

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **033643**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2019.11.12

(21) Номер заявки
201591010

(22) Дата подачи заявки
2013.12.03

(51) Int. Cl. **C07K 16/22** (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛО К ЭРИТРОПОЭТИНУ ИЛИ ЕГО АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЙ ФРАГМЕНТ

(31) **61/733,566**

(32) **2012.12.05**

(33) **US**

(43) **2015.10.30**

(86) **PCT/US2013/072915**

(87) **WO 2014/089111 2014.06.12**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
НОВАРТИС АГ (CH)

(72) Изобретатель:
**Гхош Джой (US), Рутц Марк Энтони,
Тиссо-Дагетт Катрин Ульрике (DE),
Сплавски Игорь, Рогуска Майкл (US)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) YANAGIHARA SHIGENIRO ET AL.: "Production of novel anti-recombinant human erythropoietin monoclonal antibodies and development of a sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bioactive human erythropoietin", JOURNAL OF IMMUNOASSAY & IMMUNOCHEMISTRY 2008, vol. 29, no. 2, 2008, pages 181-196, XP009177045, ISSN: 1532-4230, page 187; table 1 page 190; figure 4

WO-A1-9008822

ELLIOTT S. ET AL.: "ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF CONFORMATION

SENSITIVE ANTIERYTHROPOIETIN MONOCLONAL ANTIBODIES: EFFECT OF DISULFIDE BONDS AND CARBOHYDRATE ON RECOMBINANT HUMAN ERYTHROPOIETIN STRUCTURE", BLOOD, AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, US, vol. 87, no. 7, 1 January 1996 (1996-01-01), pages 2714-2722, XP000906831, ISSN: 0006-4971, page 2714; table 1 page 2717; figure 2

ELLIOT ET AL.: "Fine-Structure Epitope Mapping of Antierythropoietin Monoclonal Antibodies Reveals a Model of Recombinant Human Erythropoietin Structure", BLOOD, AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, US, vol. 87, no. 7, 1 April 1996 (1996-04-01), pages 2702-2713, XP002988824, ISSN: 0006-4971 the whole document

JAVEY GOLNAZ ET AL.: "Emerging pharmacotherapies for diabetic macular edema", EXPERIMENTAL DIABETES RESEARCH 2012, vol. 2012, 548732, January 2012 (2012-01), pages 1-12, XP002722022, ISSN: 1687-5303 the whole document

WATANABE D. ET AL.: "Erythropoietin as a retinal angiogenic factor in proliferative diabetic retinopathy", NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, THE MASSACHUSETTS MEDICAL SOCIETY, WALTHAM, MA, US, vol. 353, no. 8, 25 August 2005 (2005-08-25), pages 782-792, XP002627481, ISSN: 0028-4793, DOI: 10.1056/NEJMOA041773 the whole document

WO-A1-2013169734

(57) Изобретение относится к композициям и способам для ингибирования ЭПО. Изобретение относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые связываются с ЭПО и способны ингибировать ЭПО-зависимую клеточную пролиферацию и/или ЭПО-зависимый клеточный сигнальный путь.

