

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201490850 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2015.03.31

(51) Int. Cl. *A61K 39/00* (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2012.10.25

(54) СОСТАВ АНТИТЕЛА, ПРИГОДНЫЙ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ
АМИЛОИДОЗА, ЕГО ВАРИАНТЫ И СПОСОБ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ

(31) 61/551,406

(32) 2011.10.25

(33) US

(86) PCT/US2012/061950

(87) WO 2013/063284 2013.05.02

(71) Заявитель:

ОНКЛЕЙВ ТЕРАПЬЮТИКС
ЛИМИТЕД (IE)

(72) Изобретатель:

Гаридель Патрик (DE), Хендерсон
Исаак Крейг, Клейн Памела (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к составам антител и способам, пригодным для профилактики или лечения амилоидоза, включая AA-амилоидоз и AL-амилоидоз.

A1

201490850

201490850

A1

СОСТАВ АНТИТЕЛА, ПРИГОДНЫЙ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ АМИЛОИДОЗА, ЕГО ВАРИАНТЫ И СПОСОБ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ

РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Приоритет испрашивается по предварительной заявке США № 61/551,406, поданной 25 октября 2011, которая в полном объеме включена в настоящий документ путем ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Изобретение относится к области иммунологии и медицины.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Амилоидоз является общим термином, который описывает ряд заболеваний, характеризующихся присутствием патологических форм амилоидных белков, часто с участием внеклеточного отложения белковых фибрилл, образующих многочисленные «амилоидные отложения» или «амилоидные бляшки», которые могут откладываться локально или по всему организму. Эти отложения или бляшки состоят в основном из природного растворимого белка или пептида, собранного в обширных нерастворимых отложениях диаметром 10-100 мкм в различных участках ткани. Отложения состоят обычно из боковых агрегатов фибрилл, имеющих приблизительно 10-15 нм в диаметре. Амилоидные фибриллы дают характерное яблочно-зеленое двойное лучепреломление в поляризованном свете при окраске красителем Конго красным. В общем, фибриллярный состав этих отложений представляет собой идентифицирующую характеристику различных форм амилоидного заболевания.

Пептиды или белки, образующие бляшечные отложения, часто являются производными более крупного белка-предшественника. Более конкретно, патогенез амилоидных агрегатов, таких как фибриллярные отложения, обычно включает протеолитическое расщепление «аномального» белка-предшественника на фрагменты, которые агрегируют в антипараллельные β -складчатые листы.

Системные амилоидозы представляют собой комплексную группу заболеваний, вызванных отложением в тканях неправильно свернутых белков, что приводит к прогрессирующему поражению органов. Наиболее распространенный тип, AL-амилоидоз или

первичный амилоидоз, включает гематологическое заболевание, вызванное клональными плазматическими клетками, которые продуцируют неправильно свернутые легкие цепи иммуноглобулинов. Перепроизводство неправильно свернутых легких цепей плазматическими клетками приводит к отложению аномального AL-белка (амилоида) в тканях и органах лиц с AL-амилоидозом. Клинические признаки AL-амилоидоза включают совокупность симптомов и органную дисфункцию, которая может включать сердечную, почечную и печеночную дисфункцию, желудочно-кишечные нарушения, невропатии и макроглоссию. Механизмы, в результате которых амилоидогенные легкие цепи иммуноглобулинов приводят к дисфункции органов, охарактеризованы плохо, однако предполагают, что как амилоидные отложения, так и префибриллярные агрегаты могут вносить вклад в цитотоксические эффекты на органы, наблюдаемые у пациентов с AL-амилоидозом. AL-амилоидоз сам по себе представляет заболевание, но AL-амилоидоз может возникнуть одновременно у небольшой группы пациентов (до 15%) с множественной миеломой.

AL-амилоидоз является редким заболеванием с оценочной частотой встречаемости 8 на 1 миллион человек. В Соединенных Штатах ежегодно сообщается только о 1200-3200 новых случаев заболевания AL-амилоидозом. Две трети пациентов с AL-амилоидозом являются мужчинами, и менее 5% пациентов имеют возраст до 40 лет. Факторы и первопричины AL-амилоидоза остаются мало изученными.

Современное лечение больных с AL-амилоидозом направлено на ослабление или устранение заболевания костного мозга, т.е. плазматических клеток, которые отвечают за выработку легких цепей, тем самым ограничивая или прекращая продукцию амилоида. Наиболее агрессивные варианты лечения включают пересадку клеток и высокодозовую химиотерапию для тех пациентов, которые могут ее перенести. Другие схемы лечения включают комбинации препаратов, часто используемых для лечения онкогематологических больных, таких как мелфалан, преднизолон, дексаметазон и протеасомные ингибиторы, такие как бортезомиб, в попытке снизить продукцию легкой цепи. В настоящее время отсутствуют

утвержденные методы лечения AL-амилоидоза, которые непосредственно направлены на потенциально токсичные формы амилоидогенных белков.

Другая форма системного амилоидоза, AA-амилоидоз или вторичный амилоидоз, является «вторичным» результатом другого заболевания, такого как хронические воспалительные заболевания (например, ревматоидный артрит и болезнь Бехтерева) или хронические инфекции (например, туберкулез или остеомиелит). При вторичном амилоидозе, откладывающимся амилоидным белком является амилоидный A-белок, образующийся из острофазового белка сыворотки, амилоида A. Лечение вторичного амилоидоза направлено на лечение основного заболевания.

Таким образом, существует потребность в методах лечения AA-амилоидоза и AL-амилоидоза, которые непосредственно направлены на патологические амилоидные фибриллы. Настоящее изобретение обеспечивает фармацевтические составы антител 2A4 и 7D8, и их химерных и гуманизированных вариантов, которые имеют высокое сродство связывания как с AL-, так и с AA-амилоидами, благодаря общему иммуногенному эпитопу у патологических форм этих белков.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к составам антител, пригодным для профилактики и лечения амилоидных заболеваний. В одном аспекте изобретения фармацевтический состав содержит (a) химерную или гуманизированную версию антитела 2A4 (ATCC PTA-9662) или антитела 7D8 (ATCC PTA-9468) или ее фрагмент, которые специфично конкурируют с 2A4 или 7D8 за связывание с антигеном и/или мишенью которых является эпитоп, содержащий AEDS (SEQ ID NO: 18), причем антитело присутствует в концентрации в диапазоне от примерно 1 мг/мл до примерно 100 мг/мл; (b) гистидиновый буфер, присутствующий в концентрации в диапазоне от примерно 20 мМ до примерно 30 мМ; (c) трегалозу, присутствующую в концентрации в диапазоне от примерно 210 мМ до примерно 250 мМ; и (d) полисорбат 20, присутствующий в концентрации в диапазоне от примерно 0,005% до примерно 0,05% по массе; причем композиция характеризуется pH в диапазоне от

примерно 6 до примерно 7. Например, типичные составы по изобретению содержат антитело, имеющее переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4, и/или переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5. Более конкретно, такая композиция может содержать антитело, имеющее легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в любой одной из SEQ ID NO: 14-16, например, антитело, имеющее легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 15.

Дополнительные типичные составы по изобретению содержат (a) антитело, имеющее переменную область легкой цепи, содержащую три определяющие комплементарности области, приведенные в SEQ ID NO: 6, 7 и 8, и переменную область тяжелой цепи, содержащую три определяющие комплементарности области, приведенные в SEQ ID NO: 9, 10 и 11; и (b) антитело, имеющее переменную область легкой цепи, содержащую три определяющие комплементарности области, приведенные в SEQ ID NO: 12, 7 и 8, и переменную область тяжелой цепи, содержащую три определяющие комплементарности области, приведенные в SEQ ID NO: 9, 10 и 11.

В типичных составах по изобретению антитело присутствует в концентрации в диапазоне от примерно 5 мг/мл до примерно 15 мг/мл (например, примерно 10 мг/мл) или присутствует в концентрации в диапазоне примерно 25-75 мг/мл (например, 50 мг/мл).

В других типичных составах по настоящему изобретению, гистидиновый буфер присутствует в концентрации примерно 25 мМ. Гистидиновый буфер может содержать L-гистидин и L-гистидин-HCl моногидрат. Например, L-гистидин может использоваться в концентрации в диапазоне от примерно 16 мМ до примерно 22 мМ, а L-гистидин-HCl моногидрат может использоваться в концентрации в

диапазоне от примерно 4 мМ до примерно 8 мМ.

В других типичных составах по настоящему изобретению, трегалоза присутствует в концентрации примерно 230 мМ.

Полученные по настоящему описанию типичные составы по изобретению: (a) характеризуются осмоляльностью примерно 300 мОсм/кг; (b) содержат менее чем примерно 10% антитела, присутствующего в виде агрегата в составе; (c) дополнительно содержат наполнитель; (d) являются стерильными; и/или (e) стабильны при замораживании и оттаивании.

В одном аспекте изобретения состав содержит (a) антитело, содержащее легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в любой одной из SEQ ID NO: 14-16, и которое присутствует в концентрации примерно 10 мг/мл; (b) гистидиновый буфер, присутствующий в концентрации примерно 25 мМ; (c) трегалозу, присутствующую в концентрации примерно 230 мМ; (d) полисорбат 20, присутствующий в концентрации примерно 0,2 г/л; и (e) pH примерно 6,5.

В другом аспекте изобретения фармацевтический состав содержит (a) антитело, которое является антителом 2A4 (ATCC PTA-9662), антителом 7D8 (ATCC PTA-9468), или химерной или гуманизированной версией антитела 2A4 или антитела 7D8 или ее фрагментом, которые специфично конкурируют с 2A4 или 7D8 за связывание с антигеном и/или мишенью которых является эпитоп, содержащий AEDS (SEQ ID NO: 18), причем антитело присутствует в концентрации в диапазоне от примерно 50 мг/мл до примерно 100 мг/мл; (b) буфер; (c) невосстанавливающий сахар; и (d) неионное поверхностно-активное вещество. В конкретных примерах антитело раскрытых составов содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 15.

В другом аспекте настоящего изобретения составы антител являются лиофилизированными. Например, типичный лиофилизированный состав может содержать: (a) гуманизированную

версию антитела 2A4 (ATCC PTA-9662) или антитела 7D8 (ATCC PTA-9468), или ее антиген-связывающий фрагмент; (b) гистидин; (c) трегалозу; и (d) полисорбат 20. Лиофилизированные составы могут иметь pH от примерно 6 до примерно 7 при восстановлении, например, pH 6,5 при восстановлении. Лиофилизированные составы, как правило, содержат от примерно 100 мг до примерно 1000 мг антитела. Лиофилизированные составы, как правило, содержат полисорбат 20 в концентрации в диапазоне от примерно 0,005% до примерно 0,05% по массе. После восстановления лиофилизированные составы дают водный раствор, например, водный раствор, содержащий: (a) антитело, содержащее легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в любой одной из SEQ ID NO: 14-16, и которое присутствует в концентрации примерно 10 мг/мл; (b) гистидиновый буфер, присутствующий в концентрации примерно 25 мМ; (c) трегалозу, присутствующую в концентрации примерно 230 мМ; (d) полисорбат 20, присутствующий в концентрации примерно 0,2 г/л; и (e) имеющий pH примерно 6,5. Типичный лиофилизированный состав содержит примерно 100 мг антитела после восстановления стерильной водой.

Также изобретение относится к нуклеиновым кислотам, кодирующим антитела, используемые для получения описанных составов. Например, такие нуклеиновые кислоты включают нуклеиновые кислоты, содержащие нуклеотидные последовательности, кодирующие легкую цепь антитела SEQ ID NO: 13, и нуклеиновые кислоты, содержащие нуклеотидные последовательности, кодирующие тяжелую цепь антитела любой одной из SEQ ID NO: 14-16. Например, нуклеотидные последовательности, приведенные в SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 20 (которая идентична последовательности SEQ ID NO: 19 и дополнительно включает последовательность, кодирующую сигнальный пептид), каждая, кодируют легкую цепь SEQ ID NO: 13 гуманизированного 2A4. В качестве другого примера, нуклеотидные последовательности, приведенные в SEQ ID NO: 22 и SEQ ID NO: 23 (которая идентична SEQ ID NO: 22 и дополнительно включает

последовательность, кодирующую сигнальный пептид), каждая, кодируют тяжелую цепь SEQ ID NO: 15 гуманизированного 2A4.

Для получения антител, раскрытые нуклеиновые кислоты могут быть включены в вектор, по отдельности или в комбинации (например, нуклеиновой кислоты, кодирующей легкую цепь гуманизированного 2A4, и нуклеиновой кислоты, кодирующей тяжелую цепь гуманизированного 2A4). Например, вектор может содержать нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую любую из SEQ ID NO: 13-16, 21 и 24; нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность любой одной из SEQ ID NO: 19-20 и 22-23, или их комбинации. Типичные векторы по изобретению, включают (a) вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей легкую цепь гуманизированного 2A4, приведенную в SEQ ID NO: 13 или 21, и тяжелую цепь гуманизированного 2A4, приведенную в SEQ ID NO: 15 или 24; (b) вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, имеющую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 19, и нуклеиновую кислоту, имеющую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 22; и (c) вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, имеющую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 20, и нуклеиновую кислоту, имеющую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 23.

Также изобретение относится к клеткам-хозяевам (например, клеткам CHO), имеющим стабильно встроенные в свой геном одну или несколько нуклеиновых кислот, раскрытых в настоящем документе. Например, клетка-хозяин может содержать в своем геноме стабильно встроенную нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую любую из SEQ ID NO: 13-16, 21 и 24; стабильно встроенную нуклеиновую кислоту, содержащую любую одну нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 19-20 и 22-23, или их комбинации. Типичные клетки-хозяева по изобретению включают: (a) клетки-хозяева, содержащие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую легкую цепь гуманизированного 2A4, приведенную в SEQ ID NO: 13 или 21, и тяжелую цепь гуманизированного 2A, приведенную в SEQ ID NO: 15 или 24; (b) клетки-хозяева, содержащие нуклеиновую кислоту,

имеющую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 19, и нуклеиновую кислоту, имеющую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 22; и (с) клетки-хозяева, содержащие нуклеиновую кислоту, имеющую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 20, и нуклеиновую кислоту, имеющую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 23.

Настоящее изобретение также относится к способам получения фармацевтических составов. В одном аспекте настоящего изобретения такой способ включает: (а) культивирование клеток млекопитающих, имеющих стабильно встроенные в геном нуклеиновые кислоты, кодирующие легкие и тяжелые цепи мышинового, химерного или гуманизированного антитела 2A4 или мышинового, химерного или гуманизированного антитела 7D8, таким образом, что клетки секретируют антитела в клеточную культуральную среду, и очистку антител из клеточной культуральной среды; (b) и получение состава, содержащего (i) химерную или гуманизированную версию антитела 2A4 (ATCC PTA-9662) или антитела 7D8 (ATCC PTA-9468) или ее фрагмент, которые специфично конкурируют с 2A4 или 7D8 за связывание с антигеном, причем антитело присутствует в концентрации в диапазоне от примерно 1 мг/мл до примерно 100 мг/мл; (ii) гистидиновый буфер, присутствующий в концентрации в диапазоне от примерно 20 мМ до примерно 30 мМ; (iii) трегалозу, присутствующую в концентрации в диапазоне от примерно 210 мМ до примерно 250 мМ; и (iv) полисорбат 20, присутствующий в концентрации в диапазоне от примерно 0,005% до примерно 0,05% по массе; причем композиция характеризуется рН в диапазоне от примерно 6 до примерно 7. Например, в одном аспекте настоящего изобретения культивируют клетки млекопитающих, имеющие стабильно встроенные в свой геном нуклеиновые кислоты, кодирующие легкую и тяжелую цепи гуманизированного антитела 2A4. Клетки млекопитающих, пригодные для этой цели, включают (а) клетки-хозяева, имеющие стабильно встроенную в свой геном последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую легкую цепь гуманизированного 2A4, приведенную в SEQ ID NO: 13 или 21, и тяжелую цепь гуманизированного 2A4, приведенную в SEQ ID NO: 15 или 24; (b) клетки-хозяева, имеющие стабильно встроенную в свой

геном нуклеиновую кислоту, имеющую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 19, и нуклеиновую кислоту, имеющую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 22; и (с) клетки-хозяева, имеющие стабильно встроенную в свой геном нуклеиновую кислоту, имеющую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 20, и нуклеиновую кислоту, имеющую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 23. В некоторых аспектах изобретения раскрытые способы получения фармацевтического состава включают дополнительную стадию оценки по меньшей мере одного свойства антитела в составе, например, физической стабильности, химической стабильности и/или биологической активности.

