGF- β ; стрептодорназа; РНК или ДНК хозяина; FK506; RS-61443; дезоксиспергуалин; рапамицин; Т-клеточный рецептор (US 5114721); фрагменты Т-клеточного рецептора (Offner и др., Science

251, 1991, сс. 430-432; WO 90/11294; и WO 91/01133); и антитела к Т-клеточному рецептору (EP 340109), такие как T10B9.

Для лечения ревматоидного артрита пациенту можно вводить моноклональное антитело, которое специфически связывается с CD20, предлагаемое в изобретении, изолированно или в сочетании с одним или несколькими из следующих лекарственных средств: DMARD (БПВП) (базисные противовоспалительные средства (например, метотрексат, лефлуномид, сульфасалазин), НПВС или (нестероидные противовоспалительные средства, например, ингибиторы циклооксигеназы), кортикостероиды (например, преднизолон, будесонид). БПВС, которые обычно используют для лечения РА, представляют собой гидроксиклорохин, сульфасалазин, метотрексат, лефлуномид, азатиоприн, D-пеницилламин, препараты на основе золота (оральные), препараты на основе золота (внутримышечные), миноциклин, циклоспорин, стафилококкал (Staphylococcal), полученный иммуноадсорбцией на протеине А.. Общепринятые методы лечения РА описаны, например, в J. A. Singh et al., 2015 American College of Rheumatology Guideline for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. Arthritis Care Res (Hoboken) 68, 1-25 (2016).

Подразумевается, что моноклональное антитело, которое специфически связывается с CD20, по данному изобретению могут использоваться в способах лечения, как описано выше, могут использоваться в лечении, как описано выше, и/или могут использоваться в производстве медикаментов для лечения, как описано выше.

Дозы и пути введения

Моноклональное антитело, которое специфически связывается с CD20, по данному изобретению будет вводиться в количестве, эффективном для лечения состояния, о котором идет речь, т.е. в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого результата. Терапевтически эффективное количество может изменяться в зависимости от таких факторов, как конкретное состояние, по поводу которого проводится лечение, возраста, пола и веса пациента, а также является ли введение моноклонального антитела, которое специфически связывается с CD20, самостоятельным лечением или оно проводится в комбинации с одним или более дополнительных препаратов или методов лечения.

Схемы приема лекарственных средств можно регулировать, чтобы обеспечить оптимальный желаемый ответ. Например, может быть введен один болюс, несколько разделенных доз могут быть введены в течение некоторого времени, или доза могут быть пропорционально уменьшена или увеличена в зависимости от остроты терапевтической ситуации. Особенно полезным является изготовление парентеральных композиций в стандартной лекарственной форме для простоты введения и однородности дозирования. Стандартная лекарственная форма при использовании в данном документе, относится к физически дискретным единицам, пригодным в качестве единичных доз для пациентов/субъектов, подлежащих лечению; каждая единица содержит заданное количество активного соединения, рассчитанное для получения желаемого терапевтического эффекта в сочетании с требуемым фармацевтическим носителем. Спецификация для стандартных лекарственных форм по

настоящему изобретению, как правило, диктуется и непосредственно зависит от (a) уникальных характеристик химиотерапевтического агента и конкретного терапевтического или профилактического эффекта, которые должны быть достигнуты, и (b) ограничений, присущих в технике компаундирования такого активного соединения для лечения чувствительности у субъектов.

Таким образом, квалифицированным специалистам понятно, исходя из раскрытия, представленного в данном документе, что дозы и режим дозирования корректируются в соответствии со способами, хорошо известными в терапевтической области. Это означает, что может быть легко установлена максимально переносимая доза и может быть также определено эффективное количество, обеспечивающее обнаруживаемый терапевтический эффект для пациента, так же как и требования к времени введения каждого агента для достижения видимого терапевтического эффекта для пациента. Таким образом, хотя некоторые дозы и схемы режима введения приведены в качестве примеров в данном документе, эти примеры никоим образом не ограничивают дозы и режимы введения, которые могут понадобиться для пациента в практике применения настоящего изобретения.

Следует отметить, что значения дозировки могут изменяться, в зависимости от типа и тяжести состояния, которое следует облегчить, и может включать одну или более доз. Кроме того, необходимо понимать, что для любого конкретного пациента, конкретные схемы введения должны быть скорректированы через некоторое время согласно индивидуальной потребности и на усмотрение медицинского работника, который осуществляет введение или контролирует введение композиций, и что диапазоны концентрации, приведенные в данном описании, приведены только в качестве примера и не предназначены для ограничения объема или практики заявленных композиций. Кроме того, режим дозирования с композициями по данному изобретению может быть основан на различных факторах, включая тип заболевания, возраст, вес, пол, состояния здоровья пациента, тяжесть состояния, путь введения и конкретное используемое моноклональное антитело, которое специфически связывается с CD20. Таким образом, режим дозирования может широко варьироваться, но может определяться регулярно с помощью стандартных методов. Например, дозы могут быть скорректированы на основе фармакокинетических и фармакодинамических параметров, которые могут включать клинические эффекты, такие как токсические эффекты или лабораторные значения. Таким образом, настоящее изобретение охватывает индивидуальное повышение дозы, которое определяется квалифицированным специалистом. Определение необходимой дозы и режимы хорошо известны в соответствующей области техники и будут понятны специалисту в данной области после ознакомления с идеями, раскрытыми в данном документе.

Примеры подходящих способов введения предусмотрены выше.

Предполагается, что подходящая доза моноклонального антитела, которое специфически связывается с CD20, по данному изобретению будет в диапазоне от 0,1–200 мг/кг, предпочтительно 0,1–100 мг/кг, в том числе около 0,5–50 мг/кг, например, около 1–20 мг/кг. Моноклональное антитело, которое специфически связывается с CD20, может быть введено, например, в дозе по меньшей мере 0,25 мг/кг, например, по меньшей мере 0,5 мг/кг, в том числе не менее 1 мг/кг,

например, по меньшей мере 1,5 мг/кг, например, также как не менее 2 мг/кг, например, по меньшей мере 3 мг/кг, в том числе по меньшей мере 4 мг/кг, например, по меньшей мере 5 мг/кг; и например вплоть до максимально 50 мг/кг, в том числе вплоть до максимально 30 мг/кг, например, вплоть до максимально 20 мг/кг, в том числе вплоть до максимально 15 мг/кг. Введение будет повторяться обычно в подходящие промежутки времени, например, раз в неделю, раз в две недели, один раз каждые три недели или один раз каждые четыре недели, и так долго, как будет сочтено целесообразным ответственным врачом, который может в некоторых случаях увеличить или уменьшить дозу при необходимости.

Диагностическое использование и композиции

Моноклональное антитело, которое специфически связывается с CD20, по настоящему изобретению также используются в диагностических целях (например, *in vitro*, *ex vivo*). Например, данное моноклональное антитело, которое специфически связывается с CD20, по данному изобретению может использоваться для обнаружения или измерения уровня CD20 в образцах, полученных от пациента, например, образец ткани или образец жидкости тела, такой как воспалительный экссудат, кровь, сыворотка крови, жидкость кишечника, слюна или моча. Подходящие методы обнаружения и измерения включают иммунологические методы, такие как проточная цитометрия, твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА), хемилюминесцентный анализ, радиоиммуноанализ и иммуногистология. Изобретение далее включает наборы, например, диагностические наборы, содержащие моноклональное антитело, которое специфически связывается с CD20, по настоящему изобретению, описанное в данном документе.

Для наилучшего понимания изобретения приводятся следующие примеры. Эти примеры приведены только в иллюстративных целях и не должны толковаться как ограничивающие сферу применения изобретения в любой форме.

Все публикации, патенты и патентные заявки, указанные в этой спецификации включены в данный документ путем отсылки. Хотя вышеупомянутое изобретение было довольно подробно описано путем иллюстрации и примера в целях исключения двусмысленного толкования, специалистам в данной области на основе идей, раскрытых в данном изобретении, будет вполне понятно, что могут быть внесены определенные изменения и модификации без отклонения от сущности и объема прилагаемых вариантов осуществления изобретения.

Примеры

Для наилучшего понимания изобретения приводятся следующие примеры. Эти примеры приведены только в иллюстративных целях и не должны толковаться как ограничивающие сферу применения изобретения в любой форме.

Все публикации, патенты и патентные заявки, указанные в этой спецификации включены в данный документ путем отсылки. Хотя вышеупомянутое изобретение было довольно подробно описано путем иллюстрации и примера в целях исключения двусмысленного толкования, специалистам в данной области на основе идей, раскрытых в данном изобретении, будет вполне понятно, что могут быть внесены

определенные изменения и модификации без отклонения от сущности и объема прилагаемых вариантов осуществления изобретения.

Материалы и общие методы

Общая информация, касающаяся нуклеотидных последовательностей легких и тяжелых цепей человеческого иммуноглобулина, представлена у: Kabat E.A. и др., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-ое изд., изд-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991. Аминокислоты цепей антител пронумерованы согласно нумерации EU (Edelman G.M. и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63, 1969, ee. 78- 85; Kabat E.A. и др., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-ое изд., изд-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991).

Методы рекомбинантной ДНК

Для манипуляций с ДНК использовали стандартные методы, описанные у Sambrook J. и др., Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. Реагенты для молекулярной биологии использовали согласно инструкциям производителей.

Синтез генов

Требуемые сегменты генов получали из олигонуклеотидов, созданных путем химического синтеза. Генные сегменты длиной от 300 до 4000 т.п.н., которые фланкированы уникальными сайтами рестрикции, собирали путем отжига и лигирования олигонуклеотидов, включая ПЦР-амплификацию и последующее клонирование через указанные сайты рестрикции. Последовательности ДНК субклонированных генных фрагментов подтверждали путем секвенирования ДНК.

Определение последовательностей ДНК

Последовательности ДНК определяли путем секвенирования по Сенгеру.

Анализ последовательностей ДНК и белков и обработка данных о последовательностях

Применяли пакет программ фирмы Infomax's Vector NT1 Advance suite, версия 8.0 для создания, картирования, анализа, аннотирования и иллюстрации последовательностей.