033643 B1

033643 B1

Предпосылки создания изобретения

Диабетическая ретинопатия (ДР) является наиболее частым осложнением у больных сахарным диабетом. Диабетический макулярный отек (ДМО) может возникать на любой стадии ДР и является основной причиной потери зрения у пациентов с ДР. Известно, что после 10 лет наблюдения больных сахарным диабетом 1 типа заболеваемость ДМО составляет 20,1%, у больных инсулинозависимым сахарным диабетом 2 типа заболеваемость ДМО составляет 25,4%, и у больных инсулинонезависимым сахарным диабетом 2 типа заболеваемость ДМО составляет 13,9% (Klein et al. (1995) *Ophthalmology* 102, 7-16). Новаторское изучение ДР - многоцентровое исследование по изучению раннего лечения диабетической ретинопатии ETDRS ((1985) Photocoagulation for Diabetic Macular Edema - Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Report.1. *Archives of Ophthalmology* 103, 1796-1806) показало, что несмотря на снижение риска умеренной потери зрения при ДМО глаз с помощью лазерной фотокоагуляционной терапии приблизительно на 50% в течение 3 лет, улучшение зрения выявлено только в нескольких глазах, а в некоторых глазах потеря зрения продолжалась даже после интенсивного лечения. Современный прогресс в области фармакотерапии и доставки лекарственных средств в глаза показал перспективность в лечении ДМО. В исследовании RESTORE, которое является одним из двух базовых клинических испытаний фазы III при ДМО (Mitchell et al. (2011) *Ophthalmology* 118, 615-625), было показано, что результаты применения Луцентиса® (Lucentis®) превосходят эффект лазерной монотерапии. В группе Луцентиса® среднее изменение наибольшей остроты зрения с коррекцией (BCVA), которая была основной конечной клинической целью, было значительно улучшено (буквы +6,1 в группе Луцентиса® по сравнению с буквами +0,8 в группе лазерной терапии, $p < 0,0001$). Похожие полезные эффекты были показаны с препаратами VEGF Trap-Eye (Regeneron Inc. Нью-Йорк, США) и Озурдекс (Ozurdex®, интравитреальный имплантат дексаметазона, Allergan Inc., Калифорния, США) (Do et al. (2011) *Ophthalmology* 118, 1819-1826; Haller et al. (2010) *Archives of Ophthalmology* 128, 289-296). Вместе с тем, в 16% глаз, получавших лечение Озурдексом, наблюдалось повышение внутриглазного давления, что является риском развития глаукомы.

Несмотря на указанные новые возможности лечения ДМО, остается существенная неудовлетворенная потребность с точки зрения медицины. В базовых клинических исследованиях Луцентиса® после 12 месяцев лечения приблизительно в 25% глаз не было достигнуто какого-либо восстановления остроты зрения, и приблизительно 50% глаз остались с остротой зрения 20/40 или хуже. Полногеномные исследования ассоциаций показали, что больные диабетом, являющиеся гомозиготными по полиморфизму (Т) промотора эритропоэтина (ЭПО), имеют риск развития пролиферативной ДР в 2,17 раза выше (Tong et al. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105, 6998-7003). Интересно, что люди с аллелем промотора Т для ЭПО имеют приблизительно в 7,5 раз более высокую концентрацию витреального ЭПО по сравнению с людьми с аллелем G (Tong et al. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105, 6998-7003).

Таким образом, остается необходимость в разработке эффективного лечения диабетической ретинопатии, в частности ДМО, которое заменит или дополнит имеющиеся способы лечения.

Сущность изобретения

Изобретение относится к антителам или антигенсвязывающим фрагментам, как описано в настоящем документе, которые связываются с ЭПО и/или дарбопоэтином.

Описанные в изобретении выделенные антитела или антигенсвязывающие фрагменты связываются с ЭПО и/или с дарбопоэтином с константой диссоциации K_D , значение которой меньше или равно 100 пМ. Например, описанные в изобретении выделенные антитела или антигенсвязывающие фрагменты могут связываться с ЭПО человека и/или с дарбопоэтином с K_D , значение которой меньше или равно 50 пМ, меньше или равно 40 пМ, меньше или равно 35 пМ, меньше или равно 30 пМ, меньше или равно 25 пМ, меньше или равно 20 пМ, меньше или равно 15 пМ, меньше или равно 14 пМ, меньше или равно 13 пМ, меньше или равно 12 пМ, меньше или равно 11 пМ, меньше или равно 10 пМ. Более конкретно, как описано в изобретении, выделенные антитела или антигенсвязывающие фрагменты также могут связываться с ЭПО человека с K_D , значение которой, как измерено с помощью Вiasoge, меньше или равно 35 пМ, или, как измерено с помощью раствора равновесного титрования (SET), меньше или равно 6 пМ. Более конкретно, как описано в изобретении, выделенные антитела или антигенсвязывающие фрагменты также могут связываться с дарбопоэтином с K_D , значение которой, как измерено с помощью Вiasoge, меньше или равно 24 пМ, или, как измерено с помощью SET, меньше или равно 4 пМ.