Кроме того, изобретение относится к способам терапевтического или профилактического лечения человека, имеющего амилоидоз или имеющего риск амилоидоза, характеризующегося наличием фибрилл амилоидного белка, который включает введение пациенту эффективной дозы состава по настоящему изобретению. Пациенты, поддающиеся лечению, имеют амилоидные заболевания, такие как АА-амилоидоз, который характеризуется наличием фибрилл амилоидного белка, или AL-амилоидоз, который характеризуется наличием амилоидных фибрилл легкой цепи. Пациенты, имеющие AL-амилоидоз, могут также страдать от ассоциированной дискразии В-лимфоцитов, например, злокачественного заболевания, такого как множественная миелома.

Раскрытые терапевтические и профилактические способы лечения включают комбинированную терапию (т.е. введение раскрытых составов антител с одним или несколькими дополнительными лекарственными веществами), чтобы получить синергетические результаты. Два или несколько лекарственных веществ вводят одновременно или последовательно в любом порядке, т.е. состав по изобретению вводят перед введением второго лекарственного вещества, одновременно со вторым лекарственным веществом или после введения второго лекарственного вещества. Например, состав по изобретению можно вводить одновременно или последовательно в комбинации с мелфаланом. В качестве другого примера, состав по изобретению

можно вводить одновременно или последовательно в комбинации с одним или несколькими из бортезомиба, мелфалана, леналидомида и карфилзомиба.

В соответствии с раскрытыми терапевтическими и профилактическими способами лечения, составы по изобретению можно вводить многократно, например, с частотой введения в диапазоне от примерно ежедневной до примерно ежегодной, например, с частотой в диапазоне от примерно каждую вторую неделю до примерно раз в три месяца, или например, раз в месяц. В одном аспекте состав антитела по изобретению вводят внутривенно в дозировке в диапазоне от примерно 10 мг до примерно 5000 мг лекарственного вещества. Например, состав можно вводить в дозировке в диапазоне от примерно 30 мг до примерно 2500 мг лекарственного вещества гуманизированного 2A4 с частотой в диапазоне от примерно каждые две недели до примерно каждые два месяца. Типичные дозировки, используемые в описанных способах, включают 30 мг, 100 мг, 300 мг, 1000 мг, 2000 мг и 2500 мг лекарственного вещества гуманизированного 2A4.

В одном аспекте изобретения предложен способ терапевтического или профилактического лечения человека, имеющего или имеющего риск амилоидоза легких цепей (AL-амилоидоза), характеризующегося наличием амилоидных фибрилл, отложений или префибриллярных агрегатов, включающий введение пациенту эффективной дозы фармацевтического состава, содержащего: (a) антитело, содержащее легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в любой одной из SEQ ID NO: 14-16, и которое присутствует в концентрации примерно 10 мг/мл; (b) гистидиновый буфер, присутствующий в концентрации примерно 25 мМ; (c) трегалозу, присутствующую в концентрации примерно 230 мМ; (d) полисорбат 20, присутствующий в концентрации примерно 0,2 г/л; и (e) pH около 6,5. В таком способе дозировка, как правило, составляет от примерно 0,5 мг/кг до примерно 30 мг/кг (например, от примерно 0,5 мг/кг до примерно 8 мг/кг или от

примерно 8 мг/кг до примерно 30 мг/кг) антитела, вводимого внутривенно или подкожно с частотой от примерно еженедельной до примерно ежеквартальной (например, один раз в 28 дней).

Настоящее изобретение также относится к фармацевтическому продукту, содержащему: (a) флакон, содержащий около 100 мг антитела в виде порошка; (b) инструкции по восстановлению антитела; и (c) инструкции по получению восстановленного антитела для инфузии, причем (i) антитело содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в любой одной из SEQ ID NO: 14-16; и (ii) инструкции по восстановлению требуют восстановления с использованием воды для инъекций до экстрагируемого объема 10 мл.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На фиг.1A-1B показаны последовательности легких и тяжелых цепей различных гуманизированных антител 2A4. Консенсусная последовательность для N-гликозилирования выделена полужирным и подчеркнута.

На фиг.2 показаны последовательности вариабельной области легкой цепи (VL) и вариабельной области тяжелой цепи (VH) мышиных 2A4 и 7D8. Лидерная последовательность подчеркнута двойной чертой; последовательности определяющих комплементарность областей (CDR) подчеркнуты.

На фиг.3 показаны последовательности вариабельной области легкой цепи (VL) и вариабельной области тяжелой цепи (VH) версии 3 гуманизированного антитела 2A4. Строчными буквами показаны обратные мутации.

На фиг.4A-4B показаны нуклеотидные последовательности, кодирующие последовательности тяжелой цепи (фиг.4a) и легкой цепи (фиг.4b) версии 3 гуманизированного антитела 2A4. Лидерная последовательность подчеркнута одной чертой, вариабельная область не подчеркнута, константная область подчеркнута двойной чертой.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к составам антител,

используемым для профилактики и лечения амилоидных заболеваний. В одном аспекте изобретения фармацевтический состав содержит (а) химерную или гуманизированную версию антитела 2A4 (ATCC PTA-9662) или антитела 7D8 (ATCC PTA-9468) или ее фрагмент, которые специфично конкурируют с 2A4 или 7D8 за связывание с антигеном и/или мишенью которых является эпитоп, содержащий AEDS (SEQ ID NO: 18), причем антитело присутствует в концентрации в диапазоне от примерно 1 мг/мл до примерно 100 мг/мл; (b) гистидиновый буфер, присутствующий в концентрации в диапазоне от примерно 20 мМ до примерно 30 мМ; (c) трегалозу, присутствующую в концентрации в диапазоне от примерно 210 мМ до примерно 250 мМ; и (d) полисорбат 20, присутствующий в концентрации в диапазоне от примерно 0,005% до примерно 0,05% по массе; причем композиция характеризуется рН в диапазоне от примерно 6 до примерно 7.

В одном аспекте изобретения, описанном в настоящем документе, гуманизированным 2A4 является IgG1, каппа изотип мышинового 2A4. При характеристике специфичности гуманизированного 2A4 было обнаружено, что антитело также реагирует с высоким сродством и конформационно зависимым образом с легкой цепью в амилоидных фибриллах из легких цепей, но не со свободной легкой цепью в кровотоке.

Настоящее изобретение относится к способам внутривенной инфузии гуманизированных антител 2A4 и/или 7D8 для направленного связывания с неправильно свернутым амилоидным белком у пациентов с AA- и AL-амилоидозом. Некоторые гуманизированные антитела 2A4 специфично связываются с патологическими амилоидными формами AL и SAA, но не связываются с исходными молекулами, из которых образуются эти патологические формы (SAA, нативная легкая цепь иммуноглобулина [LC], интактный иммуноглобулин [Ig]).

I. Фармацевтические составы и продукты

I.A. Характеристики

Настоящее изобретение относится к фармацевтическим составам, содержащим химерную или гуманизированную версию антитела 2A4 (ATCC PTA-9662) или антитела 7D8 (ATCC PTA-9468)

или ее фрагмент, которые специфично конкурируют, соответственно, с 2A4 или 7D8 за связывание с антигеном (то есть, белком AA или AL человека) и/или мишенью которых является эпитоп AEDS (SEQ ID NO: 18). Также изобретение относится к фармацевтическим составам, содержащим мышиное антитело 2A4 или мышиное антитело 7D8, или их фрагменты. Антитело присутствует в концентрации в диапазоне от примерно 1 мг/мл до примерно 100 мг/мл. Состав характеризуется pH в диапазоне от примерно 6 до примерно 7 и содержит гистидиновый буфер в концентрации в диапазоне от примерно 20 мМ до примерно 30 мМ, трегалозу в концентрации в диапазоне от примерно 210 мМ до примерно 250 мМ; и полисорбат 20 в концентрации в диапазоне от примерно 0,005% до примерно 0,05% по массе.

Термин «гуманизированный иммуноглобулин» или «гуманизированное антитело» относится к иммуноглобулину или антителу, которые включают по меньшей мере одну гуманизованную цепь иммуноглобулина или антитела (т.е. по меньшей мере одну гуманизованную легкую или тяжелую цепь). Термин «гуманизованная цепь иммуноглобулина» или «гуманизованная цепь антитела» (то есть, «гуманизованная легкая цепь иммуноглобулина» или «гуманизованная тяжелая цепь иммуноглобулина») относится к цепи иммуноглобулина или антитела (т.е. легкой или тяжелой цепи, соответственно), имеющей переменную область, которая включает переменную каркасную область по существу из иммуноглобулина или антитела человека, а определяющие комплементарность области (CDR) (например, по меньшей мере одну CDR, предпочтительно две CDR, более предпочтительно три CDR), по существу из иммуноглобулина или антитела другого биологического вида (кроме человека), и дополнительно включает константные области (например, по меньшей мере одну константную область или ее участок в случае легкой цепи и предпочтительно три константные области в случае тяжелой цепи). Термин «гуманизованная переменная область» (например, «гуманизованная переменная область легкой цепи» или «гуманизованная переменная область тяжелой цепи») относится к переменной области, которая включает каркасную

область переменного участка по существу из иммуноглобулина или антитела человека, а определяющие комплементарность области (CDR) по существу из иммуноглобулина или антитела другого биологического вида (кроме человека).

Фраза «по существу из иммуноглобулина или антитела человека» или «по существу принадлежат человеку» означает, что при выравнивании с аминокислотной последовательностью иммуноглобулина или антитела человека (с целью сравнения) область имеет по меньшей мере 80-90%, предпочтительно 90-95%, более предпочтительно 95-99% идентичности (т.е. идентичности в отдельном участке последовательности) с последовательностью каркасной или константной области иммуноглобулина человека, позволяя, например, консервативные замены, замены консенсусной последовательности, замены зародышевой линии, обратные мутации и т.п. Введение консервативных замен, замен консенсусной последовательности, замен зародышевой линии, обратных мутаций и т.п. часто называется «оптимизацией» гуманизированного антитела или цепи. Фраза «по существу из иммуноглобулина или антитела другого биологического вида (кроме человека)» или «по существу, не принадлежит человеку» означает последовательность иммуноглобулина или антитела по меньшей мере на 80-95%, предпочтительно на 90-95%, более предпочтительно на 96%, 97%, 98% или 99% идентичную последовательности из другого биологического вида (кроме человека), например, млекопитающего, кроме человека.

Соответственно, все области или остатки гуманизированного иммуноглобулина или антитела, или гуманизированной цепи иммуноглобулина или антитела, за исключением, возможно, CDR, по существу идентичны соответствующим областям или остаткам одной или нескольких последовательностей нативного иммуноглобулина человека. Термин «соответствующая область» или «соответствующий остаток» относится к области или остатку на второй аминокислотной или нуклеотидной последовательности, которые занимают такое же (т.е. эквивалентное) положение в качестве области или остатка на первой аминокислотной или нуклеотидной последовательности, когда первая и вторая последовательности

оптимально выровнены с целью сравнения.

В некоторых составах антитело содержит переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в любой одной из SEQ ID NO: 1, 2 или 4. В некоторых составах антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3 или 5. В некоторых составах антитело содержит переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в любой одной из SEQ ID NO: 1, 2 или 4, и переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3 или 5. В некоторых составах антитело содержит переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1, и переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3. В некоторых составах антитело содержит переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4, и переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5. В некоторых составах антитело содержит переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2, и переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3.

В некоторых составах антитело содержит переменную область легкой цепи, содержащую три определяющих комплементарности области, приведенные в SEQ ID NO: 6, 7 и 8, и переменную область тяжелой цепи, содержащую три определяющих комплементарности области, приведенные в SEQ ID NO: 9, 10 и 11. В других составах антитело содержит переменную область легкой цепи, содержащую три определяющих комплементарности области, приведенные в SEQ ID NO: 12, 7 и 8, и переменную область тяжелой цепи, содержащую три определяющих комплементарности области, приведенные в SEQ ID NO: 9, 10 и 11.

В других составах по настоящему изобретению антитело

содержит переменные области легкой цепи и тяжелой цепи мышинового, химерного или гуманизированного антитела 2A4 или мышинового, химерного или гуманизированного антитела 7D8, описанных в патенте США № 7928203 и международной публикации РСТ WO 2009/086539, которые в полном объеме включены в настоящий документ путем ссылки, а последовательности переменных областей легкой цепи и тяжелой цепи, описанные в указанных патенте и публикации ясно включены в настоящий документ путем ссылки.

В некоторых составах антитело содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13 или 21, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в любой одной из SEQ ID NO: 14-16 и 24. Антитело может включать или не включать лидерные последовательности из указанных выше аминокислотных последовательностей легкой и тяжелой цепей.

В других составах антитело является фрагментом 2A4 или 7D8 антитела, включая их химерные и гуманизированные версии, например, Fab-фрагментом, Fab'-фрагментом, F(ab')₂-фрагментом, Fv-фрагментом или ScFv-фрагментом.

В некоторых аспектах изобретения антитело специфично связывается с агрегированным амилоидным белком, не связываясь специфично с мономерным амилоидным белком (например, аффинность специфического связывания с мономерными формами амилоидного белка по меньшей мере в 10 раз, и обычно по меньшей мере в 100 раз ниже).

В некоторых составах антитело присутствует в концентрации в диапазоне от примерно 5 мг/мл до примерно 100 мг/мл. В некоторых составах антитело присутствует в концентрации в диапазоне от примерно 5 мг/мл до примерно 15 мг/мл. В некоторых составах антитело присутствует в концентрации в диапазоне от примерно 25 мг/мл до примерно 75 мг/мл. Например, антитело может присутствовать в концентрации, составляющей примерно 10 мг/мл, или в концентрации, составляющей примерно 50 мг/мл. Антитело может присутствовать в стерильной жидкой лекарственной форме в количестве, составляющем от примерно 50 мг/флакон до

примерно 500 мг/флакон, или большем количестве. Например, антитело может присутствовать в стерильной жидкой лекарственной форме в количестве примерно 100 мг/флакон.

Антитела, используемые в раскрытых составах, могут быть соединены с терапевтической молекулой, например, цитотоксическим агентом, радиотерапевтическим агентом, иммуномодулятором, вторым антителом (например, с образованием гетероконъюгатного антитела) или любым другим биологически активным агентом, который способствует или усиливает активность химерного или гуманизированного антитела 2A4 или 7D8. Типичные терапевтические молекулы включают терапевтические средства, пригодные для лечения, контроля или облегчения амилоидного заболевания или симптомов амилоидного заболевания.

Антитела, используемые в раскрытых составах, также могут быть соединены с детектируемой меткой, например, пригодной для диагностики амилоидного заболевания для мониторинга развития амилоидного заболевания, и/или для оценки эффективности лечения. Антитела, введенные в фармацевтические составы, описанные в документе, особенно подходят для выполнения таких действий у субъектов, имеющих или подверженных АА-амилоидозу или AL-амилоидозу, или на соответствующих биологических образцах, полученных от таких субъектов. Типичные детектируемые метки, которые могут быть соединены или связаны с гуманизированным антителом 2A4 или гуманизированным антителом 7D8 включают различные ферменты, такие как пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза, бета-галактозидаза или ацетилхолинэстераза, простетические группы, такие как стрептавидин/биотин и авидин/биотин; флуоресцентные вещества, такие как, умбеллиферон, флуоресцеин, флуоресцеина изотиоцианат, родамин, дихлортриазиниламинфлуоресцеин, дансилхлорид или фикоэритрин, люминесцентные вещества, такие как люминол; биолюминесцентные вещества, такие как люцифераза, люциферин и экворин; радиоактивные вещества, такие как, но не ограничиваясь ими, иод (^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , ^{121}I), углерод (^{14}C), сера (^5S), тритий (^3H), индий (^{115}In , ^{113}In , ^{112}In , ^{111}In), технеций (^{99}Tc), таллий (^{201}Tl), галлий (^{68}Ga , ^{67}Ga), палладий (^{103}Pd), молибден (^{99}Mo), ксенон

(^{133}Xe), фтор (^{18}F), ^{153}Sm , ^{177}Lu , ^{159}Gd , ^{149}Pm , ^{140}La , ^{175}Yb , ^{166}Ho , ^{90}Y , ^{47}Sc , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{142}Pr , ^{105}Rh , ^{97}Ru , ^{68}Ge , ^{57}Co , ^{65}Zn , ^{85}Sr , ^{32}P , ^{153}Gd , ^{169}Yb , ^{51}Cr , ^{54}Mn , ^{75}Se и олово (^{113}Sn , ^{117}Sn), позитронно-излучающие металлы с использованием различных методов позитронно-эмиссионной томографии, ионы нерадиоактивных парамагнитных металлов, и молекулы, которые являются радиоактивно мечеными или конъюгированы с определенными радиоизотопами.