Экспрессионные векторы

Для экспрессии описанных антител и антигенов применяли варианты экспрессионных плазмид, предназначенных для экспрессии в клетках прокариот (E.coli) кратковременной экспрессии в клетках эукариот (например, в клетках CHO). Помимо кассеты экспрессии антитела векторы содержали: сайт инициации репликации, обеспечивающий репликацию указанной плазмиды в E.coli, гены, придающие устойчивость в E.coli к различным антибиотикам (например, к ампициллину и канамицину).

Слияние генов, содержащих описанные цепи антитела, как указано ниже, осуществляли с помощью ПЦР и/или синтеза и сборки генов с использованием известных методов и процедур рекомбинации путем соединения соответствующих сегментов нуклеиновых кислот, например, с использованием уникальных сайтов рестрикции в соответствующих

векторах. Субклонированные нуклеотидные последовательности подтверждали секвенированием ДНК. Для кратковременных трансфекций создавали большие количества плазмид посредством получения плазмид из трансформированных культур *E. coli*.

Пример 1. Продукция рекомбинантных контрольных антител в суспензионной культуре клеток млекопитающих

В качестве контроля использовали антитело с опубликованной последовательностью Rituximab. Гены переменных доменов тяжелой и легкой цепей антитела были синтезированы и клонированы в вектора pEE-NC, pEE-CK (фиг. 1, 2), предназначенные для наработки белка в клетках млекопитающих, по сайтам рестрикции SalI/NheI и SalI/BstWI соответственно.

Плазмиды нарабатывали в необходимых количествах в клетках *E. coli* и очищали при помощи набора Qiagen.

Контрольные антитела продуцировали в клетках постоянной клеточной линии, полученной из клеток яичника китайского хомячка (линия CHO-T). Суспензионное культивирование осуществляли в колбах на орбитальном шейкере-инкубаторе, с использованием бессывороточных сред производства компании HyCell TransFex-C с добавлением 8 mM L-глутамина и 1 г/л плуроника 68. Для транзientной экспрессии клетки в концентрации $2-2,2 \times 10^6$ кл/мл трансфецировали с помощью линейного полиэтиленimina (ПЭИ «MAX», компания «Polysciences»). Соотношение ДНК/ПЭИ составляло 1:3/1:10. Через 9 дней после трансфекции культуральную жидкость отделяли от клеток фильтрацией через глубинный фильтр с размером пор 0,5/0,22 мкм. Целевые белки выделяли из культуральной жидкости с помощью аффинной хроматографии на бактериальном белке Protein A.

Чистоту полученного раствора белка оценивали с помощью SDS-гель-электрофореза в редуцирующих и нередуцирующих условиях.

Пример 2. Создание наивной FAV-библиотеки человеческих антител MeganLib™

Суммарную РНК В-лимфоцитов из индивидуальных образцов крови более тысячи человеческих доноров выделяли с помощью набора RNeasy Mini Kit согласно предлагаемому протоколу (от QIAGEN). Концентрацию РНК определяли с помощью набора Nanovue (от GE Healthcare) и проверяли качество выделенной РНК с помощью электрофореза в 1,5%-ном агарозном геле.

Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием набора MMLV RT kit (от Evrogen) согласно рекомендуемому протоколу с использованием обратной транскриптазы MMLV и рандом-гексамерных олигонуклеотидов в качестве затравки.

Продукты обратной транскрипции использовали в качестве матрицы в двухступенчатой полимеразной цепной реакции для получения генов переменных доменов, фланкированных сайтами рестрикции, с использованием набора олигонуклеотидов по протоколам авторов [J Biol Chem. 1999 Jun 25; 274(26): 18218-30].

Полученный ДНК препарат VL-CK-VH (фиг. 4) обрабатывали эндонуклеазами рестрикции NheI/Eco91I и лигировали в оригинальную

фагмиду pH5 (фиг. 5). Продукты лигирования трансформировали в электрокомпетентные клетки штамма SS320, приготовленные согласно протоколам [Methods Enzymol. 2000;328: 333-63.]. Репертуар комбинаторной фаговой Fab-дисплейной библиотеки MeganLib™ составлял 1011 трансформантов. Препараты фага Fab-библиотек готовили согласно процедуре, описанной ранее [J Mol Biol. 1991 Dec 5;222(3): 581-97].

Пример 3. Селекция FАВ-библиотеки методом фагового дисплея

Специфичные фаговые Fab-антитела человека против CD20 получали из комбинаторной фаговой Fab-дисплейной библиотеки MeganLib™. Селекцию проводили на эукариотических клетках, экспрессирующих CD20 человека методом фагового дисплея [Nat Biotechnol. 1996 Mar;14(3):309-14; J Mol Biol.1991 Dec 5;222(3): 581-97], но с использованием магнитных частиц и прибора KingFisher Flex, так как использование данной методики позволяет проводить параллельно до 96 различных схем и вариантов биопэннинга.

В селекции методом биопэннинга биотинилированные эукариотические клетки иммобилизовали на поверхности стрептавидиновых магнитных частиц, инкубируя клетки с частицами в течение 20 минут на ротаторе. Далее частицы отмывали ФСБ (pH 7,4), затем блокировали частицы раствором 2% обезжиренного молока на ФСБ (pH 7,4) в течение 1 часа. Затем добавляли к магнитным частицам со связанными клетками раствор фагов, предварительно проинкубированных с антиген-негативными клетками в ФСБ (pH 7,4) с 2% обезжиренным молоком. Инкубировали данную смесь в течение 40 мин при перемешивании. Несвязавшиеся фаги удаляли в ходе нескольких отмывок магнитных частиц раствором ФСБ (pH 7,4) с 0,1% Твин 20. Количество отмывок увеличивали от раунда к раунду (на 1-ом раунде 10 отмывок, на 2-ом – 20 и на 3-ем – 30). Фаги, связавшиеся с антигеном на поверхности магнитных частиц, элюировали с частиц 100 мМ раствором Gly-HCl (pH 2,2) в течение 15 мин при перемешивании, после элюции нейтрализовали раствор 1М TRIS-HCl (pH 7.6). Бактерии штамма E. coli TG1 инфицировали полученными фагами, нарабатывали в них фаги, выделяли их и использовали в следующем раунде селекции. После трех-четырех раундов из фагов выделяли их ДНК (фагмиды), и гены переменных доменов антител клонировали в экспрессионные вектора (Фиг. 6) для наработки Fab в клетках E.coli.

Пример 4. Скрининг библиотек

Первичный скрининг

Наработку Fab проводили по стандартной методике: бактериальные клетки трансформируют экспрессионными векторами, содержащими гены Fab, а последующее добавление индуктора, который запускает транскрипцию lac-оперона, в среду при культивировании полученных трансформантов вызывает экспрессию Fab.

Далее проводили ИФА связывания Fab с иммобилизованным на подложке пептидом CD20. Детекцию связавшихся с антигеном Fab проводили с помощью anti human Fab HRP-конъюгированного вторичного антитела (от Pierce-ThermoScientific).

В качестве положительного контроля использовали последовательность Fab Rituximab встроенную в экспрессионную плазмиду pLL (Фиг. 6).

В результате первичного скрининга отобраны клоны, обладающие способностью связываться с целевым пептидом CD20. Материал передан на вторичный скрининг.

Вторичный скрининг

Целью вторичного скрининга было отобрать клоны, продуцирующие Fab, которые взаимодействуют с пептидом CD20 и не взаимодействуют с другими антигенами IL6R-Fc, PCSK9-VG-FE, PD-1-Fc.

Наработку Fab проводили по стандартной методике. Далее проводили ИФА связывания Fab с различными антигенами, иммобилизованными на подложке по стандартной процедуре.

В результате вторичного скрининга отобрали клоны, продуцирующие Fab, которые специфично связывают только целевой пептид CD20.

Пример 5. Оптимизация лидерных кандидатов

Выбранные кандидаты были подвергнуты оптимизации с целью повышения гуманизации. Для выбора точек замен использовался инструмент Humanizer, входящий в состав программного пакета YLab (разработка компании Биокад). В качестве источника данных из базы IMGT были взяты «гермлайн» функциональные V, D, J сегменты различных биологических видов. В качестве позитивных референсов использовались сегменты человека, в качестве негативных – крысы и мыши. Используя эти данные, инструмент предложил позиции для замен.

Для дальнейшего выбора было сгенерировано 1000 кандидатов с различными подмножествами выбранного набора замен. Полученные кандидаты были промоделированы на основании кристаллической структуры комплекса исходного кандидата с мишенью CD20. Модели были получены с помощью программ BENDER (разработка компании Биокад) и BioLuminate (часть программного пакета Schrodinger Suite, разработка компании Schrodinger). Полученные модели были оценены с помощью вычисления среднего значения MM-GBSA с применением силового поля OPLS 2005 на траекториях молекулярной динамики длительностью 100 нс. Траектории молекулярной динамики были получены с помощью программы Desmond (часть программного пакета Schrodinger Suite, разработка компании Schrodinger). Среди полученных результатов четко выделялся кластер в 133 кандидата, которые и были предложены к дальнейшему синтезу вместе с контрольным кандидатом.

Пример 6. Получение полноразмерных антител в формате IgG1

Для полученных 133 кандидатов с помощью инструмента OligoDesigner программного пакета YLab (Биокад) была проведена кодон-оптимизация для CHO. Оптимизированные последовательности переменных доменов тяжелой и легкой цепей были синтезированы de novo и клонированы в вектора pEE-HC, pEE-CK (формат IgG1) по сайтам рестрикции SalI/NheI и SalI/BsiWI соответственно (фиг. 1, 2). Схематическое изображение формата IgG1 на фиг. 3.

Полученными генетическими конструкциями трансформировали клеточную линию CHO-T. Белки выделяли и очищали по стандартной методике путем аффинной хроматографии на бактериальном белке Protein A как описано в примере 1. Электрофорез проводили в денатурирующих условиях в 7,5% ПААГ. Продуктивность 22 кандидатов оказалась ниже

порогового уровня (50 мг/л), и соответственно они не брались на выделение и очистку.

Пример 7. Секвенирование высокоаффинных клонов

Гены вариабельных доменов позитивных клонов секвенировали, согласно стандартным протоколам на аппарате Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) и анализировали.

Пример 8. Определение аффинности полноразмерных антител на Forte Bio Octet RED 384

Значения kD полученных полноразмерных кандидатов оценивались на приборе Forte Bio Octet RED 384.