Настоящее изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые связываются с ЭПО человека, мыши и/или крысы или с ЭПО обезьян циномоглус. Изобретение также относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые связываются с конформационным эпитопом, содержащим аминокислоты, выбранные из спирали D и петли А-В ЭПО человека. Изобретение дополнительно относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые связываются с конформационным эпитопом, содержащим аминокислоты, выбранные из спирали D, петли А-В и спирали А ЭПО человека. В конкретных аспектах изобретения выделенные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут связываться с доменом спирали D в ЭПО (аминокислоты 138-162 ЭПО человека, SEQ ID NO: 88). В других аспектах описанные в изобретении выделенные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут связываться с доме-

ном петли А-В (аминокислоты 27-55 ЭПО человека, SEQ ID NO: 89). В других аспектах описанные в изобретении выделенные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут связываться с доменом петли АВ (аминокислоты 27-55 ЭПО человека, SEQ ID NO: 89) и спирали А (аминокислоты 4-26 ЭПО человека, SEQ ID NO: 86). В других аспектах описанные в изобретении выделенные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут связываться с доменом спирали D из ЭПО (аминокислоты 138-162 ЭПО человека, SEQ ID NO: 88) и доменом петли А-В (аминокислоты 27-55 ЭПО человека, SEQ ID NO: 89). В других аспектах описанные в изобретении выделенные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут связываться с доменом спирали D из ЭПО (аминокислоты 138-162 ЭПО человека, SEQ ID NO: 88) и спирали А (аминокислоты 4-26 ЭПО человека, SEQ ID NO: 86). В дополнительных аспектах изобретения описанные выделенные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут связываться с доменом спирали D из ЭПО (аминокислоты 138-162 ЭПО человека, SEQ ID NO: 88), с доменом петли А-В (аминокислоты 27-55 ЭПО человека, SEQ ID NO: 89) и спирали А (аминокислоты 4-26 ЭПО человека, SEQ ID NO: 86).

Настоящее изобретение также относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые связываются с конформационным эпитопом на ЭПО, содержащим аминокислотные остатки Thr44, Lys45, Val46, Asn47, Phe48, Tyr49, Ala50, Lys52, Arg53, Asn147, Arg150, Gly151, Lys154, Leu155, Glu159 и Arg162 ЭПО человека (SEQ ID NO: 81). Настоящее изобретение также относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые связываются с конформационным эпитопом на ЭПО, содержащим аминокислотные остатки Ser9, Gln13, Thr44, Lys45, Val46, Asn47, Phe48, Tyr49, Ala50, Lys52, Arg53, Asn147, Arg150, Gly151, Lys154, Leu155, Gly158, Glu159 и Arg162 ЭПО человека (SEQ ID NO: 81). Настоящее изобретение дополнительно относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые связываются с конформационным эпитопом на ЭПО, содержащим аминокислотные остатки Glu23, Asp43, Thr44, Lys45, Val46, Asn47, Phe48, Tyr49, Ala50, Lys52, Arg53, Arg131, Arg143, Asn147, Arg150, Gly151, Lys154, Leu155, Glu159 и Arg162 ЭПО человека (SEQ ID NO: 81).

Настоящее изобретение также относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые связываются с ЭПО и дополнительно конкурируют за связывание с антителом, как описано в табл. 1. Настоящее изобретение также дополнительно относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые связываются с тем же эпитопом, что и антителом, как описано в табл. 1.

Настоящее изобретение также относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые связываются с ЭПО и имеют изоэлектрическую точку (pI) с показателем больше 8,2, больше 8,3, больше 8,4, больше 8,5 или больше 9,0.