Терапевтические молекулы и/или детектируемые вещества могут быть соединены или конъюгированы с мышиным, химерным или гуманизированным антителом 2A4 или мышиным, химерным или гуманизированным антителом 7D8 напрямую или непрямым образом через промежуточную молекулу (например, линкер) с использованием методов, известных в данной области. См., например, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", в Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", в Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", в Monoclonal Antibodies 84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", в Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), и Thorpe et al., *Immunol. Rev.*, 1982, 62: 119-58.

Антитела, используемые в раскрытых составах, также включают модифицированные формы мышиных, химерных или гуманизированных антител 2A4, или мышиных, химерных или гуманизированных антител 7D8, которые имеют увеличенное время полужизни *in vivo* относительно соответствующих немодифицированных антител. Такие модифицированные формы могут быть получены, например, путем гликозилирования, ацетилирования, пэгилирования, фосфорилирования, амидирования,

получения производных с известными защитными/блокирующими группами, протеолитического расщепления, соединения с клеточным лигандом или другим белком, и т.д. В качестве одного примера, типичные способы увеличения времени полужизни антител описаны в международной публикации РСТ № WO 02/060919.

Настоящее изобретение охватывает составы антител, стабильные при 38°C–42°C, что было определено с помощью высокоэффективной эксклюзионной хроматографии (HPSEC) в течение по меньшей мере около 30 дней, причем составы стабильны при 20°C–24°C в течение по меньшей мере около 1 года, а при 2°C–4°C составы стабильны в течение по меньшей мере около 3 лет. Более конкретно, раскрытые составы имеют низкий или недетектируемый уровень агрегации и/или фрагментации антител, или низкое или недетектируемое повышение фрагментации и/или агрегации антител выше исходного уровня (например, агрегацию меньше примерно 10%). Состав, имеющий низкий или недетектируемый уровень фрагментации, содержит по меньшей мере примерно 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% от общего белка, например, в одном пике, определяемом высокоэффективной эксклюзионной хроматографией (HPSEC), или в двух пиках (соответствующих каждой из тяжелой и легкой цепей антитела), определяемых капиллярным геле-электрофорезом (rCGE) в восстанавливающих условиях, представляющих собой денатурированное антитело, и не содержит других одиночных пиков, составляющих каждый более 5%, более 4%, более 3%, более 2%, более 1% или более 0,5% от общего белка. Состав, имеющий низкий или недетектируемый уровень агрегации, содержит не более чем примерно 15%, не более чем примерно 10%, не более чем примерно 5%, не более чем примерно 4%, не более чем примерно 3%, не более чем примерно 2%, не более чем примерно 1% или не более чем примерно 0,5% агрегатов по массе белка, измеренных с помощью высокоэффективной эксклюзионной хроматографии (HPSEC). Например в некоторых составах, менее чем примерно 10% анти-амилоидных антител присутствует в виде агрегатов. Стабильные композиции по изобретению также не теряют или слабо теряют биологическую активность химерного или

гуманизированного 2A4 или химерного или гуманизированного 7D8, например, аффинность связывания, измеряемую с помощью ELISA и/или дополнительных функциональных анализов, например, сохраняют по меньшей мере примерно 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% от начальной измеренной величины данной активности.

Гистидиновый буфер может присутствовать в некоторых составах в концентрации примерно 25 мМ. В некоторых составах, гистидиновый буфер содержит L-гистидин и L-гистидин-HCl моногидрат. Например, в некоторых составах L-гистидин присутствует в концентрации в диапазоне от примерно 16 мМ до примерно 22 мМ, а L-гистидин-HCl моногидрат присутствует в концентрации в диапазоне от примерно 4 мМ до примерно 8 мМ.

В некоторых составах трегалоза присутствует в концентрации от примерно 210 мМ до примерно 250 мМ, например, примерно 230 мМ. В некоторых составах используется другой невосстанавливающий сахар, например, сахароза, маннит или сорбит.

В некоторых составах полисорбат 20 присутствует в концентрации в диапазоне от примерно 0,005% до примерно 0,05% по массе, например, 0,005%, 0,01%, 0,015%, 0,02%, 0,025%, 0,03%, 0,035%, 0,04%, 0,045% или 0,05%. Альтернативно, в некоторых составах полисорбат 20 присутствует в концентрации в диапазоне от примерно около 0,05 г/л, 0,1 г/л, 0,15 г/л, 0,2 г/л, 0,25 г/л, 0,3 г/л, 0,35 г/л, 0,4 г/л, 0,45 г/л или 0,5 г/л. Некоторые составы включают полисорбат 20 в концентрации 0,2 г/л.

Некоторые составы характеризуются pH в диапазоне примерно 6–7, например, pH составляет 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 или 7,0. Некоторые составы имеют pH примерно 6,5.

Некоторые составы характеризуются осмоляльностью примерно 300 мОсм/кг.

Также в некоторые составы может быть включен наполнитель.

Как правило, составы являются стерильными, что, например, достигается путем стерильной фильтрации с использованием фильтра с размером пор 0,2 мкм или 0,22 мкм. Составы по

изобретению также в общем стабильны при замораживании и оттаивании.

Необязательно, составы по изобретению могут дополнительно содержать другие вспомогательные вещества, такие как сахараиды, многоатомные спирты и аминокислоты (например, аргинин, лизин и метионин). В других аспектах настоящее изобретение также относится к составам, по существу свободным от поверхностно-активного вещества, неорганических солей, дополнительных сахаров и/или других вспомогательных веществ, т.е. составы содержат примерно менее 0,0005%, менее 0,0003% или менее 0,0001% таких соединений.

Пример состава включает антитело, содержащее легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в любой одной из SEQ ID NO: 14, 15 или 16, которое присутствует в концентрации примерно 10 мг/мл, гистидиновый буфер, присутствующий в концентрации примерно 25 мМ, трегалозу, присутствующую в концентрации примерно 230 мМ; полисорбат 20, присутствующий в концентрации примерно 0,2 г/л, а pH состава составляет примерно 6,5.

I.B. Получение фармацевтических составов

Настоящее изобретение также относится к способам получения фармацевтических составов. В одном аспекте настоящего изобретения такой способ включает: (a) культивирование клетки млекопитающего, имеющей стабильно встроенные в свой геном нуклеиновые кислоты, кодирующие легкую и тяжелую цепи мышинового антитела 2A4 (ATCC PTA-9662) или антитела 7D8 (ATCC PTA-9468), или их химерные или гуманизированные версии, так что клетки секретируют антитела в клеточную культуральную среду, и очистку антител из клеточной культуральной среды; (b) и получение состава, включающего (i) очищенное антитело, присутствующее в концентрации в диапазоне от примерно 1 мг/мл до примерно 100 мг/мл; (ii) гистидиновый буфер, присутствующий в концентрации в диапазоне от примерно 20 мМ до примерно 30 мМ; (iii) трегалозу, присутствующую в концентрации в диапазоне от примерно 210 мМ до примерно 250 мМ; и (iv) полисорбат 20, присутствующий в

концентрации в диапазоне от примерно 0,005% до примерно 0,05% по массе; причем композиция характеризуется рН в диапазоне от примерно 6 до примерно 7.

В некоторых аспектах изобретения раскрытые способы получения фармацевтического состава включают дополнительную стадию оценки по меньшей мере одного свойства антитела в составе, выбранного из группы, состоящей из физической стабильности, химической стабильности и биологической активности.

Например, в одном аспекте настоящего изобретения клетки млекопитающего культивируют для получения антител, причем клетки млекопитающего имеют стабильно встроенные в свой геном нуклеиновые кислоты, кодирующие легкую и тяжелую цепи гуманизированного антитела 2A4. Клетки млекопитающего, пригодные для этой цели, включают (а) клетки-хозяева, имеющие стабильно встроенные в свой геном последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей легкую цепь гуманизированного 2A4, приведенную в SEQ ID NO: 13 или 21, и тяжелую цепь гуманизированного 2A4, приведенную в SEQ ID NO: 15 или 24; (b) клетки-хозяева, имеющие стабильно встроенную в свой геном нуклеиновую кислоту, имеющую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 19, и нуклеиновую кислоту, имеющую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 22; и (с) клетки-хозяева, имеющие стабильно встроенную в свой геном нуклеиновую кислоту, имеющую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 20, и нуклеиновую кислоту, имеющую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 23.

Для получения антител, раскрытые нуклеиновые кислоты включены в вектор. В некоторых примерах вектор содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую мышинное антитело 2A4 или 7D8, либо химерную или гуманизированную его версию, функционально связанную с соответствующей регуляторной последовательностью, способной осуществлять экспрессию ДНК в клетке-хозяине. Такие регуляторные последовательности включают промотор для осуществления транскрипции (например, конститутивный промотор или индуцируемый промотор, известные в данной области), необязательную последовательность оператора для регуляции такой

транскрипции, последовательность, кодирующую подходящие участки связывания рибосомы на мРНК, энхансеры, сигналы полиаденилирования и последовательности для регуляции терминации транскрипции и трансляции. Вектор может представлять собой плазмиду, фаговую частицу (например, вирусный вектор, такой как векторы на основе аденовируса, аденоассоциированного вируса, ретровируса, вируса герпеса, вируса осповакцины, лентивируса, вируса оспы и цитомегаловируса) или просто геномную вставку. После трансформации в подходящего хозяина кодирующие антитело нуклеиновые кислоты могут встраиваться в геном хозяина, или вектор может реплицироваться и функционировать независимо от генома хозяина.

Раскрытые нуклеиновые кислоты включены в вектор или отдельно, или в комбинации (например, комбинации нуклеиновой кислоты, кодирующей легкую цепь антитела и нуклеиновой кислоты, кодирующей тяжелую цепь антитела). Например, вектор может содержать нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую любую одну из SEQ ID NO: 13-16, 21 или 24; нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность любой одной из SEQ ID NO: 19-20 и 22-23, или их комбинации. Типичные векторы по изобретению, включают (a) вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей легкую цепь гуманизированного 2A4, приведенную в SEQ ID NO: 13, и тяжелую цепь гуманизированного 2A4, приведенную в SEQ ID NO: 15; (b) вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, имеющую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 19, и нуклеиновую кислоту, имеющую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 22; и (c) вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, имеющую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 20, и нуклеиновую кислоту, имеющую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 23.

Клетки-хозяева, пригодные для получения составов антител по изобретению, включают клетки млекопитающих, в том числе клетки человеческого происхождения, такие как клетки почки обезьяны, клетки почки эмбриона человека, клетки почки детеныша хомячка (ВНК), клетки яичника китайского хомячка (клетки CHO),

клетки Сертоли мыши, клетки цервикальной карциномы человека (HeLa), клетки почки собаки, клетки легких человека, клетки печени человека, клетки опухоли молочной железы мыши и клетки NS0. Например, клетка-хозяин может содержать в своем геноме стабильно встроенную нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую любую одну из SEQ ID NO: 13-16, 21 и 24; стабильно встроенную нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность любой одной из SEQ ID NO: 19-20 и 22-23, или их комбинации. Типичные клетки-хозяева по изобретению включают: (a) клетки-хозяева, содержащие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей легкую цепь гуманизированного 2A4, приведенную в SEQ ID NO: 13 или 21, и тяжелую цепь гуманизированного 2A4, приведенную в SEQ ID NO: 15 или 24; (b) клетки-хозяева, содержащие нуклеиновую кислоту, имеющую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 19, и нуклеиновую кислоту, имеющую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 22; и (c) клетки-хозяева, содержащие нуклеиновую кислоту, имеющую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 20, и нуклеиновую кислоту, имеющую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 23.

В другом аспекте изобретения химерное или гуманизированное антитело 2A4 или химерное или гуманизированное антитело 7D8 получают путем химического синтеза, а затем используют в раскрытых составах.

Антитела, используемые для получения раскрытых составов, как правило, являются выделенными или очищенными, т.е. по существу свободны от клеточного материала или других загрязняющих белков из клеток, в которых их получают, или по существу свободны от химических предшественников или других химических веществ при получении химическим синтезом. Например, антитело, которое по существу свободно от клеточного материала, включает препараты антител, имеющих менее чем примерно 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 8%, 5%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1% или менее (по сухой массе) загрязняющего белка. Когда антитело получено рекомбинантным способом, оно также по существу свободно от культуральной среды, так что культуральная среда составляет

менее чем примерно 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 8%, 5%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1% или менее от объема белкового препарата. Когда антитело получено путем химического синтеза, оно, предпочтительно, по существу свободно или отделено от химических предшественников или других химических веществ, участвующих в синтезе белка. Соответственно, такие препараты антител имеют менее чем примерно 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 8%, 5%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1% или меньше (по сухой массе) химических предшественников или других соединений, кроме терапевтических антител. Для очистки рекомбинантно экспрессированного антитела можно использовать любой из ряда способов, известных в данной области, таких как, например, аффинная хроматография, обработка кислотой, глубинная фильтрация, анионообменная хроматография, катионообменная хроматография, нанофильтрация, ультрафильтрация, диализ и диафильтрация.

Очищенное терапевтическое антитело может быть получено в виде раствора, содержащего любой из составов, описанных в данном документе, разведено до желаемой концентрации и может храниться до использования. Необязательно, состав может храниться в концентрированной форме до использования. Жидкие составы могут храниться в замороженном виде, при охлаждении или при комнатной температуре, в зависимости от их профиля устойчивости, который может быть определен эмпирически. В некоторых случаях применяется дополнительная стадия фильтрации. Некоторые составы, описанные в настоящем документе, могут быть лиофилизированы и могут храниться в порошковой форме. Лиофилизированные составы могут храниться в замороженном виде, при охлаждении или при комнатной температуре, в зависимости от их профиля устойчивости, который может быть определен эмпирически. Например, лиофилизированные составы можно хранить при температуре от примерно 2°C до 8°C. В таких случаях, состав будет восстановлен перед введением пациенту, давая жидкий состав, содержащий антитело и вспомогательные вещества, присутствующие в концентрациях, описанных в настоящем документе. В некоторых случаях состав восстанавливают в

стерильной воде. В некоторых случаях состав восстанавливают и добавляют в инфузионный мешок для введения пациенту. До введения пациенту восстановленный состав может храниться при охлаждении или при комнатной температуре в течение времени, соответствующего профилю стабильности. Методики лиофилизации и восстановления известны в данной области и описаны в примерах.

Таким образом, настоящее изобретение также охватывает фармацевтические продукты, содержащие лиофилизированное терапевтическое антитело и инструкции по восстановлению и применению. Например, типичный фармацевтический продукт может включать: (a) флакон, содержащий примерно 100 мг антитела в виде порошка; (b) инструкции по восстановлению антитела; и (c) инструкции по получению восстановленного антитела для инфузии, причем (i) антитело содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в любой одной из SEQ ID NO: 14-16; и (ii) инструкции по восстановлению требуют восстановления водой для инъекций до экстрагируемого объема 10 мл.

II. Способы диагностики и лечения

Также изобретение относится к способам терапевтического или профилактического лечения человека, имеющего амилоидоз или имеющего риск амилоидоза, характеризующегося наличием фибрилл амилоидного белка, причем способ включает введение пациенту эффективной дозы любого из составов, описанных в данном документе.