Для работы использовали SAX биосенсоры и пептид CD20, модифицированный биотином (Sigma Aldrich). В качестве контроля использовали антитело Rituximab. SAX-биосенсоры погружались в раствор с биотинилированным пептидом CD20 в концентрации 20 мкг/мл где происходила иммобилизация пептида. Дальнейший анализ проводился при 30°C с использованием ФСБ, содержащим 0,1% Твин-20 и 0,1% БСА в качестве рабочего буфера.

После того как в буферном растворе прописывали базовую линию сенсоры погружали в лунки с раствором антител в концентрации 10 мкг/мл на 150 секунд, где происходит ассоциация комплекса. Затем детектировали диссоциацию комплекса в буферном растворе в течении 300 секунд.

Кривые связывания с вычетом базового сигнала анализировали с помощью программы Octet Data Analysis (версия 9.0) согласно стандартной процедуре с использованием модели взаимодействия 1:1.

На анализ было передано 116 кандидатов. Из них 67 кандидатов не показали связывания с пептидом. Оставшиеся 49 кандидатов взаимодействовали с пептидом с наномолярной и микромолярной аффинностью (фиг. 7 и таблица 1).

Таблица 1

Кандидат	Response (nm)	kD (M)	kon (1/Ms)	kdis (1/s)	Full R ²
BCD132 L-001	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания
BCD132 L-002	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания
BCD132 L-003	0,2576	1,87E-07	3,06E+05	5,73E-02	0,9909
BCD132 L-004	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания
BCD132 L-007	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания
BCD132 L-008	0,1189	7,51E-07	1,85E+05	1,39E-01	0,9899
BCD132 L-009	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания
BCD132 L-010	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания

BCD132 L-011	0,2545	4,35E-07	3,41E+05	1,48E-01	0,996
BCD132 L-012	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания
BCD132 L-013	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания
BCD132 L-015	0,7312	1,51E-07	3,00E+05	4,54E-02	0,9981
BCD132 L-016	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания
BCD132 L-017	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания
BCD132 L-018	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания
BCD132 L-019	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания
BCD132 L-020	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания
BCD132 L-021	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания
BCD132 L-022	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания
BCD132 L-023	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания
BCD132 L-024	0,2377	2,72E-07	5,86E+05	1,59E-01	0,9969
BCD132 L-025	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания
BCD132 L-026	0,189	9,74E-08	8,72E+05	8,50E-02	0,9761
BCD132 L-028	0,2631	1,35E-07	9,30E+05	1,26E-01	0,9849
BCD132 L-029	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания
BCD132 L-030	0,7685	1,11E-05	2,39E+03	2,65E-02	0,8223
BCD132 L-031	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания
BCD132 L-033	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания
BCD132 L-034	0,8465	8,45E-06	3,73E+03	3,15E-02	0,9308
BCD132 L-035	1,3668	6,56E-06	3,35E+03	2,20E-02	0,9829
BCD132 L-037	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания
BCD132 L-038	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания
BCD132 L-039	1,493	6,91E-06	2,44E+03	1,69E-02	0,9924
BCD132 L-040	1,099	9,14E-06	3,11E+03	2,84E-02	0,9675

BCD132 L-041	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания
BCD132 L-042	0,745	8,51E-06	4,46E+03	3,80E-02	0,8425
BCD132 L-043	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания
BCD132 L-044	0,638	8,90E-06	3,55E+03	3,16E-02	0,8215
BCD132 L-045	0,7287	1,04E-05	3,70E+03	3,83E-02	0,9562
BCD132 L-046	0,4142	1,38E-05	4,68E+03	6,44E-02	0,9478
BCD132 L-047	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания
BCD132 L-048	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания
BCD132 L-049	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания
BCD132 L-050	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания
BCD132 L-051	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания
BCD132 L-052	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания
BCD132 L-053	0,1125	1,36E-07	4,64E+05	6,31E-02	0,9252
BCD132 L-054	0,083	1,59E-07	3,10E+05	4,92E-02	0,8279
BCD132 L-055	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания
BCD132 L-056	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания
BCD132 L-057	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания
BCD132 L-058	0,1308	1,30E-07	2,08E+06	2,70E-01	0,9744
BCD132 L-059	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания
BCD132 L-060	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания
BCD132 L-061	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания
BCD132 L-062	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания
BCD132 L-063	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания
BCD132 L-064	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания
BCD132 L-065	0,0551	6,48E-08	1,01E+06	6,53E-02	0,8386
BCD132 L-066	0,0398	1,14E-05	4,10E+03	4,66E-02	0,8193

BCD132 L-068	0,0984	9,34E-08	9,50E+05	8,87E-02	0,876
BCD132 L-069	0,1078	1,29E-07	6,96E+05	8,96E-02	0,8737
BCD132 L-070	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания
BCD132 L-071	0,3793	1,36E-07	7,59E+05	1,03E-01	0,9755
BCD132 L-072	0,2878	9,15E-08	7,82E+05	7,16E-02	0,8842
BCD132 L-073	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания
BCD132 L-074	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания
BCD132 L-075	0,4394	1,01E-07	8,20E+05	8,29E-02	0,9752
BCD132 L-076	0,2166	8,14E-08	8,45E+05	6,88E-02	0,7702
BCD132 L-077	0,065	7,48E-08	9,24E+05	6,91E-02	0,8382
BCD132 L-079	0,1921	1,88E-07	3,16E+05	5,96E-02	0,9433
BCD132 L-080	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания
BCD132 L-081	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания
BCD132 L-082	0,0695	7,99E-08	1,05E+06	8,41E-02	0,9063
BCD132 L-083	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания
BCD132 L-084	0,3092	1,86E-07	3,41E+05	6,35E-02	0,9697
BCD132 L-085	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания
BCD132 L-087	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания
BCD132 L-088	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания
BCD132 L-089	0,1279	5,94E-08	1,75E+06	1,04E-01	0,879
BCD132 L-092	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания
BCD132 L-093	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания
BCD132 L-094	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания
BCD132 L-095	0,5518	7,72E-08	1,04E+06	7,99E-02	0,9778
BCD132 L-097	0,2544	7,32E-08	1,59E+06	1,17E-01	0,9603
BCD132 L-098	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания

BCD132 L-099	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания
BCD132 L-100	0,639	8,07E-08	7,36E+05	5,95E-02	0,98
BCD132 L-101	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания
BCD132 L-102	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания
BCD132 L-103	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания
BCD132 L-104	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания
BCD132 L-105	0,207	6,28E-08	1,08E+06	6,75E-02	0,8085
BCD132 L-106	0,2847	4,65E-08	2,30E+06	1,07E-01	0,8997
BCD132 L-107	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания
BCD132 L-109	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания
BCD132 L-110	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания
BCD132 L-111	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания
BCD132 L-112	0,3355	6,30E-08	1,86E+06	1,17E-01	0,9556
BCD132 L-113	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания
BCD132 L-114	0,3495	6,03E-08	1,22E+06	7,36E-02	0,877
BCD132 L-115	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания
BCD132 L-116	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания
BCD132 L-117	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания
BCD132 L-118	0,5571	9,04E-08	9,57E+05	8,66E-02	0,973
BCD132 L-119	0,2468	4,91E-08	2,36E+06	1,16E-01	0,9109
BCD132 L-120	0,3083	6,95E-08	1,69E+06	1,18E-01	0,9443
BCD132 L-121	0,1834	5,97E-08	2,52E+06	1,50E-01	0,9316
BCD132 L-123	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания
BCD132 L-124	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания
BCD132 L-126	0,2006	4,24E-08	2,19E+06	9,29E-02	0,8596
BCD132 L-129	0,4355	9,00E-08	1,11E+06	9,98E-02	0,9724

BCD132 L-130	0,4193	8,67E-08	1,08E+06	9,31E-02	0,9485
BCD132 L-131	0,4494	9,39E-08	9,77E+05	9,17E-02	0,9612
BCD132 L-132	0,7019	1,07E-07	8,38E+05	8,97E-02	0,9888
BCD132 L-133	0,2948	5,66E-08	2,12E+06	1,20E-01	0,9316

Кандидаты BCD132L-026, BCD132L-028, BCD132L-075 и BCD132L-077 были выбраны на основе результатов вышеуказанного анализа.

Пример 9. Определение аффинности финальных кандидатов с транзитной наработкой к CD20 на Forte Bio Octet RED 384

Для работы использовали SAX биосенсоры и пептид CD20, модифицированный биотином (Sigma Aldrich). В качестве контроля использовали антитело Rituximab. SAX-биосенсоры погружались в раствор с биотинилированным пептидом CD20 в концентрации 20 мкг/мл где происходила иммобилизация пептида. Дальнейший анализ проводился при 30°C с использованием ФСБ, содержащим 0,1% Твин-20 и 0,1% БСА в качестве рабочего буфера.

После того как в буферном растворе прописывали базовую линию сенсоры погружали в лунки с раствором антител в концентрации 10 мкг/мл на 210 секунд, где происходит ассоциация комплекса. Затем детектировали диссоциацию комплекса в буферном растворе в течении 100 секунд.

Кривые связывания с вычетом базового сигнала анализировали с помощью программы Octet Data Analysis (версия 9.0) согласно стандартной процедуре с использованием модели взаимодействия 1:1 (см. фиг. 8-11).

BCD132L-026	0,5411	3,99E-08	6,98E+05	2,79E-02	0,9795
BCD132L-028	0,4703	6,28E-08	4,17E+05	2,62E-02	0,9924
BCD132L-075	0,8719	6,23E-08	3,30E+05	2,06E-02	0,9969
BCD132L-077	0,4774	2,76E-08	6,36E+05	1,75E-02	0,9413

Кандидаты BCD132L-028 и BCD132L-077 отобраны на основе результатов вышеуказанного анализа.

Пример 10. Получение клеточной линии, стабильно продуцирующей антитела в формате IgG1

По результатам всех вышеперечисленных тестов лучше всего показали себя кандидат BCD132-L-028, BCD132-L-077. Последовательности их тяжелой и легкой цепей были клонированы в вектора рSX по сайтам HindIII, XbaI (Фиг.24). Полученные плазмиды нарабатывали в клетках E. coli и выделяли с помощью прибора BenchPro в количестве 600-700 мкг. Плазмиды линейаризовали в течение ночи с помощью эндонуклеазы PvuI, затем переосаждали этанолом и доводили конечную концентрацию до 900-1100 нг/мкл.