II.A. Субъекты, подходящие для диагностики и лечения

Лекарственное вещество гуманизированное антитело 2A4 следует использовать для лечения системного амилоидоза, например, амилоидоза с участием либо амилоидной легкой цепи (AL), либо амилоида А (AA). Системные амилоидозы представляют собой комплексную группу заболеваний, вызванных отложением в тканях неправильно свернутых белков, что приводит к прогрессирующему поражению органов. Наиболее распространенный тип, AL-амилоидоз или первичный амилоидоз, включает гематологическое заболевание, вызванное клональными

плазматическими клетками, которые продуцируют неправильно свернутые легкие цепи иммуноглобулинов. Перепроизводство неправильно свернутых легких цепей плазматическими клетками приводит к отложению аномального AL-белка (амилоида), в тканях и органах лиц с AL-амилоидозом. Клинические признаки AL-амилоидоза включают совокупность симптомов и органную дисфункцию, которая может включать сердечную, почечную и печеночную дисфункцию, желудочно-кишечные нарушения, невропатии и макроглоссию. Другая форма системного амилоидоза, AA-амилоидоз или вторичный амилоидоз, является «вторичным» результатом другого заболевания, как, например, хронических воспалительных заболеваний (например, ревматоидного артрита и болезни Бехтерева) или хронических инфекций (например, туберкулеза или остеомиелита). При вторичном амилоидозе, откладывающимся амилоидным белком является белок амилоид А, образующийся из острофазового белка – сывороточного амилоида А.

Периферический амилоидоз поддается этому типу амилоид-специфичной иммунотерапии, поскольку мишенью антител является новый эпитоп, идентифицированный в AA-амилоиде, а также в AL-амилоиде. Исследования на животных моделях как AA, так и AL-амилоидоза продемонстрировали возможность значительных положительных терапевтических эффектов при умеренных дозировках антитела.

Субъекты или пациенты, поддающиеся лечению с применением раскрытых составов антител, включают лиц с риском заболевания, но не имеющих симптомов, а также больных, которые имеют симптомы амилоидного заболевания. Таким образом, настоящие способы могут применяться профилактически у всего населения в целом, без необходимости какой-либо оценки риска заболевания данного пациента. Например, настоящие способы особенно подходят для людей, которые заведомо имеют генетическую предрасположенность к аутоиммунным заболеваниям. К таким людям относятся те, кто имеет родственников с таким заболеванием, а также те, чья предрасположенность определена путем анализа генетических или биохимических маркеров. В качестве другого примера, пациенты, страдающие от AA-амилоидоза, могут не иметь

симптомов в течение длительного периода времени, так что клиническая диагностика АА-амилоидоза часто запаздывает или упускается до тех пор, пока отложения амилоида не становятся обширными. В случае пациентов, имеющих симптомы, по оценке диагностируется только 53% случаев. См., например, L.E.K. Consulting, Independent Market Research (2003). Профилактический прием раскрытых составов антител может снизить заболеваемость АА-амилоидозом.

Настоящие способы особенно подходят для людей, которые имеют известный риск АА- или AL-амилоидоза, предположительно имеют АА- или AL-амилоидоз, или которым поставлен диагноз АА- или AL-амилоидоз. Такие лица включают, но не ограничиваются ими, тех, кто имеет хронические воспалительные заболевания, наследственные воспалительные заболевания и хронические микробные инфекции, такие как ревматоидный артрит, ювенильный хронический артрит, анкилозирующий спондилит, псориаз, псориагическая артропатия, синдром Рейтера, синдром Стилла у взрослых, синдром Бехчета, болезнь Крона, семейная средиземноморская лихорадка, проказа, туберкулез, бронхоэктаз, пролежни, хронический пиелонефрит, остеомиелит, болезнь Уиппла, миелома, макроглобулинемия, дискразия иммуноцитов, моноклональная гаммопатия, оккультная дискразия. Хронические воспалительные и инфекционные заболевания являются предпосылкой к развитию АА-амилоидоза, а AL-амилоидоз, проявляющийся местным узловым амилоидозом, может быть связан с хроническими воспалительными заболеваниями. Лица, которые имеют известный риск АА-амилоидоза, также включают, но не ограничиваются ими, тех, кто имеет злокачественные новообразования, такие как лимфома Ходжкина, рак почек, рак кишки, легких и мочеполовых путей, базальноклеточная карцинома и волосато-клеточная лейкемия. Кроме того, люди с известным риском АА-амилоидоза, также включают, но не ограничиваются ими, тех, кто имеет лимфопролиферативные заболевания, такие как болезнь Кастельмана. Некоторые из таких пациентов имеют АА-амилоидоз, характеризующийся наличием фибрилл амилоидного белка. Некоторые из таких пациентов имеют AL-амилоидоз, характеризующийся

наличием белковых фибрилл амилоидных легких цепей. Некоторые пациенты имеют системную дисфункцию органов, приписываемую AL-амилоидозу, включая нарушение функции сердца, почек, печени, периферической нервной системы, желудочно-кишечного тракта, вегетативной нервной системы, легких и/или мягких тканей или лимфатической системы.

Пациенты, поддающиеся лечению, также включают пациентов, которые получали, в настоящее время получают или позднее будут получать альтернативную терапию для лечения амилоидного заболевания или ассоциированного с ним состояния, например, воспалительных заболеваний, хронических микробных инфекций, злокачественных новообразований, наследственных воспалительных заболеваний и лимфопролиферативных нарушений. Например, пациенты могут получать или получали один или несколько терапевтических агентов, указанных в данном документе для комбинированной терапии. В качестве конкретного примера, пациенты, страдающие от AL, также могут получать или получали бортезомиб, мелфалан, леналидомид и/или карфилзомиб. Для пациентов, которые ранее получали альтернативную терапию для лечения амилоидного заболевания, такая терапия может быть успешной или безуспешной по соответствующим клиническим показателям.

II.B. Схемы лечения

В контексте настоящего изобретения термины «лечить» и «лечение» относятся: к ослаблению или облегчению одного или нескольких симптомов или проявлений, связанных с заболеванием; предупреждению, ингибированию или задержке начала одного или нескольких симптомов или проявлений заболевания; уменьшению тяжести или частоты возникновения одного или нескольких симптомов или проявлений заболевания; и/или улучшению или тенденции к желаемым результатам, описанным в данном документе.

Желаемые результаты методов лечения, раскрытых в данном документе, варьируют в зависимости от амилоидного заболевания и данных пациента и легко определяются специалистом в данной области. В общем, желаемые результаты включают поддающиеся измерению показатели, такие как уменьшение или исчезновение

патологических амилоидных фибрилл, снижение или ингибирование агрегации амилоида и/или отложения амилоидных фибрилл, и усиление иммунного ответа на патологические и/или агрегированные амилоидные фибриллы. Желаемые результаты также включают ослабление симптомов, специфичных для амилоидного заболевания. Например, желаемые результаты при лечении AL-амилоидоза включают уменьшение частоты появления и тяжести известных симптомов, включая органную дисфункцию, периферическую и автономную нейропатию, карпальный туннельный синдром, макроглоссию, рестриктивную кардиомиопатию, артропатию крупных суставов, иммунные дискразии, миеломы, а также оккультные дискразии. В качестве другого примера, желаемые результаты при лечении AA-амилоидоза включают уменьшение ассоциированного воспаления, артрита, псориаза, микробной инфекции, злокачественной опухоли, или симптомы другого присутствующего ранее или одновременно заболевания, относительно которого AA-амилоидоз является вторичным.

Ожидаемые результаты раскрытых методов лечения, как правило, являются поддающейся измерению величиной относительно контроля или базовой величины. В контексте настоящего изобретения относительные термины, такие как «улучшить», «увеличить» или «уменьшить» указывают значения относительно контрольного измерения, такого как измерение у того же человека до начала лечения, описанного в данном документе, или измерения у контрольного человека или контрольной группы. Контрольным индивидуумом является физическое лицо, страдающее таким же амилоидным заболеванием, как индивидуум, который получает лечение, который имеет примерно такой же возраст, как индивидуум, который получает лечение (для гарантии того, что стадии заболевания у индивидуума, получающего лечение, и контрольного индивидуума были сопоставимы), но которое не получало лечение с применением описанных составов антител. В этом случае эффективность раскрытых составов антител оценивают по сдвигу или тенденции в сторону удаления от измеряемых показателей у контроля, не получавшего лечение. В альтернативном варианте контрольным индивидуумом является

здоровый человек примерно того же возраста, что и человек, который получает лечение. В этом случае, эффективность раскрытых составов антитела оценивают по сдвигу или тенденции в направлении сближения с измеряемыми показателями у здорового контроля. Изменения или улучшения в ответ на терапию, как правило, являются статистически значимыми и описываются p -значением, величину которого, меньшую или равную 0,1, меньшую 0,05, меньшую 0,01, меньшую 0,005 или меньшую 0,001, можно рассматривать как достоверную.

У пациентов как с симптомами, так и без симптомов заболевания лечение в соответствии с описанными способами можно начинать в любое время до или после постановки диагноза основного AA- или AL-амилоидного заболевания. Лечение, как правило, включает введение нескольких доз в течение определенного периода времени. Лечение через определенный период времени можно контролировать, проводя анализ антитела или используя SAP-сцинтиграфию с радиоактивной меткой. При падении ответа у пациента может быть показано использование дополнительной дозы. Реакцию пациентов с AL-амилоидозом на лечение можно контролировать, проводя оценку сердечных маркеров, таких как NT-proBNP и/или тропонин, сывороточного креатина и/или щелочной фосфатазы; выполняя анализы на свободную легкую цепь (SFLC), количественные анализы на иммуноглобулины, биопсию, электрофорез белков крови (SPEP), электрофорез белков мочи (UPEP), анализ сыворотки, электрофорез мочи с иммунофиксацией (IFE); и/или методами визуализации органов. Типичный полный ответ (CR) может быть определен по критериям ответа, включающим отрицательный IFE сыворотки и мочи, нормальное соотношение цепей κ и λ , и/или по содержанию плазматических клеток в костном мозге меньше 5%. Типичный очень хороший частичный ответ (VGPR) может быть определен по dFLC менее 40 мг/л. Типичный частичный ответ (PR) может быть определен по снижению dFLC на 50% или более. В почках ответ на лечение может быть определен, например, по снижению 50% или более (например, $>0,5$ г/24 часа) в суточном выделении белка с мочой при отсутствии: либо снижения eGFR на 25% или более, либо

повышения сывороточного креатина на 0,5 мг/дл или более. В печени ответ на лечение может быть определен, например, по уменьшению на 50% или более исходно повышенной щелочной фосфатазы или по уменьшению печени в диаметре на 2 см или более на КТ или МРТ. В сердце ответ на лечение может быть определен, например, по снижению NT-proBNP на 30% или более и на 300 нг/л или более у пациентов с исходной концентрацией NT-proBNP >650 нг/л.

Состав антитела можно вводить внутривенно в диапазоне доз от примерно 10 мг до примерно 5000 мг для конкретного пациента, как, например, примерно 10 мг, примерно 30 мг, примерно 100 мг, примерно 300 мг, примерно 1000 мг, примерно 2000 мг или примерно 2500 мг. Состав антитела также можно вводить внутривенно в диапазоне доз от примерно 0,1 мг/кг до примерно 50 мг/кг или от примерно 0,5 мг/кг до примерно 30 мг/кг массы тела пациента. Например, дозировка может составлять примерно 0,5 мг/кг массы тела, примерно 1,0 мг/кг, примерно 1,5 мг/кг, примерно 2,0 мг/кг, примерно 4,0 мг/кг, примерно 5,0 мг/кг, примерно 8,0 мг/кг, примерно 10 мг/кг, примерно 15 мг/кг, примерно 16 мг/кг, примерно 20 мг/кг, примерно 25 мг/кг или примерно 30 мг/кг массы тела. Повышение дозы для отдельного пациента осуществляет лечащий врач по своему усмотрению при отсутствии каких-либо клинически значимых признаков того, что лечащий врач разумно счел бы неоправданным риском для безопасности пациента, например, степени негематологической токсичности ≥ 3 , степени тошноты ≥ 3 , рвоты или диареи, не контролируемых максимальной противорвотной/антидиарейной терапией, 4-й степени нейтропении на протяжении более 7 дней в отсутствие поддержки фактором роста, 3-й и 4-й степени нейтропении любой продолжительности, сопровождаемые температурой $\geq 38,5^{\circ}\text{C}$ и/или системной инфекцией, или степени другой гематологической токсичности ≥ 4 .

Антитела обычно вводят несколько раз. Типичная схема лечения включает однократное введение каждые две недели, раз в месяц или раз в 3-6 месяцев. Например, пациенты могут получать

состав антител циклически по одному введению каждые четыре недели, например каждые двадцать восемь дней. Частоту дозирования можно регулировать в зависимости от фармакокинетического профиля состава антитела у пациента. Например, период полувыведения антитела может служить основанием для двухнедельной частоты дозирования. В некоторых способах одновременно вводят два или несколько моноклональных антител с различной специфичностью связывания, в этом случае, доза каждого вводимого антитела находится в пределах указанных диапазонов. Интервалы между разовыми дозами могут быть недельными, месячными или годовыми. Интервалы также могут быть нерегулярными, в зависимости от измерения содержания в крови антитела к амилоидному белку (например, АА) у пациента. В некоторых способах дозу доводят до достижения концентрации антитела в плазме, составляющей примерно 1-1000 мкг/мл или примерно 25-300 мкг/мл. В альтернативном варианте, антитело можно вводить в виде состава с пролонгированным высвобождением, в этом случае требуется менее частое введение.

Дозировка и частота введения варьируют в зависимости от периода полувыведения антител у пациента. В общем, человеческие антитела имеют самый длинный период полувыведения, за ними следуют гуманизированные антитела, химерные антитела и антитела других животных. Дозировка и частота введения могут варьировать в зависимости от того, является ли лечение профилактическим или терапевтическим. При профилактическом применении, относительно низкие дозировки вводят через относительно нечастые интервалы в течение длительного периода времени. Некоторые пациенты продолжают получать лечение на протяжении всей жизни. При терапевтическом применении иногда требуется введение относительно высоких дозировок через относительно короткие интервалы до снижения или прекращения развития заболевания, до достижения частичного или полного ответа и/или до уменьшения или облегчения симптомов заболевания у пациента. После этого пациента можно перевести на профилактическую схему введения.

Составы, раскрытые в настоящем документе, могут быть представлены в лекарственной форме, пригодной для

парентерального (например, внутривенного, внутримышечного, подкожного) введения. В случае конкретных вариантов применения состав может быть альтернативно представлен в форме, подходящей для ректального, трансдермального, назального, вагинального, ингаляционного, глазного или другого введения. Фармацевтические составы, как правило, получают по стандартной фармацевтической технологии. См., например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, (19th ed.) ed. A.R. Gennaro, 1995, Mack Publishing Company, Easton, Pa. и Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, eds. J. Swarbrick and J.C. Boylan, 1988-1999, Marcel Dekker, N.Y.

В одном аспекте настоящего изобретения предложен способ терапевтического или профилактического лечения человека, имеющего амилоидоз легких цепей (AL-амилоидоз) или имеющего риск AL-амилоидоза, характеризующегося наличием амилоидных фибрилл, отложений или префибриллярных агрегатов, включающий введение пациенту эффективной дозы фармацевтического состава, содержащего: (a) антитело, содержащее легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в любой одной из SEQ ID NO: 14-16, и которое присутствует в концентрации примерно 10 мг/мл; (b) гистидиновый буфер, присутствующий в концентрации примерно 25 мМ; (c) трегалозу, присутствующую в концентрации примерно 230 мМ; (d) полисорбат 20, присутствующий в концентрации примерно 0,2 г/л; и (e) pH примерно 6,5. В таком способе дозировка, как правило, составляет от примерно 0,5 мг/кг до примерно 30 мг/кг антитела (например, от примерно 0,5 мг/кг до примерно 8 мг/кг, или от примерно 8 мг/кг до примерно 30 мг/кг), вводимого внутривенно или подкожно с частотой от примерно еженедельной до примерно ежеквартальной (например, один раз в 28 дней).

II. Комбинированные схемы лечения

Настоящее изобретение также охватывает комбинированные методы лечения или профилактики амилоидного заболевания, в частности AA- и AL-амилоидозов. В зависимости от обстоятельств, такие комбинированные методы лечения проводят путем введения

состава антитела по изобретению в сочетании с одним или несколькими вторыми терапевтическими агентами, таким как другие методы лечения или профилактики АА- или AL-амилоидозов. Комбинированную терапию по изобретению также можно проводить в сочетании со вторым методом, используемым для лечения или профилактики заболевания или состояния, связанного с амилоидным заболеванием, таким как воспалительное заболевание, хроническая микробная инфекция, новообразования (включая злокачественные новообразования), наследственное воспалительное заболевание и/или лимфопролиферативное заболевание. Множество вариантов лечения доступны в продаже, проходят клинические испытания и доклиническую разработку и любой из них может быть выбран для применения в комбинации с раскрытыми составами антител. Такие варианты лечения могут представлять собой одно или несколько из соединений или методов лечения, выбранных из нескольких основных категорий, но не ограниченных ими, а именно: (i) нестероидных противовоспалительных средств (NSAID), например, дитропрофена, диклофенака, дифлунизала, этодолака, фенотрофена, флурбипрофена, ибупрофена, индометацина, кетотрофена, меклофенамата, мефенамовой кислоты, мелоксикама, набуметона, напроксена натрия, оксатрозина, пироксикама, сулиндака, толметина, целекоксиба, рофекоксиба, аспирина, холинсалицилата, салсалата и салицилата натрия и магния); (ii) стероидов {например, кортизона, дексаметазона, гидрокортизона, метилпреднизолона, преднизолона, преднизона, триамцинолона}; (iii) DMARD, т.е. болезнь-модифицирующих противоревматических лекарственных средств (например, циклоспорина, азатиоприна, метотрексата, лефлуномида, циклофосфамида, гидроксихлорохина, сульфасалазина, D-пенициллина, миноциклина и золота); (iv) рекомбинантных белков (например, ENBREL® (этанерцепта, растворимого рецептора TNF) и REMICADE® (инфликсимаба), химерного моноклонального анти-TNF антитела); (v) трансплантации стволовых клеток; и/или (vi) химиотерапии. Пациенты с AL-амилоидозом также могут получать схемы лечения, которые включают лекарственные средства или комбинации лекарственных средств, часто используемые для лечения

онкогематологических больных, такие как мелфалан, преднизолон, дексаметазон, леналидомид (REVLIMID®) и ингибиторы протеосомы, такие как бортезомиб (VELCADE®) и карфилзомиб (KYPROLIS™), в дозировках в диапазоне, соответствующих стандартному лечению.

Продолжительность комбинированной терапии зависит от типа амилоидного заболевания, в отношении которого проводится лечение, любого основного заболевания, связанного с амилоидным заболеванием, возраста и состояния пациента, стадии и типа заболевания пациента, реакции пациента на лечение, и т.д. Лечащий врач может пристально следить за эффектом лечения и внести любые изменения по мере необходимости. Кроме того, лицо, имеющее более высокий риск развития АА-амилоидоза (например, человек, который генетически предрасположен к нему или ранее имел воспалительное заболевание или другие вызывающие амилоидоз заболевания) или AL-амилоидоза, может получать профилактическое комбинированное лечение для ингибирования или задержки образования АА- или AL-агрегатов, таких как фибриллы, или в качестве поддерживающей терапии после лечения.

При проведении комбинированной терапии, два или несколько лекарственных веществ вводят одновременно или последовательно в любом порядке, то есть состав по изобретению вводят до введения второго лекарственного вещества, одновременно со вторым лекарственным веществом или после введения второго лекарственного вещества. Например, комбинированную терапию можно провести путем проведения первого метода лечения до (например, за 1 минуту, за 5 минут, за 15 минут, за 30 минут, за 45 минут, за 1 час, за 2 часа, за 4 часа, за 6 часов, за 12 часов, за 24 часа, за 48 часов, за 72 часа, за 96 часов, за 1 неделю, за 2 недели, за 3 недели, за 4 недели, за 5 недель, за 6 недель, за 8 недель или за 12 недель до), одновременно с или после (например, через 1 минуту, через 5 минут, через 15 минут, через 30 минут, через 45 минут, через 1 час, через 2 часа, через 4 часа через 6 часов, через 12 часов, через 24 часа, через 48 часов, через 72 часа, через 96 часов, через 1 неделю, через 2 недели, через 3 недели, через 4 недели, через 5 недель,

через 6 недель, через 8 недель или через 12 недель после) введения второго агента/проведения второго метода лечения.

Дозировка, частота и способ введения каждого компонента комбинации могут регулироваться независимо. Например, первый терапевтический агент/метод лечения можно вводить перорально три раза в день, тогда как второй терапевтический агент/метод лечения можно вводить внутримышечно один раз в день. Комбинированную терапию можно осуществлять нерегулярными циклами, которые включают периоды отдыха. Соединения также могут быть заранее смешаны вместе или каким-либо иным образом совместно введены в фармацевтический состав, так что одно введение обеспечивает оба соединения. В этом случае каждый терапевтический агент обычно присутствует в количестве 1-95% по массе от общей массы композиции. В альтернативном варианте, состав антитела по изобретению и второй терапевтический агент могут находиться в отдельных составах и индивидуальных дозировках. Комбинации лекарственных веществ для лечения могут быть предоставлены в виде компонентов фармацевтической упаковки.

Предпочтительно, чтобы раскрытые комбинированные методы лечения вызвали синергетический терапевтический эффект, т.е. эффект больший, чем сумма их отдельных эффектов или терапевтических результатов. Измеримые терапевтические результаты описаны в настоящем документе. Например, синергетический терапевтический эффект может представлять собой эффект по меньшей мере примерно в два раза выше, чем сумма терапевтических эффектов, вызываемых отдельными агентами в данной комбинации, или по меньшей мере примерно в пять раз выше, или по меньшей мере примерно в десять раз выше, или по меньшей мере примерно в двадцать раз выше, или по меньшей мере, примерно пятьдесят раз выше, или по меньшей мере примерно в сто раз выше. Синергетический терапевтический эффект также можно наблюдать как увеличение терапевтического эффекта по меньшей мере на 10% по сравнению с суммой терапевтических эффектов, вызываемых отдельными агентами в данной комбинации, или по меньшей мере на 20%, или по меньшей мере на 30%, или по меньшей

мере на 40%, или по меньшей мере на 50%, или по меньшей мере на 60%, или по меньшей мере на 70%, или по меньшей мере на 80%, или по меньшей мере на 90%, или по меньшей мере на 100%, или как большее увеличение. Синергетическим эффектом также является эффект, который позволяет снизить дозировки терапевтических агентов, когда они применяются в комбинации.

ПРИМЕРЫ

Следующие ниже примеры включены для иллюстрации вариантов осуществления изобретения. Некоторые аспекты следующих ниже примеров описаны при помощи методик и процедур, которые, как было найдено или предусмотрено соавторами изобретения, хорошо работают при осуществлении изобретения на практике. В свете настоящего описания и общего уровня в данной области техники, специалистам будет понятно, что нижеследующие примеры предназначены только для иллюстрации, и могут использоваться многочисленные замены, модификации и изменения, не выходя за пределы объема изобретения.

Пример 1. Выбор гуманизированного антитела 2A4 для лечения AL-амилоидоза

Было получено IgG1 антитело, каппа изотип, которое является гуманизированным вариантом мышинового антитела 2A4. Последовательности легких и тяжелых цепей репрезентативных гуманизированных 2A4 антител приведены на фиг.1A-1B и 3. Нуклеиновые кислоты, кодирующие версию 3 гуманизированного антитела 2A4, аминокислотные последовательности которой показаны на фиг.3, показаны на фиг.4A-4B.

Родительское моноклональное антитело 2A4 направлено против нового эпитопа на карбоксильном конце сывороточного амилоида А (SAA) человека, появляющемуся в результате расщепления нативной молекулы SAA по 76 аминокислотному остатку. Мышиное антитело не вступает в перекрестную реакцию с иммуноглобулинами G или свободной легкой цепью (LC), и, показано, что оно распознает широкий спектр изотипов AL-амилоида в образцах от различных пациентов, проанализированных до сего момента. 2A4 распознает множество форм амилоидной легкой цепи, включая растворимый мультимер и нерастворимые отложения. Кроме того, было показано,

что антитело усиливает регрессию амилоидомы на модели ксенотрансплантатов в мышцах. Последовательности легкой и тяжелой цепей мышинового антитела 2A4 показаны на фиг.2.

Пример 2. Определение дозы для гуманизированного антитела 2A4

В доклинических исследованиях на мышиную модель TRIAD и яванских макаках использовали дозы 4 и 40 мг/кг для мышей и 10, 50 и 100 мг/кг для обезьян. Пересчет в эквивалентную дозу для человека (HED) на базе мг/кг (наиболее подходящий пересчет для моноклональных антител из-за их ограничения по сосудистому пространству) дает HED 0,32 и 3,2 для мыши и 3,2, 16 и 32 для обезьяны. На основе имеющихся в настоящее время данных, NOAEL для обоих видов, как ожидается, будет самой высокой дозой. Используя мышиную HED (наиболее чувствительный биологический вид вследствие ограничений дозирования), составляющую 3,2 и коэффициент безопасности 10х, начальная MRSD для человека будет составлять приблизительно 0,32 мг/кг. На основании исследований на животных введение человеку начинается с дозы 0,5 мг/кг.

Пример 3. Получение экспрессирующего вектора

Для создания конечного вектора h2A4 IgG1 HC, переменная область тяжелой цепи была получена с помощью ПЦР с использованием плазмиды CET1019AS-hygro-h2A4VN3-Sce 4.23.07 в качестве матрицы. Для субклонирования в используемых для амплификации праймерах на 5'-конце фрагмента был введен сайт рестрикции *MfeI*, а на 3'-конце - сайт рестрикции *BlnI*. Переменную область клонировали в расщепленный *MfeI* и *BamHI* эукариотический экспрессирующий вектор pBI-61, который содержит геномные константные области G1m(3)-аллотипа IgG1 человека. Полученный рекомбинантный экспрессирующий вектор pBI-61/2A4 IgG1-REM имеет размер 9015 пар оснований и несет селектируемый маркер дигидрофолатредуктазу (DHFR) хомячка под контролем DHFR-промотора и сигнала полиаденилирования. Этот вектор также содержит ген бета-лактамазы для отбора в *E. coli*, а также точки инициации репликации для *E. coli* (ColE1 ori), вируса SV40 (SV40 ori) и нитчатого фага f1 (f1 ori). Экспрессия тяжелой цепи

управляется областью раннего промотора/энхансера из цитомегаловируса человека (CMV) в сочетании с усиливающим транскрипцию элементом (TE) из генома хомяка. Для остановки транскрипции и стабилизации транскриптов используется сигнал полиаденилирования из гормона роста хомяка, и для усиления транскрипции – некодирующая последовательность из генома хомяка (TE).

С использованием плазмиды CET1019AS-hu2A4VL3-HCK-Puro-Sce 4.19.07 в качестве матрицы, вариабельная область h2A4 LC была получена с помощью ПЦР, вводящей на 5'-конце фрагмента сайт рестрикции *SgrAI*, а на 3'-конце сайт рестрикции *KpnI* для субклонирования в конечный эукариотический экспрессирующий вектор pBI-60, расщепленный теми же ферментами рестрикции. Этот вектор содержит геномную константную область каппа-цепи человека. Полученный рекомбинантный экспрессирующий вектор pBI-60/2A4 LC имеет размер 7144 пар оснований и содержит селектируемый маркер мутантную неомицинофосфотрансферазу, которая придает устойчивость к генетицину, под контролем промотора SV40. Для остановки транскрипции используется сигнал полиаденилирования из тимидинкиназы вируса *Herpes simplex*. Этот вектор также содержит ген бета-лактамазы для отбора в *E. coli*, а также точки инициации репликации для *E. coli* (ColE1 ori), вируса SV40 (SV40 ori) и нитчатого фага f1 (f1 ori). Экспрессия легкой цепи управляется областью раннего промотора/энхансера из цитомегаловируса человека (CMV) в сочетании с усиливающим транскрипцию элементом (TE) из генома хомяка. Для остановки транскрипции и стабилизации транскриптов используется сигнал полиаденилирования из гормона роста хомяка, и для усиления транскрипции – некодирующая последовательность из генома хомяка (TE).

Пример 4. Получение гуманизированного 2A4 антитела (объединенного материала)

Гуманизированное 2A4 получали в клетках яичника китайского хомячка (CHO), выращиваемых в химической среде без каких-либо компонентов, полученных из крупного рогатого скота. Антитело пулировали из стабильно трансфицированных клеток, из которых в

итоге была получена продуцирующая клеточная линия. Полученный пулированный материал очищали с помощью аффинной хроматографии на белке А. Этот материал использовали для исследований перекрестной реактивности на тканях человека и для одноклонового фармакокинетического исследования (РК) на яванских макаках. Состав гуманизированного антитела 2A4 включал 10 мг/мл антитела, 25 мМ L-гистидин/L-гистидин-HCl моногидрат, 230 мМ безводную трегалозу, 0,02%-й (масс./об.) полисорбат 20 (TWEEN® 20), pH=6,5.

Пример 5. Получение гуманизированного 2A4 антитела (клональный материал)

Одиночный клон клеток CHO был выделен из клеточных пулов, описанных в примере 3, и был использован для создания маточного банка клеток (МСВ) без каких-либо материалов, полученных из крупного рогатого скота. Гуманизированное антитело 2A4 для доклинических исследований изготавливали в 80-литровом масштабе, используя такие же способы культивирования клеток и очистки (за исключением увеличения масштаба), как и в случае клинической версии GMP (надлежащей производственной практики) для гуманизированного антитела 2A4 (2000-литровый масштаб). Материал, полученный в 2000-литровом масштабе, может также использоваться в доклинических исследованиях.

Пример 6. Способ изготовления гуманизированного антитела 2A4

Разморозка ампулы и размножение посевной культуры. Клетки из МСВ размораживают и переносят в подходящий клеточный культуральный флакон. Клетки инкубируют при температуре приблизительно 37°C. Размороженную культуру размножают от одного до четырех дней (первый пассаж после разморозки клеток). Для субкультивирования аликвоту выросшей клеточной культуры (и определенный объем прогретой, профильтрованной через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм или меньше посевной среды) используют для достижения плотности посева клеток приблизительно 0,1–0,5×10⁶ клеток/мл в стандартных клеточных культуральных сосудах с рабочим объемом, составляющим приблизительно от 0,02 л до 1

л. Например, первый пассаж можно провести в сосудах 0,125 л или 0,25 л или 0,5 л, с последующими пассажами в 1-литровых сосудах. На этой стадии культивирования можно заложить исходную культуру. Для приготовления посевных культур для отдельных производственных ферментеров аликвоты фондовых культур размножали, чтобы получить объем культуры до 25 л. Как правило, культуру клеток рассеивают из 1-литровой культуры на 2 или несколько 1-литровых или 2-литровых культур, затем на 2 или несколько 2-литровых или 3-литровых культур и, наконец, на 2 или несколько культур с объемом до 25 л на сосуд. Выросшие клеточные суспензии из нескольких сосудов можно объединить и использовать для посева в 80-литровый биореактор. Для вышеуказанных стадий культивирования в качестве стандартных клеточных культуральных сосудов могут использоваться встряхиваемые колбы, Т-образные колбы, вращающиеся колбы и мешки.

Посев культур в биореакторы. Перед посевом клеток в биореакторы добавляют ростовую среду, профильтрованную через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм или меньше. Содержимое заполненных биореакторов нагревают до температуры приблизительно 37°C и поддерживают при этой температуре на протяжении инкубации клеток. Клетки из посевных культур переносят в предварительно прогретую среду. Исходная плотность клеток должна находиться в диапазоне $0,1-0,5 \times 10^6$ клеток/мл. Клетки выращивают в 80-литровом биореакторе, а затем в 400-литровом биореакторе. Клетки субкультивируют приблизительно каждые два-четыре дня. На этой стадии клетки могут быть перенесены в другой сосуд такого же или большего объема. Как правило, культура клеток масштабируется от культуры в 1×80 л биореакторе до культуры 1×400 л. Чтобы начать фазу производства антитела, клетки переносятся из выращенной 400-литровой клеточной суспензии в биореактор для производства антител с рабочим объемом приблизительно 2000 л.

Производственная культура в 2000-литровом биореакторе. Перед посевом клеток в производственный биореактор добавляют

среду, профильтрованную через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм или меньше. Содержимое заполненного производственного биореактора нагревают до температуры приблизительно 37°C, и поддерживают при этой температуре на протяжении инкубации клеток. Исходная плотность клеток должна находиться в диапазоне $0,1-0,5 \times 10^6$ клеток/мл. Производственный биореактор работает в режиме периодического культивирования с подпиткой. Чтобы поддерживать производство антитела и продлить жизнь культуры, на стадии производства добавляют питательную среду. Временная точка, в которой начинают подачу питательной среды, определяется либо временем культивирования, либо плотностью клеток. По мере необходимости, на стадии производства могут быть добавлены раствор глюкозы и/или глутамина, чтобы избежать истощения этих веществ за время производства. Время работы 2000-литрового производственного биореактора обычно составляет от 8 до 14 дней. Образцы перед сбором проверяются на стерильность, микоплазму и случайные вирусы *in vitro*.