Клеточную линию CHO-K1-S культивировали в среде S.3.87 MM (синтетическая среда, разработанная в «БИОКАД» без содержания FBS) + 6 mM Glutamine. Транфекцию генетическими конструкциями, содержащими кодирующие последовательности цепей кандидатов BCD132-

L-028, BCD132-L-077, проводили с помощью электропорации на приборе Nucleofector™ (Lonza) согласно протоколу производителя.

На следующий день после трансфекции в течение 24 дней проводилась селекция трансфицированной культуры добавлением в среду пурамицина (конечная концентрация 7,2 мкг/мл), гигромицина В (конечная концентрация 640 мкг/мл). Полученная после селекции популяция клеток была клонирована. Клеточные клоны, экспрессирующие BCD132-L-028, BCD132-L-077 соответственно, были выбраны на основе результатов анализа уровня целевого белка и гомогенности его структуры, с учетом скорости роста, гомогенности популяции и отсутствия морфологических изменений, тогда как кандидаты BCD132-L-026 и BCD-132-L-075 были отсеяны.

Пример 11. Определение аффинности финальных кандидатов, наработанных в стабильных линиях, к CD20 на Forte Bio Octert RED 384

Для работы использовали SAX биосенсоры и пептид CD20, модифицированный биотином (Sigma Aldrich). В качестве контроля использовали антитело Rituximab. SAX-биосенсоры погружались в раствор с биотинилированным пептидом CD20 в концентрации 20 мкг/мл где происходила иммобилизация пептида. Дальнейший анализ проводился при 30°C с использованием ФСБ, содержащим 0,1% Твин-20 и 0,1% БСА в качестве рабочего буфера.

После того как в буферном растворе прописывали базовую линию сенсоры погружали в лунки с раствором антител в концентрации 10 мкг/мл на 150 секунд, где происходит ассоциация комплекса. Затем детектировали диссоциацию комплекса в буферном растворе в течении 300 секунд.

Кривые связывания с вычетом базового сигнала анализировали с помощью программы Octet Data Analysis (версия 9.0) согласно стандартной процедуре с использованием модели взаимодействия 1:1 (фиг. 12-15).

BCD132L-028	0,2717	7,57E-08	9,05E+05	6,85E-02	0,9754
BCD132L-077 (1,2)	0,4031	7,39E-08	6,41E+05	4,74E-02	0,9846
BCD132L-077 (3,4)	0,2913	7,49E-08	8,47E+05	6,34E-02	0,9776
BCD132L-077 (5,6)	0,5857	6,71E-08	9,52E+05	6,39E-02	0,9682

Пример 12. Определение аффинности финальных кандидатов, наработанных в стабильных линиях, к FcγRIIIa-158F на Forte Bio Octert RED 384

Для работы использовали SAX биосенсоры и белки FcγRIIIa-158F, модифицированные биотином (Sigma Aldrich). SAX-биосенсоры погружались в раствор с биотинилированным белком в концентрации 5 мкг/мл где происходила иммобилизация белка до уровня сигнала 0,5 нм. Дальнейший анализ проводился при 30°C с использованием ФСБ, содержащим 0,1% Твин-20 и 0,1% БСА в качестве рабочего буфера.

После того как в буферном растворе прописывали базовую линию сенсоры погружали в лунки с раствором антител в разных концентрациях на 90 секунд, где происходит ассоциация комплекса. Затем

детектировали диссоциацию комплекса в буферном растворе в течении 150 секунд.

Кривые связывания с вычетом базового сигнала анализировали с помощью программы Octet Data Analysis (версия 9.0) согласно стандартной процедуре с использованием модели взаимодействия 1:1 (фиг. 16-19).

BCD132L-028	5,93E-08	7.273E05	4.316E-02	0.9946
BCD132L-077 (1,2)	4,47E-08	7.658E05	3.423E-02	0.9976
BCD132L-077 (3,4)	5,41E-08	8.084E05	4.375E-02	0.991
BCD132L-077 (5,6)	4,17E-08	9.231E05	3.845E-02	0.9954

Пример 13. Определение аффинности финальных кандидатов, наработанных в стабильных линиях, к FcyRIIIa-158V на Forte Bio Octert RED 384

Для работы использовали SAX биосенсоры и белки FcyRIIIa-158V, модифицированные биотином (Sigma Aldrich). SAX-биосенсоры погружались в раствор с биотинилированным белком в концентрации 5 мкг/мл где происходила иммобилизация белка до уровня сигнала 0,5 нм. Дальнейший анализ проводился при 30°C с использованием ФСБ, содержащим 0,1% Твин-20 и 0,1% БСА в качестве рабочего буфера.

После того как в буферном растворе прописывали базовую линию сенсоры погружали в лунки с раствором антител в разных концентрациях на 90 секунд, где происходит ассоциация комплекса. Затем детектировали диссоциацию комплекса в буферном растворе в течении 150 секунд.

Кривые связывания с вычетом базового сигнала анализировали с помощью программы Octet Data Analysis (версия 9.0) согласно стандартной процедуре с использованием модели взаимодействия 1:1 (фиг. 20-23).

BCD132L-028	1,78E-08	6.385E05	1.139E-02	0.9963
BCD132L-077 (1,2)	2,38E-08	6.563E05	1.564E-02	0.9942
BCD132L-077 (3,4)	1,66E-08	6.906E05	1.149E-02	0.9961
BCD132L-077 (5,6)	2,27E-08	7.311E05	1.659E-02	0.9952

Пример 14. Оценка специфического связывания BCD-132-L-028 и BCD-132-L-077 с рецептором CD20 на клеточной линии WIL2-S методом проточной цитометрии.

В качестве контрольного антитела использовали Мабтера (Ритуксимаб). Анализируемые образцы и контрольное антитело разводили до концентрации 200 мкг/мл, титровали с шагом 4 в Stain Buffer (PBS, 0.5% BSA, 0.1% NaN₃). Клеточную суспензию WIL2-S (ATCC® CRL8885) с концентрацией 1×10^6 кл/мл, инкубировали с титром растворов стандартного и исследуемых образцов. Перемешивали и инкубировали в течение 30 минут на льду. По истечению времени инкубации планшет центрифугировали, отбирали супернатант, вносили 100 мкл Stain Buffer, ресуспендировали и центрифугировали. Супернатант отбирали,

осадок ресуспендировали в растворе конъюгированных флуоресцентных анти-human Fc-PE антител (Jackson ImmunoResearch, 109-115-098) в Stain Buffer. Планшет инкубировали в течение 30 минут на льду, в темноте. По истечению времени инкубации планшет центрифугировали, отбирали супернатант, вносили 100 мкл Stain Buffer, ресуспендировали и центрифугировали. Супернатант отбирали, осадок ресуспендировали в 150 мкл Stain Buffer и анализировали с использованием проточного цитометра Guava2HT (Merck Millipore). Анализ данных проводили при помощи модуля InCyte программного обеспечения guavaSoft 3.1.1.

Уровень специфического связывания с рецептором CD20 на клеточной линии WIL2-S исследуемых антител BCD-132-L-028 и BCD-132-L-077 аналогичен уровню специфического связывания Мабтера (ритуксимаб). Результаты показаны на фиг. 25.

Пример 15. Оценка комплемент-зависимой цитотоксичности BCD-132-L-028 и BCD-132-L-077.

Для анализа комплемент-зависимой цитотоксичности использовали клеточную линию WIL2-S (ATCC® CRL-8885™).

Анализ проводили в среде RPMI-1640, 2мМ глутамином, 0,1% бычьим сывороточным альбумином, 50 мкг/мл гентамицина. Готовили серию разведений анализируемых антител BCD-132-L-028, BCD-132-L-077 и Мабтера (Ритуксимаб) от концентрации 50 мкг/мл. Вносили подготовленные растворы в 96-луночные культуральные планшеты по 50 мкл на лунку. Подготавливали клеточную суспензию WIL2-S 1×10^6 кл/мл и вносили по 50 мкл на лунку планшета. Подготавливали рабочий раствор комплемента (Quidel, A113), вносили в культуральные планшеты из расчёта 50 мкл/лунку.

Планшеты инкубировали в течение 2 часов при 37°C, 5% CO₂. По окончании времени инкубации вносили по 15 мкл красителя Аламар синий в лунки планшета, инкубировали планшет при 37°C, 5% CO₂ до развития градиентной окраски. Оценивали уровень флуоресценции с помощью планшетного детектора Infinite M200Pro при длине волны возбуждения/испускания 544/590 нм.

BCD-132-L-028 и BCD-132-L-077 показывают аналогичный уровень комплемент-зависимой цитотоксичности по сравнению с Мабтера (ритуксимаб). Результаты показаны на фиг. 26, фиг. 27.

Пример 16. Оценка антитело-зависимой клеточной цитотоксичности BCD-132-L-028 и BCD-132-L-077 с использованием репортерных линий Jurkat-NFAT-CD16.

Для оценки антитело-зависимой клеточной цитотоксичности в качестве таргетной линии использовали WIL-2S (ATCC® CRL-8885™). В качестве эффекторных были использованы репортерные линии Jurkat-NFAT-CD16 High (аллотип CD16 с высокой аффинностью, V158) и Jurkat-NFAT-CD16 Low (аллотип CD16 с низкой аффинностью, F158), стабильно экспрессирующие на своей поверхности FcγRIIIa (CD16a) рецептор и несущие ген, кодирующий люциферазу, под контролем NFAT-отвечающих элементов.

Подготавливали клеточную суспензию WIL-2S $0,5 \times 10^6$ кл/мл в RPMI1640 с 2мМ L-Gln, 4% (v/v) FBS с низким содержанием IgG и 5 мкг/мл гентамицина. Вносили по 25 мкл/лунку суспензии таргетных клеток в культуральные планшеты с белыми стенками.

Вносили титр BCD-132-L-028 или BCD-132-L-077 и Мабтера (ритуксимаб) от 5 мкг/мл с шагом 5 (25 мкл/лунку), и суспензию 3×10^6

ккл/мл репортерной линии Jurkat-NFAT-CD16 High или Low (25 мкл/лунку). Планшеты перемешивали и инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 4–8 часов.

По окончании времени инкубации вносили по 75 мкл/лунку реагента для детекции люциферазной активности Bio-Glo (Promega) и проводили измерение люминесценции с использованием Infinite M200Pro при времени интеграции 100 ms.