Сбор и освещение культуры. Через 8-14 дней культивирования в производственном режиме, клеточную культуральную жидкость отделяют от клеток. После отбора образцов и до сбора, можно отрегулировать pH и температуру среды, чтобы облегчить удаление клеток, дебриса и частиц во время сбора. Для удаления клеток, культуру центрифугируют плюс пропускают через тупиковую фильтрующую установку. Клетки удаляются центрифугированием и/или удерживаются на мембране. Культуральную жидкость собирают, пропускают через фильтры с размером пор 0,22 мкм или меньше и собирают в соответствующую емкость. Остаточную культуральную жидкость можно удалить из системы сбора промывкой фосфатно-солевым буфером (PBS) для выделения остаточного продукта из системы сбора. Полученный остаточный продукт объединяют вместе с собранной культуральной жидкостью, получая пулированный сбор, называемый также собранной бесклеточной культуральной жидкостью (HCCF). Можно регулировать pH и температуру HCCF, чтобы облегчить последующие стадии ее обработки.

Очистка. Антитело очищают из НССГ с помощью серии стадий, включающих аффинную хроматографию, кислотную обработку, глубинную фильтрацию, анионообменную хроматографию, катионообменную хроматографию, нанофильтрацию и ультра/диафильтрацию, некоторые из которых могут быть выполнены в нескольких циклах. Для удаления загрязнений, антитело специфично связывается на стадии аффинной хроматографии. НССГ наносится на хроматографическую колонку, заполненную носителем MabSelect. Носитель связывается с антителом при нейтральном pH, в то время как загрязнения остаются в проскоке и удаляются. Колонку элюируют ступенчато 100 мМ раствором уксусной кислоты/ацетата натрия, pH 3,5. Для инактивации потенциальных вирусных загрязнений, раствор антитела инкубируют при комнатной температуре в течение как минимум 60 минут при pH 3,5±0,1. После инкубации обработанный кислотой пул антитела подводят до pH 7,2 с помощью 2М раствора трометамола и проводят глубинную фильтрацию для осветления. Для анионообменной хроматографии, пулированный продукт после глубинной фильтрации доводят до проводимости ≤7 мСм/см водой для инъекций (WFI). Доведенный пул наносят на хроматографическую колонку, заполненную смолой Q Sepharose FF. Антитело проходит через анионообменный носитель, не связываясь с ним. Осуществляют контроль проскока, и фракцию, содержащую антитело, собирают исходя из измерения оптической плотности. Для катионообменной хроматографии, пулированный продукт доводят до pH 5,5±0,1 добавлением уксусной кислоты и до проводимости ≤7,5 мСм/см, используя WFI. Доведенный пулированный продукт наносят на хроматографическую колонку, заполненную катионообменной смолой SP Sepharose FF. Эту хроматографическую стадию выполняют в режиме связывание-элюция. Антитело связывается с катионообменным носителем. Колонку элюируют ступенчато раствором 100 мМ уксусной кислоты/ацетата/натрия и 138,5 мМ хлорида натрия, pH 5,5. Потенциальные вирусные загрязнения удаляются путем пропускания раствора антител через предварительный фильтр 0,1 мкм и нанофильтр Planova 20N при максимальном давлении в 1 бар дифференциального давления нанофильтра Planova 20N. Во время

ультрафильтрации/диафильтрации (UF/DF), продукт концентрируют до заданной концентрации, а буфер заменяют на буфер фармацевтического состава. Концентрирование и диафильтрацию осуществляют с использованием ультрафильтрационных мембран, имеющих отсечение приблизительно 30 кДа. Материал обрабатывается путем концентрирования продукта до 30–100 мг/мл. Пул после 30 кДа подвергают диафильтрации с раствором 25 мМ L-гистидина, pH 6,5 и промывают до концентрации примерно 60–70 мг/мл. Промежуточный пул 30 кДа можно хранить при –40°C до приготовления фармацевтического состава. Для приготовления фармацевтического состава, пулированный продукт 30 кД переводят в раствор, содержащий 17,5 мМ L-гистидин/7,5 мМ L-гистидина гидрохлорид, 230 мМ трегалозе, и 0,02% (масс./об.) полисорбат 20, pH=6,5. В конце антитело разбавляют буфером фармацевтического состава до заданной концентрации 10 мг/мл. Полученное лекарственное вещество фильтруют через фильтр с размером пор 0,22 мкм для удаления любых потенциальных случайных микробных загрязнений и частиц. До фасовки лекарственное вещество можно хранить в замороженном виде при –40°C.

Пример 7. Характеристика лекарственного вещества, содержащего гуманизированное антитело 2A4

Гуманизированное 2A4, используемое в составе, состоит из двух гетеродимеров. Каждый из гетеродимеров состоит из тяжелой полипептидной цепи ~50 кДа (449 аминокислот) и легкой каппа-полипептидной цепи ~24 кДа (219 аминокислот). Антитело имеет гуманизированную аминокислотную последовательность с общей молекулярной массой приблизительно 147 кДа. Четыре полипептидные цепи молекулы антитела связаны друг с другом дисульфидными связями. Каждая тяжелая полипептидная цепь содержит одну консенсусную последовательность для N-гликозилирования, которая занята гликозидной группой (позиции 299–301, выделена полужирным шрифтом и подчеркнута на фиг.1А). В молекуле антитела присутствуют два участка связывания эпитопа сывороточного амилоида А.

Конкурентный анализ ELISA был разработан для измерения связывания гуманизированного антитела 2A4 со своим антигеном (CGGHEDT (SEQ ID NO: 17), конъюгированным с овалбумином) в сравнении с эталонным стандартом.

Пример 8. Компоненты и композиция лекарственного вещества гуманизированного антитела 2A4

Лекарственное вещество гуманизированное антитело 2A4 (100 мг/флакон) для клинического применения представляет собой стерильную жидкую лекарственную форму, состоящую из 10 мл во флаконе 25 мл (20R). Доклиническое лекарственное вещество гуманизированное антитело 2A4 (200 мг/флакон) представляет собой 20 мл во флаконе 25 мл (20R). Доклинический и клинический составы гуманизированного антитела 2A4 приведены в таблице 1. Конечный состав лекарственного вещества гуманизированного антитела 2A4 имеет плотность 1,034 г/мл при 20°C и pH 6,5.

Таблица 1

Композиция доклинического и клинического лекарственного вещества гуманизированного антитела 2A4

Компонент	Функция	Концентрация (г/л)	Номинальное количество (мг/флакон)	
			Размер доклинического флакона = 25 мл (20R)	Размер клинического флакона = 25 мл (20R)
Лекарственное вещество гуманизированное антитело 2A4	Действующее вещество	10	200	100
L-гистидин	Компонент буфера	2,72	54,4	27,2
L-гистидина гидрохлорид, моногидрат	Компонент буфера	1,57	31,4	15,7
Трегалозы дигидрат	Вещество для изменения тоничности	87,02	1740,4	870,2

Полисорбат 20 (TWEEN® 20)	Поверхностно-активное вещество	0,20	4,0	2,0
Вода для инъекций (WFI)	Растворитель	--	Добавляют WFI до общего объема 20 мл	Добавляют WFI до общего объема 10 мл

Пример 9. Состав партии для лекарственного продукта (флакон 100 мг/мл)

Для партии из 2600 флаконов лекарственного продукта был разработан состав, который приведен в таблице 2.

Таблица 2

Состав партии из 2600 флаконов

Ингредиент	Степень чистоты	Количество на партию
Гуманизированное антитело 2A4	–	260,0 г
L-гистидин	Фармакопея США, европейская фармакопея	70,72 г
L-гистидина гидрохлорид, моногидрат	Европейская фармакопея	40,82 г
Трегалозы дигидрат	Фармакопея США/Национальный формуляр, европейская фармакопея	2262,52 г
Полисорбат 20	Фармакопея США/Национальный формуляр, европейская фармакопея	5,20 г

Пример 10. Лиофилизация

Использовали лиофильную сушилку Hof Com 26041 для лиофилизации состава лекарственного вещества гуманизированного антитела 2A4 в течение примерно 86 часов с давлением, регулируемым контрольной системой MKS (MKS Instruments), с

вводом N_2 в соответствии с программой, указанной в таблице 3. Конечную точку определяли по сигналу Пирани. Во время сушки флаконы стояли непосредственно на полках без подносов для лиофилизации. Продув азотом проводили при примерно 600 мбар, используя стерильный азот фармацевтического качества. Флаконы затем закрывали и хранили при 5°C в лиофильной сушке. Конечный лекарственный продукт хранили при температуре 2-8°C в защищенном от света месте. Этот процесс должен давать лиофилизированный остаток от белого до желтоватого цвета.

В таблице 3 приведена программа лиофилизации лекарственного вещества гуманизированного антитела 2A4.

Таблица 3

Стадии лиофилизации

Стадия	№ стадии	Время [ч:мин]	Температура на полке [°C]	Вакуум MKS [мбар]
Загрузка	01	00:01	5	выключен
Заморозка	02	00:15	5	выключен
	03	00:05	2	выключен
	04	02:00	2	выключен
	05	01:05	-50	выключен
	06	02:30	-50	выключен
Первичная сушка	07	00:05	-50	0,10
	08	00:40	-10	0,10
	09	55:00	-10	0,10
Вторичная сушка	10	04:30	30	0,10
	11	20:00	30	0,10

Общее время		86:11		
-------------	--	-------	--	--

Пример 11. Восстановление лиофилизированного лекарственного продукта

Перед применением лиофилизат должен быть восстановлен стерильной водой для инъекций. Восстановление h2A4 во флаконах выполняли в соответствии со следующей процедурой под ламинарным воздушным потоком. Алюминиевый колпачок с соответствующего флакона продукта удаляли полностью. Резиновую пробку также удаляли. Необходимый объем растворителя добавляли с помощью пипетки (2×5 мл WFI с помощью поршневой пипетки). При выполнении этого действия необходимо гарантировать медленное добавление растворителя к лиофилизированному продукту. Флаконы осторожно крутили (не встряхивая) до полного растворения лиофилизированного продукта. Раствор гомогенизировали, осторожно переворачивая флакон вверх-вниз. Растворенный материал разделяли на аликвоты в соответствии с таблицей 1 и хранили при -70°C до анализа.

Пример 12. Клиническая оценка лекарственного вещества гуманизированного антитела 2A4

Клиническое испытание предназначено для определения максимально переносимой дозы (MTD) и/или рекомендуемой для Фазы 2 дозы (P2RD) лекарственного вещества гуманизированного антитела 2A4 у пациентов с AL-амилоидозом. Дозирование будет начинаться с 0,5 мг/кг и повышаться до 30 мг/кг или до общего количества 2500 мг (в зависимости от того, которое из них будет меньше). Первоначально, лекарственное вещество гуманизированное антитело 2A4 будут вводить внутривенно в виде монотерапии каждые 28 дней до наступления развития органной дисфункции или неприемлемой токсичности, связанной с лечением, или до отзыва согласия на лечение. Если период полувыведения ($t_{1/2}$) лекарственного вещества гуманизированного антитела 2A4 при исходных дозировках предполагает большую целесообразность другой схемы лечения (например, раз в две недели или через

неделю, меньшую частоту, чем один раз в 28 дней), дозирование для последующих когорт может быть изменено с использованием альтернативной схемы введения.

<213> Mus musculus

<223> ЛИДЕРНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<222> (20) .. (131)

<223> CDR 1

<223> CDR 2

<223> CDR 3

 $\langle 400 \rangle$ 1

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Tyr Phe Thr
Страница 1

65

70

75

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys
 80 85 90

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 95 100 105

Glu Ile Lys
 110

<210> 2
 <211> 131
 <212> БЕЛОК
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(19)
 <223> ЛИДЕРНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>
 <221> зрелый пептид
 <222> (20)..(131)

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (43)..(58)
 <223> CDR1

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (74)..(80)
 <223> CDR2

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (113)..(121)
 <223> CDR3

<400> 2

Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
 -15 -10 -5

Ser Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
 -1 1 5 10

Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Leu Ser Leu
 15 20 25

Val His Ser Thr Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
 30 35 40 45

Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Tyr Phe Thr
 Страница 2

75

90

105

110

<213> Mus musculus

<223> ЛИДЕРНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

$\langle 222 \rangle$ (20) .. (138)

<223> CDR 1

<223> CDR 2

<223> CDR 3

$\langle 400 \rangle$ 3

-5

10

25

45

60

Страница 3

65

70

75

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

Ala Met Tyr Tyr Cys Val Arg Pro Tyr Ser Asp Ser Phe Ala Tyr Trp
 95 100 105

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 110 115

<210> 4
 <211> 112
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Последовательность гуманизированного антитела, содержащего аминокислотные
 остатки мыши и человека (версия 3 варибельной области легкой цепи
 гуманизированного антитела 2A4)

<400> 4

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

Thr Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
 85 90 95

Thr His Val Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

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

<220>
 <223> Последовательность гуманизированного антитела, содержащего аминокислотные
 остатки мыши и человека (версия 3 варибельной области тяжелой цепи
 гуманизированного антитела 2A4)

<400> 5

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1

5

10

15

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

Ala Met Tyr Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Arg Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Ile Tyr Tyr Ala Asp
 50 55 60

Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
 65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Pro Tyr Ser Asp Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 6
 <211> 16
 <212> БЕЛОК
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(16)
 <223> 2A4 VL CDR1

<400> 6

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Thr Gly Asn Thr Tyr Leu His
 1 5 10 15

<210> 7
 <211> 7
 <212> БЕЛОК
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(7)
 <223> 2A4 VL CDR2

<400> 7

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 1 5

<210> 8
 <211> 9
 <212> БЕЛОК

<213> Mus musculus

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(9)

<223> 2A4 VL CDR3

<400> 8

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Phe Thr
1 5

<210> 9

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Mus musculus

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(10)

<223> 2A4 VH CDR1

<400> 9

Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr Ala Met Tyr
1 5 10

<210> 10

<211> 19

<212> БЕЛОК

<213> Mus musculus

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(19)

<223> 2A4 VH CDR2

<400> 10

Arg Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser
1 5 10 15

Val Lys Asp

<210> 11

<211> 8

<212> БЕЛОК

<213> Mus musculus

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(8)

<223> 2A4 VH CDR3

<400> 11

Pro Tyr Ser Asp Ser Phe Ala Tyr
1 5

seq1.txt

<210> 12
 <211> 7
 <212> БЕЛОК
 <213> Mus musculus

<400> 12

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 1 5

<210> 13
 <211> 219
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Последовательность гуманизированного антитела, содержащего аминокислотные остатки мыши и человека (каппа-легкая цепь гуманизированного антитела 2A4)

<400> 13

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

Thr Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
 85 90 95

Thr His Val Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 Страница 7

180

185

190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 14

<211> 449

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность гуманизированного антитела, содержащего аминокислотные
 остатки мыши и человека (Вариант 1 тяжелой цепи гуманизированного антитела 2A4
 IgG1 (аллотип G1m1))

<400> 14

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

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

Ala Met Tyr Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Arg Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Ile Tyr Tyr Ala Asp
 50 55 60

Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
 65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Pro Tyr Ser Asp Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 Страница 8

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

seq1.txt

<210> 15
 <211> 449
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Последовательность гуманизированного антитела, содержащего аминокислотные остатки мыши и человека (Вариант 2 тяжелой цепи гуманизированного антитела 2A4 IgG1 (аллотип G1m3))

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (299)..(301)
 <223> glycosylation site

<400> 15

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

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

Ala Met Tyr Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Arg Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Ile Tyr Tyr Ala Asp
 50 55 60

Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
 65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Pro Tyr Ser Asp Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190

seq1.txt

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

Lys

seq1.txt

<210> 16
 <211> 445
 <212> БЕЛОК
 <213> ИСКУССТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
 <220>
 <223> Последовательность гуманизированного антитела, содержащего аминокислотные
 остатки мыши и человека (тяжелая цепь гуманизированного антитела 2A4 IgG2)
 <400> 16
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
 20 25 30
 Ala Met Tyr Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Arg Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Ile Tyr Tyr Ala Asp
 50 55 60
 Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
 65 70 75 80
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Ala Arg Pro Tyr Ser Asp Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu
 210 215 220

seq1.txt

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln
 260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300

Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335

Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 17
 <211> 7
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens
 <400> 17
 Cys Gly Gly His Glu Asp Thr
 1 5

<210> 18

seq1.txt

<211> 4
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 18

Ala Glu Asp Ser
1

<210> 19
<211> 660
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательность гуманизированного антитела, содержащего аминокислотные остатки мыши и человека (кДНК последовательность Hu2A4 VH3VL3 hcg1, k - легкая цепь без сигнальной последовательности)

<400> 19
gacgtggtga tgacccagtc ccctctgtcc ctgcctgtga cccctggcga gcctgcctcc 60
atctcctgcc ggtcctccca gtccctggtg cactccaccg gcaacaccta tctgcactgg 120
tatctgcaga agcctggcca gtctcctcag ctgctgatct acaaggtgtc caaccggttc 180
tccggcgtgc ctgaccggtt ctctggctcc ggctccggca ccgacttcac cctgaagatc 240
tcccgggtgg aggccgagga cgtgggcgtg tactactgct cccagtccac ccacgtgcct 300
ttcaccttcg gcggaggcac caaggtggag atcaagcgaa ctgtggctgc accatctgtc 360
ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 420
ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtggg aggtggataa cgccctccaa 480
tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540
agcagcacc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 600
gtcaccatc agggcctgag ctcgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgttag 660

<210> 20
<211> 726
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательность гуманизированного антитела, содержащего аминокислотные остатки мыши и человека (кДНК последовательность Hu2A4 VH3VL3 hcg1, k - легкая цепь)

<220>
<221> сигнальный пептид
<222> (1)..(66)

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(726)

<220>
<221> V_область
<222> (67)..(402)

<220>

seq1.txt

<221> C_область
<222> (403)..(726)

```

<400> 20
atg gac atg cgg gtg ccc gca cag ctg ctg ggc ctg ctg atg ctg tgg      48
Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Met Leu Trp
1 5 10 15

gtg tcc ggc tcc tcc ggc gac gtg gtg atg acc cag tcc cct ctg tcc      96
Val Ser Gly Ser Ser Gly Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser
20 25 30

ctg cct gtg acc cct ggc gag cct gcc tcc atc tcc tgc cgg tcc tcc      144
Leu Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
35 40 45

cag tcc ctg gtg cac tcc acc ggc aac acc tat ctg cac tgg tat ctg      192
Gln Ser Leu Val His Ser Thr Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu
50 55 60

cag aag cct ggc cag tct cct cag ctg ctg atc tac aag gtg tcc aac      240
Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn
65 70 75 80

cgg ttc tcc ggc gtg cct gac cgg ttc tct ggc tcc ggc tcc ggc acc      288
Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
85 90 95

gac ttc acc ctg aag atc tcc cgg gtg gag gcc gag gac gtg ggc gtg      336
Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val
100 105 110

tac tac tgc tcc cag tcc acc cac gtg cct ttc acc ttc ggc gga ggc      384
Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly
115 120 125

acc aag gtg gag atc aag cga act gtg gct gca cca tct gtc ttc atc      432
Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile
130 135 140

ttc ccg cca tct gat gag cag ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg      480
Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val
145 150 155 160

tgc ctg ctg aat aac ttc tat ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag      528
Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys
165 170 175

gtg gat aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag      576
Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu
180 185 190

cag gac agc aag gac agc acc tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg      624
Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu
195 200 205

agc aaa gca gac tac gag aaa cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc      672
Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr
210 215 220

cat cag ggc ctg agc tcg ccc gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag      720
His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu
225 230 235 240

tgt tag
Cys
726

```

seq1.txt

<210> 21
 <211> 241
 <212> БЕЛОК
 <213> ИСКУССТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>
 <223> Синтетическая конструкция

<400> 21

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Met Leu Trp
 1 5 10 15

Val Ser Gly Ser Ser Gly Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser
 20 25 30

Leu Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
 35 40 45

Gln Ser Leu Val His Ser Thr Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu
 50 55 60

Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn
 65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
 85 90 95

Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly
 115 120 125

Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile
 130 135 140

Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val
 145 150 155 160

Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys
 165 170 175

Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu
 180 185 190

Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu
 195 200 205

Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr
 210 215 220

His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu
 Страница 16

Cys

<210> 22
<211> 1350
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Последовательность гуманизированного антитела, содержащего аминокислотные остатки мыши и человека (кДНК последовательность Hu2A4 VH3VL3 hcg1, k - тяжелая цепь без сигнальной последовательности)

<400> 22
gaggtgcagc tggtcgagtc cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggctc cctgagactg 60
tcctgcgccg cctccggctt caccttcaac acctacgcc a tgtactggat caggcaggct 120
cctggcaagg gactggagtg ggtggcccgg atcaggtcca agtccaacaa ctacgctatc 180
tactacgccg actccgtgaa ggaccggttc accatctccc gggacgactc caagaactcc 240
ctgtatctgc agatgaactc cctgaaaacc gaggacaccg ccgtgtacta ctgcgctcgg 300
ccttactccg actccttcgc ctactggggc cagggcaccc tggtgaccgt gtccagcgcc 360
tccaccaagg gcccatcggc cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc 420
acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccgggtgac ggtgtcgtgg 480
aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtcctaca gtcctcagga 540
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac 600
atctgcaacg tgaatcacia gccagcaac accaagggtg acaagagagt tgagcccaaa 660
tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg 720
tcagtcttcc tcttcccccc aaaaccaag gacaccctca tgatctcccg gacccttgag 780
gtcacatgcg tgggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac 840
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 900
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 960
tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagccccc a tcgagaaaac catctccaaa 1020
gccaaagggc agccccgaga accacagggtg tacacgctgc ccccatcccg ggaggagatg 1080
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 1140
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1200
gactccgacg gtccttctt cctctatagc aagctcaccg tggacaagag cagggtggcag 1260
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1320
aagagcctct ccctgtcccc gggtaaatga 1350

<210> 23
<211> 1407
<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность гуманизированного антитела, содержащего аминокислотные остатки мыши и человека (кДНК последовательность Hu2A4 VH3VL3 hcg1, к - тяжелая цепь)

<220>

<221> сигнальный пептид

<222> (1)..(57)

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1407)

<220>

<221> V_область

<222> (58)..(414)

<220>

<221> C_область

<222> (415)..(1407)

<400> 23

atg	gag	ttc	ggc	ctg	tcc	tgg	ctg	ttc	ctg	gtg	gcc	atc	ctg	aag	ggc		48
Met	Glu	Phe	Gly	Leu	Ser	Trp	Leu	Phe	Leu	Val	Ala	Ile	Leu	Lys	Gly		
1				5					10					15			

gtg	cag	tgc	gag	gtg	cag	ctg	gtc	gag	tcc	ggc	gga	ggc	ctg	gtg	cag		96
Val	Gln	Cys	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln		
			20					25					30				

cct	ggc	ggc	tcc	ctg	aga	ctg	tcc	tgc	gcc	gcc	tcc	ggc	ttc	acc	ttc		144
Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe		
		35					40					45					

aac	acc	tac	gcc	atg	tac	tgg	atc	agg	cag	gct	cct	ggc	aag	gga	ctg		192
Asn	Thr	Tyr	Ala	Met	Tyr	Trp	Ile	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu		
	50					55					60						

gag	tgg	gtg	gcc	cgg	atc	agg	tcc	aag	tcc	aac	aac	tac	gct	atc	tac		240
Glu	Trp	Val	Ala	Arg	Ile	Arg	Ser	Lys	Ser	Asn	Asn	Tyr	Ala	Ile	Tyr		
65					70					75					80		

tac	gcc	gac	tcc	gtg	aag	gac	cgg	ttc	acc	atc	tcc	cgg	gac	gac	tcc		288
Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Asp	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asp	Ser		
				85					90				95				

aag	aac	tcc	ctg	tat	ctg	cag	atg	aac	tcc	ctg	aaa	acc	gag	gac	acc		336
Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Thr	Glu	Asp	Thr		
			100					105					110				

gcc	gtg	tac	tac	tgc	gct	cgg	cct	tac	tcc	gac	tcc	ttc	gcc	tac	tgg		384
Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Pro	Tyr	Ser	Asp	Ser	Phe	Ala	Tyr	Trp		
		115					120					125					

ggc	cag	ggc	acc	ctg	gtg	acc	gtg	tcc	agc	gcc	tcc	acc	aag	ggc	cca		432
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro		
	130					135					140						

tcg	gtc	ttc	ccc	ctg	gca	ccc	tcc	tcc	aag	agc	acc	tct	ggg	ggc	aca		480
Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr		
145					150					155					160		

gcg	gcc	ctg	ggc	tgc	ctg	gtc	aag	gac	tac	ttc	ccc	gaa	ccg	gtg	acg		528
Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr		
				165					170					175			

seq1.txt

gtg	tcg	tgg	aac	tca	ggc	gcc	ctg	acc	agc	ggc	gtg	cac	acc	ttc	ccg	576
Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	
			180					185					190			
gct	gtc	cta	cag	tcc	tca	gga	ctc	tac	tcc	ctc	agc	agc	gtg	gtg	acc	624
Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	
		195					200					205				
gtg	ccc	tcc	agc	agc	ttg	ggc	acc	cag	acc	tac	atc	tgc	aac	gtg	aat	672
Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	
	210					215					220					
cac	aag	ccc	agc	aac	acc	aag	gtg	gac	aag	aga	gtt	gag	ccc	aaa	tct	720
His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	
225					230					235					240	
tgt	gac	aaa	act	cac	aca	tgc	cca	ccg	tgc	cca	gca	cct	gaa	ctc	ctg	768
Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	
				245					250					255		
ggg	gga	ccg	tca	gtc	ttc	ctc	ttc	ccc	cca	aaa	ccc	aag	gac	acc	ctc	816
Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	
			260					265					270			
atg	atc	tcc	cgg	acc	cct	gag	gtc	aca	tgc	gtg	gtg	gtg	gac	gtg	agc	864
Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	
		275					280					285				
cac	gaa	gac	cct	gag	gtc	aag	ttc	aac	tgg	tac	gtg	gac	ggc	gtg	gag	912
His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	
	290					295					300					
gtg	cat	aat	gcc	aag	aca	aag	ccg	cgg	gag	gag	cag	tac	aac	agc	acg	960
Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	
305					310					315					320	
tac	cgt	gtg	gtc	agc	gtc	ctc	acc	gtc	ctg	cac	cag	gac	tgg	ctg	aat	1008
Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	
				325					330					335		
ggc	aag	gag	tac	aag	tgc	aag	gtc	tcc	aac	aaa	gcc	ctc	cca	gcc	ccc	1056
Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	
			340					345					350			
atc	gag	aaa	acc	atc	tcc	aaa	gcc	aaa	ggg	cag	ccc	cga	gaa	cca	cag	1104
Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	
		355					360					365				
gtg	tac	acg	ctg	ccc	cca	tcc	cgg	gag	gag	atg	acc	aag	aac	cag	gtc	1152
Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	
	370					375					380					
agc	ctg	acc	tgc	ctg	gtc	aaa	ggc	ttc	tat	ccc	agc	gac	atc	gcc	gtg	1200
Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	
385					390					395					400	
gag	tgg	gag	agc	aat	ggg	cag	ccg	gag	aac	aac	tac	aag	acc	acg	cct	1248
Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	
				405					410					415		
ccc	gtg	ctg	gac	tcc	gac	ggc	tcc	ttc	ttc	ctc	tat	agc	aag	ctc	acc	1296
Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	
			420					425					430			
gtg	gac	aag	agc	agg	tgg	cag	cag	ggg	aac	gtc	ttc	tca	tgc	tcc	gtg	1344
Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	
		435					440					445				

seq1.txt

atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg 1392
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
450 455 460

tcc ccg ggt aaa tga 1407
Ser Pro Gly Lys
465

<210> 24
<211> 468
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетическая конструкция

<400> 24

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Asn Thr Tyr Ala Met Tyr Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Ile Tyr
65 70 75 80

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
85 90 95

Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr
100 105 110

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Pro Tyr Ser Asp Ser Phe Ala Tyr Trp
115 120 125

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
130 135 140

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
145 150 155 160

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
165 170 175

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
180 185 190

seq1.txt

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
195 200 205

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
210 215 220

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser
225 230 235 240

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
245 250 255

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
260 265 270

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
275 280 285

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
290 295 300

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
305 310 315 320

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
325 330 335

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
340 345 350

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
355 360 365

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
370 375 380

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
385 390 395 400

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
405 410 415

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
420 425 430

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
435 440 445

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
450 455 460

seq1.txt

Ser Pro Gly Lys
465

2

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**1. Фармацевтический состав, содержащий:**

(a) химерную или гуманизированную версию антитела 2A4 (ATCC PTA-9662) или антитела 7D8 (ATCC PTA-9468) или ее фрагмент, которые специфично конкурируют с 2A4 или 7D8 за связывание с антигеном, причем антитело присутствует в концентрации в диапазоне от примерно 1 мг/мл до примерно 100 мг/мл;

(b) гистидиновый буфер, присутствующий в концентрации в диапазоне от примерно 20 мМ до примерно 30 мМ;

(c) трегалозу, присутствующую в концентрации в диапазоне от примерно 210 мМ до примерно 250 мМ; и

(d) полисорбат 20, присутствующий в концентрации в диапазоне от примерно 0,005% до примерно 0,05% по массе;

причем состав характеризуется pH в диапазоне от примерно 6 до примерно 7.

2. Состав по п.1, где антитело является гуманизированной версией антитела 2A4.

3. Состав по п.1, где антитело содержит переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4.

4. Состав по п.1, где антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5.

5. Состав по п.3, где антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5.

6. Состав по п.5, где антитело содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в любой одной из SEQ ID NO: 14-16.

7. Состав по п.6, где антитело содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 15.

8. Состав по п.1, где антитело содержит переменную область легкой цепи, содержащую три определяющие комплементарности области, приведенные в SEQ ID NO: 6, 7 и 8, и переменную область тяжелой цепи, содержащую три определяющие комплементарности области, приведенные в SEQ ID NO: 9, 10, и 11.

9. Состав по п.1, где антитело является гуманизированной или химерной версией антитела 7D8, имеющего номер доступа в ATCC PTA-9468.

10. Состав по п.1, где антитело содержит переменную область легкой цепи, содержащую три определяющие комплементарности области, приведенные в SEQ ID NO: 12, 7 и 8, и переменную область тяжелой цепи, содержащую три определяющие комплементарности области, приведенные в SEQ ID NO: 9, 10 и 11.

11. Состав по любому из пп.1-10, где антитело присутствует в концентрации в диапазоне от примерно 5 мг/мл до примерно 15 мг/мл.

12. Состав по п.11, где антитело присутствует в концентрации примерно 10 мг/мл.

13. Состав по любому из пп.1-10, где антитело присутствует в концентрации в диапазоне примерно 25-75 мг/мл.

14. Состав по п.13, где антитело присутствует в концентрации примерно 50 мг/мл.

15. Состав по любому из пп.1-14, где гистидиновый буфер присутствует в концентрации примерно 25 мМ.

16. Состав по п.15, где гистидиновый буфер содержит L-гистидин и L-гистидин HCl моногидрат.

17. Состав по п.16, где L-гистидин присутствует в концентрации в диапазоне от примерно 16 мМ до примерно 22 мМ, а L-гистидин HCl моногидрат присутствует в концентрации в диапазоне от примерно 4 мМ до примерно 8 мМ.

18. Состав по любому из пп.1-17, где трегалоза присутствует в концентрации примерно 230 мМ.

19. Состав по любому из пп.1-18, который характеризуется осмоляльностью примерно 300 мОсм/кг.

20. Состав по любому из пп.1-19, где менее чем примерно 10% антитела присутствует в виде агрегата в составе.

21. Состав по любому из пп.1-20, который дополнительно содержит наполнитель.

22. Состав по любому из пп.1-21, который является стерильным.

23. Состав по любому из пп.1-22, который стабилен при замораживании и оттаивании.

24. Фармацевтический состав, содержащий:

(a) антитело, содержащее легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в любой из SEQ ID NO: 14-16, и которое присутствует в концентрации примерно 10 мг/мл;

(b) гистидиновый буфер, присутствующий в концентрации примерно 25 мМ;

(c) трегалозу, присутствующую в концентрации примерно 230 мМ;

(d) полисорбат 20, присутствующий в концентрации примерно 0,2 г/л; и

(e) pH примерно 6,5.