BCD-132-L-028 и BCD-132-L-077 значительно превосходят по ADCC активности Мабтера: активность в 3–4 раза выше при использовании репортерной линии с аллотипом CD16 с высокой аффинностью, и в 12–16 раз выше при использовании репортерной линии с аллотипом CD16 с низкой аффинностью. Результаты показаны на фиг. 28, фиг. 29 для репортерной линии с аллотипом CD16 с низкой аффинностью и фиг. 30, фиг. 31 для репортерной линии с аллотипом CD16 с высокой аффинностью.

Пример 17. Оценка деплеции CD19+ В-лимфоцитов, вызываемой BCD-132-L-028 и BCD-132-L-077, на цельной крови здоровых доноров.

Оценку активности исследуемых образцов проводили *ex vivo* с использованием цельной крови здоровых доноров с аллотипами рецептора CD16a: FF (низкоаффинный рецептор), FV (гетерозигота), VV (высокоаффинный рецептор).

В качестве контрольного антитела использовали Мабтера (Ритуксимаб). Контрольное и исследуемые антитела титровали в трипликатах в 96-луночной планшете. Кровь здорового донора забирали в вакуумные пробирки с Li-гепарином. Инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре. В 96-луночный планшет с краевой бороздкой (Eppendorf) вносили по 10 мкл приготовленных растворов антител и 190 мкл цельной крови. В краевую бороздку 96-луночного планшета вносили 5 мл DPBS. Перемешивали планшет на орбитальном шейкере (2 mm) в течение 2-х минут при 600 rpm. Инкубировали в CO₂-инкубаторе в течение 22 часов.

По истечению времени инкубации проводили окрашивание образцов флуоресцентномеченными антителами против CD45, CD3/CD19 (BD Pharmingen) в течении 1 часа. Фиксировали клетки и лизировали эритроциты с помощью лизирующего буфера BD Pharmingen. Проводили двукратную отмывку от лизирующего буфера в Stain Buffer (DPBS, 0.1% NaN₃, 0.5% BSA) и оценивали количество CD45+CD3+ и CD45+CD19+ событий (не менее 10 000 событий по гейту CD45+). Анализ данных проводили при помощи модуля InCyte программного обеспечения guavaSoft 3.1.1.

Оценку относительной В-клеточной деплеции проводили с использованием В-/T-cell ratio точки без антител (количество В-клеток принимается за 100% = 0% В-клеточной деплеции). В-/T-cell ratio рассчитывали по формуле:

$$\text{В-/T-cell ratio} = \frac{\text{количество В-клеток}}{\text{количество Т-клеток}}$$

Процент В-клеточной деплеции, рассчитывали по следующей формуле:

$$\text{B-cell depletion, \%} = 100 - \left(\frac{100}{\text{B/T-cell ratio without antibody}} \right) * \text{B/T-cell ratio with antibody}$$

Построение четырехпараметровых кривых проводили с помощью среды для статистической обработки данных R с использованием пакета drc.

Исследуемые антитела BCD-132-L-028 и BCD-132-L-077 значительно превосходят по активности Мабтера (ритуксимаб). Так при использовании крови доноров с аллотипом FF BCD-132-L-028 и BCD-132-L-077 вызывают деплецию порядка 50% CD19+ клеток, в то время как Мабтера (ритуксимаб) – порядка 20%. Значения ED50 для Мабтера (ритуксимаб) на порядок превышает аналогичное значение для BCD-132-L-028 и BCD-132-L-077 при использовании крови доноров с аллотипом CD16 FV и VV. Уровень В-клеточной деплеции BCD-132-L-028 и BCD-132-L-077 не зависит от аллотипа CD16 донора. Результаты показаны на фиг. 32.

Пример 18. Анализ активности антител зависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) кандидатов антител против CD20 на клеточной линии Ramos с использованием мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) человека.

Для анализа ADCC использовалась клеточная линия Ramos, экспрессирующая CD20, и PBMC здоровых доноров. Клетки Ramos культивировались в среде RPMI-1640 с 10% FBS (фетальной бычьей сывороткой) при 37°C 5% CO₂, окрашивались флюоресцентным красителем Кальцеин АМ, который вытекает только из клеток с поврежденной клеточной стенкой. В среде RPMI-1640 с 10% FBS приготовили суспензию клеток с плотностью 10⁵ клеток/мл.

PBMC) выделяли из венозной крови здоровых доноров с помощью разделения в градиенте плотности фиколла (1,077 г/см³). В среде RPMI-1640 с 10% FBS приготовили суспензию клеток с плотностью 5*10⁶ клеток/мл.

Для анализа ADCC в лунки 96-луночного планшета внесли серию разведений антител по 50 мкл. К ним добавили по 100 мкл суспензии Ramos и по 50 мкл суспензии PBMC. Планшет инкубировали в течение 4 часов при 37°C 5% CO₂. За полчаса до окончания инкубации в лунки, определяющие максимальный лизис клеток, добавили по 10 мкл 10% Tryton X-100. После окончания инкубации переносили по 100 мкл клеточной жидкости, не захватывая клетки, в новый планшет. Определяли интенсивность флюоресценции образцов при длине волны возбуждения/испускания 485/538 нм.

Для расчета эффективности ADCC использовали формулу:

$$\text{ADCC} = \frac{\text{Экспериментальные данные} - \text{фон}}{\text{Полный лизис} - \text{фон}} \times 100\%$$

По зависимости ADCC от концентрации антител определяли зависимость, описываемую 4-х параметрическим уравнением, с помощью пакета GraphPad Prism 6.0 и вычисляли полумаксимальную эффективную концентрацию (EC50).

Согласно проведенному эксперименту по ADCC активности кандидаты антител против CD20 BCD-132-L-028 и BCD-132-L-077 превосходят коммерческое антитело Ритуксимаб. Результаты показаны на фиг. 33.

Пример 19. Исследование активности препарата моноклональных антител BCD132-L-077 при многократном внутривенном введении яванским макакам (*Macaca fascicularis*) на модели экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (ЭАЭ).

Исследование проведено на самцах яванских макак (*Macaca fascicularis*). Общее количество животных в эксперименте составило 12 голов, каждая группа животных включала 4 обезьяны. В эксперименте были использованы две дозы препарата: 5 мг/кг; 22 мг/кг, животные контрольной группы получали препарат плацебо. Данные по экспериментальным группам животных представлены в Таблице 2.

Таблица 2. Распределение животных по группам.

Номер группы	Кол-во животных	Препарат	Способ введения	Доза
1	4 (♂)	BCD132-L-077	в/в	5 мг/кг
2	4 (♂)			22 мг/кг
3	4 (♂)	Плацебо		-

Для индукции экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита у *M. fascicularis* была использована модифицированная методика, описанная в ряде публикаций. Для сенсibilизации приматов использовали рекомбинантный белок производства ЗАО «БИОКАД», представляющий собой внеклеточный домен человеческого белка миелина олигодендроцитов (rhMOG, аминокислоты 1-125).

Каждому животному трижды вводили эмульсию, содержащую 400 мкг белка в 400 мкл фосфатного буферного раствора, смешанного с 400 мкл полного адъюванта Фрейнда. Непосредственно после первого введения rhMOG обезьянам инъецировали термоинактивированную вакцину *B. pertussis*.

Первое введение rhMOG

Для приготовления эмульсии 10 мг rhMOG растворяли в 10 мл фосфатного буферного раствора. К полученному раствору добавляли 10 мл полного адъюванта Фрейнда. Полученную эмульсию вводили внутрикожными инъекциями в 8 точек по 100 мкл (общий объем введения для каждой обезьяны составит 800 мкл):

4 в область спины (между лопаток, 2 справа и 2 слева от позвоночника);

2 в паховую область (1 справа и 1 слева);

2 в подмышечные области (1 справа и 1 слева).

После первого введения rhMOG вводили внутривенно 10^{10} инактивированных частиц *B. pertussis*.

Интервал между первой и второй иммунизацией составлял 28 суток.

Второе введение rhMOG

Для приготовления эмульсии 10 мг rhMOG растворяли в 10 мл фосфатного буферного раствора. К полученному раствору добавляли 10

мл полного адъюванта Фрейнда. Полученную эмульсию вводили внутрикожными инъекциями в 8 точек по 100 мкл (общий объем введения для каждой обезьяны составит 800 мкл):

4 в область спины (между лопаток, 2 справа и 2 слева от позвоночника);

2 в паховую область (1 справа и 1 слева);

2 в подмышечные области (1 справа и 1 слева).

Интервал между второй и третьей иммунизацией составлял 14 суток

Третье введение rhMOG

Для приготовления эмульсии 10 мг rhMOG растворяли в 10 мл фосфатного буферного раствора. К полученному раствору добавляли 10 мл полного адъюванта Фрейнда. Полученную эмульсию вводили внутрикожными инъекциями в 8 точек по 100 мкл (общий объем введения для каждой обезьяны составит 800 мкл):

4 в область спины (между лопаток, 2 справа и 2 слева от позвоночника);

2 в паховую область (1 справа и 1 слева);

2 в подмышечные области (1 справа и 1 слева).

Оценка эффективности препарата BCD132-L-077 на модели ЭАЭ (экспериментальный аллергический энцефаломиелит)

Для оценки активности препарата проводили гистологическое исследование тканей головного и спинного мозга. Оценку выраженности воспалительной реакции в тканях спинного и головного мозга осуществляли по трехбалльной шкале согласно таблице 3.

Таблица 3. Шкала для оценки выраженности воспалительной реакции

Баллы	Выраженность воспаления
0	отсутствие признаков воспаления;
1	редкие (1-3 на срез) очаги периваскулярной инфильтрации;
2	умеренная частота (4-10 на срез) очагов периваскулярной инфильтрации; возможно, воспаление мозговых оболочек;
3	повсеместные очаги периваскулярной инфильтрации и инфильтрации нервной ткани воспалительными клетками.

Для оценки выраженности дегенеративных изменений в тканях спинного и головного мозга приматов использовали шкалу, представленную в таблице 4.

Таблица 4. Шкала для оценки выраженности демиелинизации в тканях спинного и головного мозга

Баллы	Выраженность демиелинизации
0	отсутствие признаков демиелинизации;
1	редкие (1-3 на срез) очаги демиелинизации;
2	умеренная частота (4-10 на срез) очагов демиелинизации;
3	обширная демиелинизация с крупными сливающимися очагами.