25. Состав по п.24, где антитело содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 15.

26. Фармацевтический состав, содержащий:

(a) антитело, которое является антителом 2A4 (номер доступа ATCC PTA-9662), антителом 7D8 (номер доступа ATCC PTA-9468), или химерной или гуманизированной версией антитела 2A4 или антитела 7D8 или ее фрагментом, которые специфично конкурируют с 2A4 или 7D8 за связывание с антигеном, причем антитело присутствует в концентрации в диапазоне от примерно 50 мг/мл до примерно 100 мг/мл;

(b) буфер;

(c) невосстанавливающий сахар; и

(d) неионное поверхностно-активное вещество.

27. Лиофилизированный состав антитела, содержащий:

(a) гуманизированную версию антитела 2A4 (номер доступа ATCC PTA-9662) или антитела 7D8 (номер доступа ATCC PTA-9468) или ее антиген-связывающий фрагмент;

(b) гистидин;

(c) трегалозу; и

(d) полисорбат 20.

28. Лиофилизированный состав по п.27, где при восстановлении состав имеет pH от примерно 6 до примерно 7.

29. Лиофилизированный состав по п.28, где при восстановлении состав имеет pH примерно 6,5.

30. Лиофилизированный состав по п.27, содержащий от примерно 100 мг до примерно 1000 мг антитела.

31. Лиофилизированный состав по п.27, где полисорбат 20 присутствует в концентрации в диапазоне от примерно 0,005% до примерно 0,05% по массе.

32. Лиофилизированный состав по п.27, который обеспечивает возможность восстановления, дающего водный раствор, содержащий:

(a) антитело, содержащее легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в любой одной из SEQ ID NO: 14-16, и которое присутствует в концентрации примерно 10 мг/мл;

(b) гистидиновый буфер, присутствующий в концентрации примерно 25 mM;

(c) трегалозу, присутствующую в концентрации примерно 230 mM;

(d) полисорбат 20, присутствующий в концентрации примерно 0,2 г/л; и

(e) pH примерно 6,5.

33. Лиофилизированный состав по п.32, где лиофилизированный состав содержит примерно 100 мг антитела и обеспечивает возможность восстановления с помощью стерильной воды.

34. Нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую SEQ ID NO: 13.

35. Нуклеиновая кислота по п.34, содержащая нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 19.

36. Нуклеиновая кислота по п.35, содержащая нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 20.

37. Нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую любую одну из SEQ ID NO: 14-16.

38. Нуклеиновая кислота по п.37, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую SEQ ID NO: 15.

39. Нуклеиновая кислота по п.38, содержащая нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 22.

40. Нуклеиновая кислота по п.39, содержащая нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 23.

41. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по любому одному из пп.34-40.

42. Вектор, содержащий нуклеиновые кислоты по пп.34 и 38.

43. Вектор, содержащий нуклеиновые кислоты по пп.35 и 39.

44. Вектор, содержащий нуклеиновые кислоты по пп.36 и 40.

45. Клетка-хозяин, имеющая стабильно встроенную в свой геном нуклеиновую кислоту по любому из пп.34-40.

46. Клетка-хозяин по п.45, где клетка-хозяин является клеткой CHO.

47. Клетка-хозяин по п.45, имеющая стабильно встроенную в свой геном нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую SEQ ID NO: 13, и нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую любую одну из SEQ ID NO: 14-16.

48. Клетка-хозяин по п.38, имеющая стабильно встроенную в свой геном нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую SEQ ID NO: 19, и нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую SEQ ID NO: 22.

49. Клетка-хозяин по п.38, имеющая стабильно встроенную в свой геном нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую SEQ ID NO: 20, и нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую SEQ ID NO: 23.

50. Клетка-хозяин по любому из пп.47-49, где клетка-хозяин является клеткой CHO.

51. Способ получения фармацевтического состава, включающий:

(a) культивирование клеток млекопитающих, имеющих стабильно встроенные в свой геном одну или несколько нуклеиновых кислот, кодирующих легкую и тяжелую цепи гуманизированного антитела 2A4, так что клетки секретируют антитело в клеточную культуральную среду, и очистку антитела из клеточной культуральной среды;

(b) и получение состава по п.1.

52. Способ по п.51, где нуклеиновая кислота, кодирующая легкую цепь гуманизированного 2A4, содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую SEQ ID NO: 13, и где нуклеиновая кислота, кодирующая тяжелую цепь гуманизированного 2A4, содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую любую из SEQ ID NO: 14-16.

53. Способ по п.52, где нуклеиновая кислота, кодирующая легкую цепь гуманизированного 2A4, содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую SEQ ID NO: 13, и где нуклеиновая кислота, кодирующая тяжелую цепь гуманизированного 2A4, содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую SEQ ID NO: 15.

54. Способ по п.53, где нуклеиновая кислота, кодирующая легкую цепь гуманизированного 2A4, содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 19, и где нуклеиновая кислота, кодирующая тяжелую цепь гуманизированного 2A4, содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 22.

55. Способ по п.54, где нуклеиновая кислота, кодирующая легкую цепь гуманизированного 2A4, содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 20, и где нуклеиновая кислота, кодирующая тяжелую цепь гуманизированного 2A4, содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 23.

56. Способ по любому из пп.51-55, дополнительно включающий оценку по меньшей мере одного свойства антитела в составе, выбранного из группы, состоящей из физической стабильности,

химической стабильности и биологической активности.

57. Способ по любому одному из пп.51-55, где клетками млекопитающих являются клетки СНО.

58. Способ терапевтического или профилактического лечения человека, имеющего амилоидоз или имеющего риск его наличия, характеризующийся наличием фибрилл амилоидного белка, который включает введение пациенту эффективной дозы состава по любому из пп.1-33.

59. Способ по п.58, где человек имеет амилоидоз амилоида А, характеризующийся наличием фибрилл амилоидного белка А.

60. Способ по п.59, где состав представляет собой состав по п.25.

61. Способ по п.60, где человек имеет AL-амилоидоз, характеризующийся наличием амилоидных фибрилл из легких цепей.

62. Способ по п.61, где состав представляет собой состав по п.25.

63. Способ по п.61 или 62, где пациент также получает лечение одним или несколькими из мелфалана, бортезомиба, леналидомида или карфилзомиба.

64. Способ по п.63, где пациент получает лечение мелфаланом и/или бортезомибом до лечения составом по любому из пп.1-33.

65. Способ по п.64, где пациент получает лечение мелфаланом и/или бортезомибом одновременно с лечением составом по любому из пп.1-33.

66. Способ по п.64, где пациент получает лечение мелфаланом и/или бортезомибом после лечения составом по любому из пп.1-33.

67. Способ по любому из пп.58-66, где AL-амилоидоз ассоциирован с дискразией В-лимфоцитов.

68. Способ по п.67, где дискразия является злокачественным заболеванием.

69. Способ по п.68, где злокачественным заболеванием является множественная миелома.

70. Способ по любому одному из пп.58-69, где состав вводят многократно.

71. Способ по п.70, где состав вводят с частотой в диапазоне от примерно ежедневной до примерно ежегодной.

72. Способ по п.71, где частота введения находится в диапазоне от примерно каждой второй недели до примерно каждые трех месяцев.

73. Способ по любому из пп.58-72, где состав вводят внутривенно в дозировке в диапазоне от примерно 10 мг до примерно 5000 мг лекарственного вещества гуманизированного антитела 2A4.

74. Способ по п.73, где состав вводят в дозировке в диапазоне от примерно 30 мг до примерно 2500 мг лекарственного вещества гуманизированного антитела 2A4 с частотой в диапазоне от примерно каждые две недели до примерно каждый второй месяц.

75. Способ по п.73 или 74, где состав вводят один раз в месяц.

76. Способ по любому из пп.73-75, где доза составляет примерно 30 мг лекарственного вещества гуманизированного антитела 2A4.

77. Способ по любому из пп.73-75, где доза составляет приблизительно 100 мг лекарственного вещества гуманизированного антитела 2A4.

78. Способ по любому из пп.73-75, где доза составляет примерно 300 мг лекарственного вещества гуманизированного антитела 2A4.

79. Способ по любому из пп.73-75, где доза составляет примерно 1000 мг лекарственного вещества гуманизированного антитела 2A4.

80. Способ по любому из пп.73-75, где доза составляет примерно 2500 мг лекарственного вещества гуманизированного антитела 2A4.

81. Способ терапевтического или профилактического лечения человека, имеющего амилоидоз легких цепей (AL-амилоидоз) или имеющего риск его возникновения, характеризующийся наличием амилоидных фибрилл, отложений или префибриллярных агрегатов, включающий введение пациенту эффективной дозы фармацевтического состава, содержащего:

(a) антитело, содержащее легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в любой из SEQ ID NO: 14-16, и которое присутствует в концентрации примерно 10 мг/мл;

(b) гистидиновый буфер, присутствующий в концентрации примерно 25 мМ;

(c) трегалозу, присутствующую в концентрации примерно 230 мМ;

(d) полисорбат 20, присутствующий в концентрации примерно 0,2 г/л; и

(e) pH около 6,5.

82. Способ по п.81, где дозировка составляет от примерно 0,5 мг/кг до примерно 30 мг/кг антитела, вводимого внутривенно или подкожно с частотой от примерно еженедельной до примерно ежеквартальной.

83. Способ по п.82, где частота введения составляет раз в 28 дней.

84. Способ по п.82, где дозировка составляет от примерно 0,5 мг/кг до примерно 8 мг/кг.

85. Способ по п.82, где дозировка составляет от примерно 8 мг/кг до примерно 30 мг/кг.

86. Фармацевтический продукт, содержащий:

(a) флакон, содержащий примерно 100 мг антитела в виде порошка;

(b) инструкции по восстановлению антитела; и

(c) инструкции по получению восстановленного антитела для инфузии, причем:

(i) антитело содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в любой одной из SEQ ID NO: 14-16; и

(ii) инструкции по восстановлению требуют восстановления с использованием воды для инъекций до экстрагируемого объема 10 мл.

По доверенности

ФИГ. 1А

Вариант 2 тяжелой цепи гуманизированного 2A4 IgG1 (аллотип G1m3):

```
EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFN TYAMYWIRQA PGKGLEWVAR
51  IRSKSNYAI YYADSVKDRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCAR
101 PYSDSFAYWG QGTLVTVSSA STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD
151 YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFP AVLQSSG LYSLSVVTV PSSSLGTQTY
201 ICNVNHKPSN TKVDKRVEPK SCDKTHTCPP CPAPELLGGP SVFLFPPKPK
251 DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS
301 TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV
351 YTLPPSREEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPVL
401 DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPGK
(SEQ ID NO: 15)
```

Каппа-легкая цепь гуманизированного 2A4:

```
DVVMTQSPLS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLV HSTGNTYLHW YLQKPGQSPQ
51  LLIYKVS NRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCSQSTHVP
101 FTFGGGTKVE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK
151 VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE
201 VTHQGLSSPV TKSFNRGEC
(SEQ ID NO: 13)
```

ФИГ. 1В

Вариант 1 тяжелой цепи гуманизированного 2A4 IgG1 (аллотип G1m1):

```
1  EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFN TYAMYWIRQA PGKGLEWVAR
51  IRSKSNNYAI YYADSVKDRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCAR
101 PYSDSFAYWG QGTLVTVSSA STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD
151 YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFP AVLQSSG LYSLSVVTV PSSSLGTQTY
201 ICNVNHKPSN TKVDKRV EPK SCDKTHTCPP CPAPELLGGP SVFLFPPKPK
251 DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS
301 TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV
351 YTLPPSRDEL TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVL
401 DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPGK
(SEQ ID NO: 14)
```

Тяжелая цепь гуманизированного 2A4 IgG2:

```
1  EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFN TYAMYWIRQA PGKGLEWVAR
51  IRSKSNNYAI YYADSVKDRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCAR
101 PYSDSFAYWG QGTLVTVSSA STKGPSVFPL APCSRSTSES TAALGCLVKD
151 YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFP AVLQSSG LYSLSVVTV PSSNFGTQTY
201 TCNVDPHKPSN TKVDKTV ERF CCVECPPCA PPVAGPSVFL FPPKPKDTLM
251 ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE VQFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQFNSTFRV
301 VSVLTVVHQD WLNQKEYKCK VSNKGLPAPI EKTISKTKGQ PREPQVYTLF
351 PSREEMTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPMLDSG
401 SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGK
(SEQ ID NO: 16)
```

ФИГ. 2

VL мышиногo 2A4:

МКLPVRLLVLMFWIPASSSDVVMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSTGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGS
GSGTYFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPFTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 1)

VL мышиногo 7D8:

МКLPVRLLVLMFWIPASSSDVVMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSLSLVHSTGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGS
GSGTYFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPFTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 2)

Мышиная VH (2A4 и 7D8):

MVLGLKWVFFVVFYQGVHCEVQLVESGGRLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTYAMYWIRQAPGKGLEWVARIRSKSNNYAIYYADSVKDRF
TIFRDDSQSMILYLQMNNLKTEDTAMYYCVRPYSDFSAYWGQGTLVTVSA (SEQ ID NO: 3)

ФИГ. 3

Версия 3 VL Hum2A4:

DVVMTQSPSLPVTTPGEPASISCRSSQSLVHSTGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVG
VYYCSQSTHVPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 4)

Версия 3 VH Hum2A4/7D8/8G9:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMYWiRQAPGKGLEWVarIRSKSNNYAIYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLK
TEDTAVYYCARPYSDSFAYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 5)

ФИГ. 4А

кДНК последовательность тяжелой цепи Nu2A4 VH3VL3 hcg1,k:

ATGGAGTTCGGCCTGTCCTGGCTGTTCCCTGGTGGCCATCCTGAAGGGCGTGCAGTGCGAG 60
GTGCAGCTGGTCGAGTCCGGCGGAGGCCTGGTGCAGCCTGGCGGCTCCCTGAGACTGTCC 120
TGCGCCGCCTCCGGCTTCACCTTCAACACCTACGCCATGTACTGGATCAGGCAGGCTCCT 180
GGCAAGGGACTGGAGTGGGTGGCCCGGATCAGGTCCAAGTCCAACAACCTACGCTATCTAC 240
TACGCCGACTCCGTGAAGGACCGGTTACCATCTCCCGGGACGACTCCAAGAACTCCCTG 300
TATCTGCAGATGAACTCCCTGAAAACCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCTCGGCCT 360
TACTCCGACTCCTTCGCCTACTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGTGTCCAGCGCCTCC 420
ACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACA 480
GCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAAC 540
TCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTC 600
TACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATC 660
TGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCT 720
TGTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCA 780
GTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC 840
ACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTG 900
GACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACG 960
TACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTAC 1020
AAGTGCAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCC 1080
AAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACGCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACC 1140
AAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTG 1200
GAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGAC 1260
TCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG 1320
GGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAG 1380
AGCCTCTCCCTGTCCCCGGGTAAATGA 1407

(SEQ ID NO: 23)

ФИГ. 4В

кДНК последовательность легкой цепи Hu2A4 VH3VL3 hcg1,k:

```
ATGGACATGCGGGTGCCCGCACAGCTGCTGGGCCTGCTGATGCTGTGGGTGTCCGGCTCC 60
TCCGGCGACGTGGTGATGACCCAGTCCCCTCTGTCCCTGCCTGTGACCCCTGGCGAGCCT 120
GCCTCCATCTCCTGCCGGTCCTCCCAGTCCCTGGTGCACTCCACCGGCAACACCTATCTG 180
CACTGGTATCTGCAGAAGCCTGGCCAGTCTCCTCAGCTGCTGATCTACAAGGTGTCCAAC 240
CGGTTCTCCGGCGTGCTGACCGGTTCTCTGGCTCCGGCTCCGGCACCGACTTCACCCCTG 300
AAGATCTCCCGGGTGGAGGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTACTGCTCCCAGTCCACCCAC 360
GTGCCTTTCACCTTCGGCGGAGGCACCAAGGTGGAGATCAAGCGAACTGTGGCTGCACCA 420
TCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTG 480
TGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCC 540
CTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTAC 600
AGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCC 660
TGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAG 720
TGTTAG 726
(SEQ ID NO: 20)
```