Результаты оценки выраженности воспаления представлены на Фиг. 34. Показано, что при введении использованных в исследовании доз препарата 5,0 мг/кг и 22,0 мг/кг имело место снижение общего балла группы в сравнении со значением контрольной группы (контроль-плацебо). Выявленные изменения не носили достоверного характера. Также не было значимого отличия между экспериментальными группами.

Таким образом можно говорить о сопоставимом по выраженности уровне противовоспалительного эффекта для двух испытанных доз препарата.

Результаты оценки выраженности дегенеративных изменений в нервной ткани приведены на Фиг. 35. При использовании исследуемого препарата BCD132-L-077 в минимальной дозе 5,0 мг/кг наблюдали значимое, в сравнении с контролем, снижение балла, характеризующего демиелинизацию.

В группе животных, получавших препарат в дозе 22,0 мг/кг, также было показано снижение значения оцениваемого параметра, но оно не носило достоверного характера. Достоверного отличия в значениях между экспериментальными группами отмечено не было, что позволяет определить выраженность активности для двух доз, как сопоставимую.

В ходе исследования показано, что препарат в дозах 5,0 мг/кг и 22,0 мг/кг оказывает сопоставимое по своей выраженности противовоспалительное действие и в сходной степени снижает уровень демиелинизации нервной ткани экспериментальных приматов. На основании этих данных доза 5,0 мг/кг может быть определена, как фармакологически активная доза (ФАД).

Пример 20. Исследование токсичности и основных фармакокинетических параметров (токсикокинетики) препарата BCD132-L-077 при однократном внутривенном введении яванским макакам (*Macaca fascicularis*).

Исследование проведено на самцах яванских макак (*Macaca fascicularis*). Животные после прохождения ими карантина были поделены на четыре экспериментальные группы, по три самца в каждой группе, в соответствии с дозами вводимого препарата; в качестве критерия распределения обезьян по группам использовали массу тела. В эксперименте были использованы три дозы препарата: 44 мг/кг; 88 мг/кг; 176 мг/кг, животные контрольной группы получали препарат плацебо. Критериями оценки являлось состояние животных, число павших животных и сроки их гибели. Наблюдение за животными проводили на протяжении 8 часов после инъекции, а затем ежедневно в течение 42 суток.

Данные по экспериментальным группам животных и дозам исследуемого препарата представлены в таблице 5:

Таблица 5. Распределение животных по группам в эксперименте по определению эффективности препарата BCD132-L-077

Номер группы	Кол-во животных	Препарат	Способ введения	Доза
1	3 (♂)	BCD132-L-077	в/в	44 мг/кг
2	3 (♂)			88 мг/кг
3	3 (♂)			176 мг/кг
4	3 (♂)	Плацебо		–

Критериями оценки являлось состояние животных, число павших животных и сроки их гибели.

В рамках исследования клинический осмотр проводили на протяжении 8 часов после инъекции, а затем ежедневно, кроме того оценивали:

• вес животных;

- температуру тела;
- общий анализ мочи;
- общий анализ крови по показателям: количество эритроцитов, количество лейкоцитов, концентрация гемоглобина;
- биохимический анализ сыворотки крови по показателям: лактатдегидрогеназа, билирубин общий, общий белок, глюкоза, аспартатаминотрансфераза, аланин-аминотрансфераза;
- концентрацию препарата в сыворотке крови.

Результаты исследований показали, что исследуемый препарат при однократном внутривенном введении не вызывает гибели *M. fascicularis*, процесс введения хорошо переносится экспериментальными животными. Не было показано влияния препарата на интегральные показатели токсичности, а также на функциональное состояние органов по оцениваемым параметрам. В выбранном диапазоне доз препарат обладает линейной фармакокинетикой.

Пример 21. Исследование фармакокинетики и иммуногенности при многократном внутривенном введении препарата BCD132-L-077 яванским макакам (*Macaca fascicularis*) в течение четырех недель с последующим двухнедельным периодом, свободным от введения.

Фармакокинетические параметры и иммуногенность препарата при многократном внутривенном введении исследовали в дозах 22,0; 44,0 и 88,0 мг/кг. Общее количество животных составило 18 половозрелых обезьян (*Macaca fascicularis*), в возрасте 4-7 лет, 9 самок и 9 самцов. Животные были поделены на 3 группы, согласно дозе вводимого препарата.

Таблица 6. Распределение экспериментальных животных по группам. Оценку уровня BCD132-L-077 в сыворотке крови приматов проводили

Номер группы	Кол-во животных	Препарат	Способ введения	Доза
1	3 (♂)	BCD132-L-077	в/в	22 мг/кг
	3 (♀)			
2	3 (♂)			44 мг/кг
	3 (♀)			
3	3 (♂)			88 мг/кг
	3 (♀)			

с использованием твердофазного иммуноферментного анализа. В ходе проведения исследования, с целью установления возможного влияния образования связывающих препарат антител на фармакокинетические показатели, оценивали иммуногенность препарата BCD132-L-077. Также рассчитывали значение коэффициента кумуляции, как отношение $AUC_{ss168(336-504)}$ к AUC_{0-168} .

Для расчета значения AUC_{0-168} проводили забор сыворотки непосредственно до первого введения препарата, а затем через 0,25, 24, 72 и 168 часов после введения; для расчета значения $AUC_{ss168(336-504)}$ проводили забор сыворотки непосредственно перед четвертым введением препарата, а затем через 0,25, 24, 72 и 168 часов после него. При расчете фармакокинетических параметров использовались данные только от тех животных, у которых не были обнаружены САТ. То есть данные от животных, у которых была зафиксирована иммунная

реакция на препарат, исключались из расчета фармакокинетических параметров. Оценку кумуляции препарата проводили по индексу кумуляции для чего определяли значения AUC_{0-168} и $AUC_{ss168(336-504)}$ и рассчитывали значение по формуле:

$$R = \frac{AUC_{ss168(336-504)}}{AUC_{0-168}},$$

где $AUC_{ss168(336-504)}$ – равновесное значение площади под кривой концентрации препарата за период, соответствующий интервалу дозирования (168 ч) при многократном введении;

AUC_{0-168} – площадь под кривой концентрации препарата от момента его попадания в организм до 168 ч при первом введении.

Для анализа уровня антител, связывающих препарат BCD132-L-077, использовали сыворотку крови приматов. Для проведения исследования пробы забирали до первого введения, а затем на 4 и 7 неделях эксперимента.

Пример 22. Сравнение фармакокинетических параметров при многократном внутривенном введении возрастающих доз (22,0 мг/кг, 44,0 мг/кг, 88,0 мг/кг) препарата BCD132-L-077.

На Фиг. 36 представлены усредненные кривые изменений концентрации препарата BCD132-L-077 во времени в сыворотке крови приматов. В Таблице 7 приведены средние групповые значения основных фармакокинетических параметров.

Таблица 7. Сравнительные данные основных фармакокинетических параметров при введении возрастающих доз препарата BCD132-L-077 (Для расчета стационарных (ss) значений использовали период 336-504 час, соответствующий интервалу дозирования (168 час)).

ФК параметр	Ед. измер.	Доза (мг/кг)					
		22 мкг/мл		44 мкг/мл		88 мкг/мл	
		Хср	σ	Хср	σ	Хср	σ
$AUC_{ss(0-168)}$	мкг/мл×ч	13435.59	11150.8	13301.04	8719.1	34145.90	16765.5
$AUC_{ss(336-504)}$	мкг/мл×ч	26227.47	16819.4	22366.93	10370.6	97088.33	94675.6
$C_{ss(min)}$	мкг/мл	82.64	75.2	84.58	63.9	162.88	74.7
$C_{ss(max)}$	мкг/мл	326.89	241.7	427.03	266.5	1212.72	830.9
C_{ss}	мкг/мл	156.12	100.1	133.14	61.7	577.91	563.5
$T_{1/2}$	ч	94.76	50.3	155.38	111.2	471.00	782.5
Cl	л/ч	0.00924	0.004	0.01873	0.015	0.01228	0.005
CL_{ss}	мл/ч	4.550	2.37	10.323	6.33	7.352	5.70
V_{ss}	мл	521.65	186.9	1639.68	1170.5	2384.08	2213.3
MRT_{last}	ч	66.37	13.6	68.30	17.5	71.51	9.2

Фармакокинетические параметры препарата BCD132-L-077 были рассчитаны с использованием стационарных значения AUC, в периоде дозирования 336-504 часов (168 часов) после введения препарата. Исходный AUC рассчитанный в первом интервале дозирования (1-168 часов) находился в прямой зависимости от используемой дозы. В группе минимальной дозы данный параметр составил $13435,59 \pm 11150,80$ (мкг/мл)час, в группе средней дозы $13301,04 \pm 8719,10$ (мкг/мл)час, и $34145,90 \pm 16765,50$ (мкг/мл)час в группе максимальной дозы. AUC рассчитанный в стационарном состоянии (336-504 часов) так же зависел от применяемой дозы. В группе животных, получавших препарат в дозе 22 мг/кг, $AUC_{ss168(336-504)}$ составил $26227,47 \pm 16819,40$ (мкг/мл)час, в группе средней дозы (44 мг/кг) показатель составил $22366,93 \pm 10370,60$ (мкг/мл)час, и $97088,33 \pm 94675,60$ (мкг/мл)час в группе максимальной дозы. Значение периода полувыведения ($T_{1/2}$) в группе животных, получавших препарат в дозе 22 мг/кг составило $94,76 \pm 50,30$ часов, в группе средней дозы $155,38 \pm 111,20$ часов, и $471,00 \pm 782,50$ часов в группе максимальной дозы. Клиренс в группе минимальной дозы составил $0,00924 \pm 0,004$ л/ч, в группе средней дозы $0,01873 \pm 0,015$ л/ч, и $0,01228 \pm 0,005$ л/ч в группе максимальной дозы. Среднее время удержания препарата в организме (MRT) в группе минимальной дозы составило $66,37 \pm 13,60$ ч, в группе средней дозы $68,30 \pm 17,50$ ч, и $71,51 \pm 9,20$ ч. Объем распределения, рассчитанный в стационарном состоянии (V_{dss}) составил $521,65 \pm 186,90$ мл/кг, $1639,68 \pm 1170,50$ мл/кг, $2384,08 \pm 2213,30$ мл/кг в группах минимальной, средней и максимальной доз соответственно. Средняя концентрация, рассчитанная в стационарном состоянии (C_{ss}) составила $156,12 \pm 100,10$ мкг/мл, $133,14 \pm 61,70$ мкг/мл, $577,91 \pm 563,50$ мкг/мл в группах минимальной, средней и максимальной доз соответственно. Максимальная концентрация, рассчитанная в стационарном состоянии (C_{ssmax}) составила $326,89 \pm 241,70$ мкг/мл, $427,03 \pm 266,50$ мкг/мл, $1212,72 \pm 830,90$ мкг/мл. Минимальная концентрация, рассчитанная в стационарном состоянии (C_{ssmin}) составила $82,64 \pm 75,20$ мкг/мл, $84,58 \pm 63,90$ мкг/мл, $162,88 \pm 74,70$ мкг/мл. Полученные данные свидетельствуют о том, что концентрация препарата в сыворотке крови приматов находится в прямой зависимости от используемой в эксперименте дозы BCD132-L-077.

Для группы животных, получавших препарат в минимальной дозе 22,0 мг/кг значение индекса кумуляции (R) составило 1,95. Для группы животных, получавших BCD-132 в средней дозе 44,0 мг/кг, индекс кумуляции R был равен 1,68. Для группы животных, получавших препарат в максимальной дозе (88,0 мг/кг) значение индекса R составило 2,84. Полученные экспериментальные данные свидетельствуют, что значение индекса кумуляции не зависит от используемой дозы препарата.

В ходе проведения исследования, с целью установления возможного влияния образования связывающих препарат антител на фармакокинетические показатели, оценивали иммуногенность препарата BCD132-L-077. Экспериментальные данные свидетельствуют о наличии САТ у 11,11 % всех животных, участвующих в исследовании. Зависимости от пола не обнаружено, САТ зафиксированы у одно самца и одной самки. Связывающие препарат антитела были обнаружены в группах средней и максимальной доз, в обеих группах только у одного животного. Оценка фармакокинетических параметров возможна во всех группах животных, при условии исключения из обработки экспериментальных данных для животных с установленным присутствием связывающих антител.

Пример 23. Исследование токсичности и местно-раздражающего действия при многократном внутривенном введении препарата моноклональных антител BCD132-L-077 яванским макакам (*Macaca fascicularis*) в течение четырех недель с последующим двухнедельным периодом, свободным от введения.

Общее количество животных в эксперименте составило 30 голов яванских макаков (*Macaca fascicularis*), в возрасте 4-7 лет, 15 самок и 15 самцов. Каждая группа животных включала 6 обезьян. Токсичность препарата при многократном введении исследовали в дозах 22 мг/кг, 44 мг/кг и 88 мг/кг. Животные были поделены на 5 групп, согласно дозе вводимого препарата и сроку эвтаназии:

Препарат BCD132-L-077 в минимальной дозе – 22 мг/кг (3 самки и 3 самца);

Препарат BCD132-L-077 в средней дозе – 44 мг/кг (3 самки и 3 самца);

Препарат BCD132-L-077 в максимальной дозе – 88 мг/кг, эвтаназия после окончания введения препарата (3 самки и 3 самца);

Препарат BCD132-L-077 в максимальной дозе – 88 мг/кг, эвтаназия после окончания восстановительного периода (3 самки и 3 самца);

Контроль-плацебо (3 самки и 3 самца).

Данные по экспериментальным группам животных представлены в таблице 8:

Таблица 8. Распределение экспериментальных животных по группам.

Номер группы	Кол-во животных	Препарат	Способ введения	Доза
1	3 (♂)	BCD132-L-077	в/в	22 мг/кг
	3 (♀)			
2	3 (♂)			44 мг/кг
	3 (♀)			
3	3 (♂)			88 мг/кг
	3 (♀)			
3*	3 (♂)			88мг/кг
	3 (♀)			
4	3 (♂)	Плацебо		-
	3 (♀)			
3* – сателлитная группа, 3 – основная группа				

В рамках исследования клинический осмотр проводился ежедневно, кроме того оценивали:

- вес животных;
- температуру тела;
- общий анализ мочи;
- ЭКГ;
- показатели гемостаза: активированное частичное тромбопластиновое время, концентрация фибриногена, протромбиновое время;
- общий анализ крови по показателям: количество эритроцитов, количество лейкоцитов, концентрация гемоглобина, лимфоциты, моноциты, нейтрофилы, эозинофилы, базофилы;
- биохимический анализ сыворотки крови по показателям: лактатдегидрогеназа, билирубин общий, общий белок, глюкоза, аспартатаминотрансфераза, аланин-аминотрансфераза, холестерин, триглицериды, мочевины, креатинин, натрий, калий, щелочная фосфатаза;
- патоморфологические и гистологические исследования.

Оценку местнораздражающего действия осуществляли на основании данных осмотра, а также результатов гистологического исследования. На гистологическое исследование отбирали ткани в месте введения и дренирующие лимфатические узлы.

Согласно данным гистологических исследований, исследуемый препарат не обладает местно-раздражающим действием.

Данные, полученные в исследовании токсичности препарата терапевтических моноклональных антител BCD132-L-077 производства ЗАО «БИОКАД», свидетельствуют о том, что исследуемый препарат не оказывает токсического действия на основные органы и системы органов экспериментальных животных при многократном еженедельном внутривенном введении в течение 4 недель. Доза без наблюдаемого отрицательного эффекта (ДБНОЭ), установленная в данном исследовании, соответствует максимальной дозе исследуемого препарата BCD132-L-077 и составляет 88 мг/кг.

Пример 24. Исследование противоопухолевой активности препарата BCD132-L-028 при многократном внутрибрюшинном введении гуманизированным NK-клетками человека иммунодефицитным мышам линии hIL15-NOG на модели подкожных ксенографтов с использованием клеточной линии лимфомы человека Raji.

В исследовании планируется использовать 7 групп иммунодефицитных трансгенных мышей линии hIL15-NOG, конститутивно экспрессирующих человеческий IL-15, весом 15,0-25,0 г. Общее количество животных, участвующих в эксперименте – 84 самки. Данные по группам представлены в таблице 9:

Таблица 9. Распределение экспериментальных животных по группам.

Номер группы	Всего животных в группе	Препарат	Клеточная линия	Количество инокулированных НК-клеток	Способ введения	Доза, мг/кг
1	12 (#)	BSD132-L-028	Raji	в/в 6×10 ⁶ кл	в/б	10 мг/кг
2	12 (#)	BSD132-L-028				30 мг/кг
3	12 (#)	BSD132-L-028				90 мг/кг
4	12 (#)	Обинутузумаб				30 мг/кг
5	12 (#)	Ацеллбия				30 мг/кг
6	12 (#)	Вещество плацебо		–		–
7	12 (#)	Вещество плацебо				–

Взвешивание животных проводят до введения опухолевой линии, а далее 2 раза в неделю в течение всего эксперимента.

Измерение опухолевого узла проводят после введения опухоли 2 раза в неделю в течение всего эксперимента.

Объем опухолевого узла определяется по формуле:

$V = \pi/6 \times L \times W \times H$, где L , W , H – линейные размеры опухоли.

Критерием эффективности исследуемого препарата служат показатель торможения роста опухоли (TRO) и индекс прироста опухоли (I_i), которые вычисляют по формулам:

$$TRO (\%) = \frac{V_k - V_o}{V_k} \times 100,$$

Где V_k и V_o – средний объем опухоли (мм^3) в контрольной и опытных группах соответственно.

$$I_i = V_i/V_o,$$

где I – индекс прироста опухоли, i – сутки эксперимента, V_o – объем опухоли в день.

Пример 25. Исследование токсичности и основных фармакокинетических параметров (токсикокинетики) препарата моноклональных антител BSD132-L-028 при однократном внутривенном введении яванским макакам (*Macaca fascicularis*)

В исследовании планируется использование четырех экспериментальных групп яванских макак по три самца в каждой группе.

Обезьяны будут содержаться в индивидуальных клетках с указанием номера животного в эксперименте.

Животных распределяют по группам случайным образом в соответствии с дозами вводимого вещества, используя в качестве критерия массу тела.

Таблица 10. Распределение экспериментальных животных по группам.

Номер группы	Кол-во животных	Препарат	Способ введения	Доза, мг/кг
1	3 (♂)	BCD132-L-028	в/в	20
2	3 (♂)			40
3	3 (♂)			80
4	3 (♂)	Плацебо		–

Препараты планируется вводить внутривенно в локтевую вену в виде растворов на стерильном изотоническом растворе. Животным контрольной группы будет введен (плацебо)- изотонический раствор, используя те же объемы и способ, как и в экспериментальных группах.

В рамках исследования клинический осмотр проводят ежедневно, кроме того, оценивают следующие показатели:

1. вес животных;
2. температуру тела;
3. общий анализ мочи;
4. общий анализ крови по показателям: количество эритроцитов, количество лейкоцитов, концентрация гемоглобина;
5. биохимический анализ сыворотки крови по показателям: лактатдегидрогеназа, билирубин общий, общий белок, глюкоза, аспартатаминотрансфераза, аланин-аминотрансфераза;
6. исследование концентрации препарата в сыворотке крови, расчет основных фармакокинетических параметров и оценка линейности фармакокинетики.

Пример 26. Исследование фармакокинетики и иммуногенности при многократном внутривенном введении препарата моноклональных антител BCD132-L-028 яванским макакам (*Macaca fascicularis*) в течение 13 недель с последующим 30-дневным периодом, свободным от введения.

В исследовании фармакокинетики и иммуногенности при многократном внутривенном введении в течение 13 недель с последующим 30-дневным периодом, свободным от введения, планируется использовать 18 яванских макаков (9 самцов и 9 самок).

Животные будут распределены на 3 группы (Таблица 11) в соответствии с дозами вводимого вещества, по 3 самки и 3 самца в каждой: группа минимальной дозы (6 мг/кг), группа промежуточной дозы (20 мг/кг), группа максимальной дозы (60 мг/кг).

Таблица 11. Распределение экспериментальных животных по группам.

Номер группы	Всего животных в группе	Препарат	Способ введения	Доза, мг/кг
1	3 (♂)	BCD132-L-028	в/в	6
	3 (♀)			
2	3 (♂)			20
	3 (♀)			
3	3 (♂)			60
	3 (♀)			

В ходе проведения исследования планируется:

1. Оценить концентрацию исследуемого препарата в сыворотке крови экспериментальных животных;

2. Оценить кумуляцию исследуемого препарата при введении возрастающих доз;

3. Оценить уровень связывающих антител при многократном внутривенном введении исследуемого препарата.

Пример 27. Исследование токсичности и местно-раздражающего действия при многократном внутривенном введении препарата моноклональных антител BCD132-L-028 яванским макакам (*Macaca fascicularis*) в течение 13 недель с последующим 30-дневным периодом, свободным от введения.

В исследовании планируется использовать 5 экспериментальных групп яванских макаков по 3 самца и 3 самки в каждой: группа минимальной дозы (6 мг/кг, без некропсии), группа промежуточной дозы (20 мг/кг, без некропсии), сателлитная группа максимальной дозы (60 мг/кг, некропсия после окончания периода введения препарата), основная группа максимальной дозы (60 мг/кг, некропсия после окончания восстановительного периода) и группа контроль-плацебо (некропсия после окончания восстановительного периода).

Таблица 12. Распределение экспериментальных животных по группам (* - животные сателлитной группы)

Номер группы	Кол-во животных	Препарат	Способ введения	Доза, мг/кг
1	3 (♂)	BCD132-L-028	в/в	6
	3 (♀)			
2	3 (♂)			20
	3 (♀)			
3	3 (♂)			60
	3 (♀)			
	3 (♂)			
	3 (♀)			
4	3 (♂)	Плацебо		-
	3 (♀)			

Клинический осмотр каждого животного будут проводить ежедневно, кроме того, будут оценивать:

- вес животных;
- температуру тела (до введения далее еженедельно до окончания эксперимента);
- влияние на сердечно-сосудистую систему, с использованием кардиографа «Поли-Спектр»;
- общий анализ мочи;
- общий анализ крови по показателям: количество эритроцитов, количество лейкоцитов, концентрация гемоглобина, количество лимфоцитов, количество моноцитов, количество нейтрофилов, количество эозинофилов, количество базофилов;
- оценка влияния на свертывающую систему крови по показателям: активированное частичное тромбопластиновое время, концентрация фибриногена, протромбиновое время;
- биохимический анализ сыворотки крови по показателям: натрий, калий, креатинин, мочевины, щелочная фосфатаза, лактатдегидрогеназа, билирубин общий, общий белок, глюкоза, триглицериды, аспартатаминотрансфераза, аланинаминотрансфераза, холестерин общий.

На момент окончания периода введения препарата (14 неделя) планируется эвтаназия трех самцов и трех самок из каждой группы животных. Оставшиеся в каждой группе два самца и две самки будут подвергнуты эвтаназии по окончании восстановительного периода (18 неделя). Оценку местнораздражающего действия будут осуществлять на основании данных некропсии, а также результатов гистологического исследования. На гистологическое исследование будут отбирать участок лактевой вены, ткани в месте введения препарата и дренирующие лимфотические узлы.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфично связывается с CD20, включающее:
 - 1) вариабельный домен тяжелой цепи, который имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 6;
 - 2) вариабельный домен легкой цепи, который имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 8.
2. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, где
 - 1) вариабельный домен тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2;
 - 2) вариабельный домен легкой цепи имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4.
3. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, где
 - 1) вариабельный домен тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6;
 - 2) вариабельный домен легкой цепи имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8.
4. Моноклональное антитело по п. 1, включающее:
 - 1) тяжелую цепь, которая имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 5;
 - 2) легкую цепь, которая имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 7.
5. Моноклональное антитело по п. 4, включающее:
 - 1) тяжелую цепь, которая имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1;
 - 2) легкую цепь, которая имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3.
6. Моноклональное антитело по п. 4, включающее:
 - 1) тяжелую цепь, которая имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5;
 - 2) легкую цепь, которая имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7.
7. Моноклональное антитело по п. 1, где антитело, которое специфично связывается с CD20, представляет собой полноразмерное антитело IgG.
8. Моноклональное антитело по п. 7, где полноразмерное антитело IgG относится к изотипу IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 человека.

9. Моноклональное антитело по п. 8, где полноразмерное антитело IgG относится к изотипу IgG1 человека.
10. Нуклеиновая кислота, которая кодирует антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-9.
11. Нуклеиновая кислота по п. 10, где нуклеиновая кислота представляет собой ДНК.
12. Экспрессионный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по любому из пп. 10-11.
13. Способ получения клетки-хозяина для получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-9, включающий трансформирование клетки вектором по п. 12.
14. Клетка-хозяин для получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-9, содержащая нуклеиновую кислоту по любому из пп. 10-11.
15. Способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-9, заключающийся в культивировании клетки-хозяина по п. 14 в культуральной среде в условиях, достаточных для получения указанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, при необходимости, с последующим выделением и очисткой полученного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.
16. Фармацевтическая композиция для профилактики или лечения заболевания или нарушения, опосредуемого CD20, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-9, в сочетании с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми эксципиентами.
17. Фармацевтическая композиция для профилактики или лечения по п. 16, где заболевание или нарушение выбрано из:
а) онкологического заболевания или нарушения или
б) аутоиммунного заболевания или нарушения.
18. Фармацевтическая композиция по п. 17, где онкологическое заболевание или нарушение выбрано из группы, включающей: В-клеточную лимфому или лейкоз.
19. Фармацевтическая композиция по п. 18, где В-клеточная лимфома выбрана из: неходжкинской лимфомы (НХЛ) или болезни Ходжкина (лимфомы Ходжкина).
20. Фармацевтическая композиция по п. 18, где лейкоз выбран из: хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ) или мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы (МЛЛ).

21. Фармацевтическая композиция по п. 17, где аутоиммунное заболевание или нарушение выбрано из группы включающей: ревматоидный артрит, ювенильный ревматоидный артрит (болезнь Стилла), системную красную волчанку (СКВ), волчаночный нефрит, неспецифический язвенный колит, болезнь Вегенера, воспалительное заболевание кишечника, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру (ИТП), тромботическую тромбогемолитическую пурпуру (ТТП), аутоиммунную тромбоцитопению, рассеянный склероз, псориаз, связанную с IgA нефропатию, связанные с IgM полиневропатии, тяжелую псевдопаралитическую миастению, васкулит, ANCA васкулитов, отторжение трансплантата паренхиматозных органов, реакцию «трансплантат против хозяина» (РТПХ), сахарный диабет, синдром Рейно, синдром Шегрена и гломерулонефрит.

22. Фармацевтическая комбинация для профилактики или лечения заболевания или нарушения, опосредуемого CD20, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-9 и по меньшей мере одно другое терапевтически активное соединение.

23. Фармацевтическая комбинация по пп. 22, где другое терапевтически активное противоопухолевое соединение выбирают из химиотерапевтического средства, антитела или противогормонального средства.

24. Способ ингибирования биологической активности CD20 у субъекта, нуждающегося в таком ингибировании, включающий введение субъекту эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-9.

25. Способ лечения заболевания или нарушения, опосредованного CD20, включающий введение субъекту антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-9 или фармацевтической композиции по п. 16, нуждающемуся в таком лечении, в терапевтически эффективном количестве.

26. Способ лечения заболевания или нарушения по п. 25, где заболевание или нарушение выбрано из:

- а) онкологического заболевания или нарушения или
- б) аутоиммунного заболевания или нарушения.

27. Способ лечения заболевания или нарушения по п. 26, где онкологическое заболевание или нарушение выбрано из группы, включающей: В-клеточную лимфому или лейкоз.

28. Способ лечения заболевания или нарушения по п. 27, где В-клеточная лимфома выбрана из: неходжкинской лимфомы (НХЛ) или болезни Ходжкина (лимфомы Ходжкина).

29. Способ лечения заболевания или нарушения по п. 27, где лейкоз выбран из: хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ) или мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы (МЛЛ).

30. Способ лечения заболевания или нарушения по п. 26, где аутоиммунное заболевание или нарушение выбрано из группы включающей: ревматоидный артрит, ювенильный ревматоидный артрит (болезнь Стилла), системную красную волчанку (СКВ), волчаночный нефрит, неспецифический язвенный колит, болезнь Вегенера, воспалительное заболевание кишечника, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру (ИТП), тромботическую тромбемолитическую пурпуру (ТТП), аутоиммунную тромбоцитопению, рассеянный склероз, псориаз, связанную с IgA нефропатию, связанные с IgM полиневропатии, тяжелую псевдопаралитическую миастению, васкулит, ANCA васкулитов, отторжение трансплантата паренхиматозных органов, реакцию «трансплантат против хозяина» (РТПХ), сахарный диабет, синдром Рейно, синдром Шегрена и гломерулонефрит.

31. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-9 или фармацевтической композиции по п. 16 для лечения у субъекта, нуждающегося в таком лечении, заболевания или нарушения, опосредуемого CD20.

32. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по п. 27, где заболевание или нарушение выбрано из:

- а) онкологического заболевания или нарушения или
- б) аутоиммунного заболевания или нарушения.

33. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по п. 32, где онкологическое заболевание или нарушение выбрано из группы, включающей: В-клеточную лимфому или лейкоз.

34. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по п. 33, где В-клеточная лимфома выбрана из: неходжкинской лимфомы (НХЛ) или болезни Ходжкина (лимфомы Ходжкина).

35. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по п. 33, где лейкоз выбран из: хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ) или мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы (МЛЛ).

36. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по п. 32, где аутоиммунное заболевание или нарушение выбрано из группы включающей: ревматоидный артрит, ювенильный ревматоидный артрит (болезнь Стилла), системную

красную волчанку (СКВ), волчаночный нефрит, неспецифический язвенный колит, болезнь Вегенера, воспалительное заболевание кишечника, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру (ИТП), тромботическую тромбогемолитическую пурпуру (ТТП), аутоиммунную тромбоцитопению, рассеянный склероз, псориаз, связанную с IgA нефропатию, связанные с IgM полиневропатии, тяжелую псевдопаралитическую миастению, васкулит, ANCA васкулитов, отторжение трансплантата паренхиматозных органов, реакцию «трансплантат против хозяина» (РТПХ), сахарный диабет, синдром Рейно, синдром Шегрена и гломерулонефрит.