Выделенные антитела или антигенсвязывающие фрагменты, описанные в изобретении, могут также связываться с ЭПО обезьян циномоглус, с ЭПО мыши и/или с ЭПО крысы с K_D , значение которой меньше или равно 100 пМ, меньше или равно 80 пМ, меньше или равно 70 пМ, меньше или равно 60 пМ, меньше или равно 50 пМ, меньше или равно 40 пМ, меньше или равно 35 пМ, меньше или равно 30 пМ, меньше или равно 25 пМ, меньше или равно 20 пМ, меньше или равно 15 пМ, меньше или равно 10 пМ, меньше или равно 5 пМ, меньше или равно 4 пМ, меньше или равно 3 пМ, меньше или равно 2 пМ, меньше или равно 1 пМ. Более конкретно, описанные в изобретении выделенные антитела или антигенсвязывающие фрагменты могут также связываться с ЭПО обезьян циномоглус, с ЭПО мыши и/или с ЭПО крысы с K_D , значение которой меньше или равно 80 пМ, как измерено с помощью Biacore, или меньше или равно 40 пМ, как измерено с помощью SET. Более конкретно, описанные в изобретении выделенные антитела или антигенсвязывающие фрагменты также могут связываться с ЭПО обезьян циномоглус с K_D , значение которой меньше или равно 80 пМ, как измерено с помощью Biacore, или меньше или равно 8 пМ, как измерено с помощью SET. Более конкретно, описанные в изобретении выделенные антитела или антигенсвязывающие фрагменты также могут связываться с ЭПО мыши с K_D , значение которой меньше или равно 45 пМ, как измерено с помощью Biacore, или меньше или равно 37 пМ, как измерено с помощью SET. Более конкретно, описанные в изобретении выделенные антитела или антигенсвязывающие фрагменты также могут связываться с ЭПО крысы с K_D , значение которой меньше или равно 57 пМ, как измерено с помощью Biacore, или меньше или равно 13 пМ, как измерено с помощью SET.

Аффинность связывания описанных в изобретении выделенных антител и антигенсвязывающих фрагментов может быть определена с помощью SET. Способы с использованием SET известны в данной области и описаны более подробно ниже. Кроме того, аффинность связывания описанных в изобретении выделенных антител или фрагментов может быть определена с помощью анализа Biacore. Методики кинетических анализов Biacore известны в данной области и описаны более подробно ниже.

Выделенные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, как описано в изобретении, могут быть использованы для ингибирования ЭПО-зависимой клеточной пролиферации при IC_{50} , значение которой меньше или равно 350 пМ, меньше или равно 300 пМ, меньше или равно 250 пМ, меньше или равно 200 пМ, меньше или равно 190 пМ, меньше или равно 180 пМ, меньше или равно 175 пМ, меньше или равно 170 пМ, меньше или равно 160 пМ, меньше или равно 150 пМ, меньше или равно 125 пМ, меньше или

равно 115 пМ, меньше или равно 110 пМ, меньше или равно 100 пМ, меньше или равно 90 пМ или меньше или равно 80 пМ. Более конкретно, описанное в изобретении выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут ингибировать ЭПО-зависимую клеточную пролиферацию, которую измеряют *in vitro* с помощью анализа пролиферации Ва/Ф3-ЕрoR клеток при IC₅₀, значение которой меньше или равно 338 пМ, меньше или равно 183 пМ, меньше или равно 175 пМ, меньше или равно 174 пМ, меньше или равно 145 пМ, меньше или равно 112 пМ, меньше или равно 89 пМ или меньше или равно 74 пМ.

Выделенные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, описанные в изобретении, могут быть использованы для ингибирования ЭПО-зависимой клеточной пролиферации в В-клетках. Более конкретно, описанные в изобретении выделенные антитела и антигенсвязывающие фрагменты могут быть использованы для ингибирования ЭПО-зависимой клеточной пролиферации в В-клетках мыши. Например, выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут ингибировать ЭПО-зависимую клеточную пролиферацию, которую измеряют *in vitro* с помощью анализа пролиферации Ва/Ф3-ЕрoR клеток при IC₅₀, значение которой меньше или равно 350 пМ, меньше или равно 300 пМ, меньше или равно 250 пМ, меньше или равно 200 пМ, меньше или равно 175 пМ, меньше или равно 150 пМ, меньше или равно 125 пМ, меньше или равно 115 пМ, меньше или равно 110 пМ, меньше или равно 100 пМ, меньше или равно 90 пМ или меньше или равно 80 пМ. Более конкретно, описанные в изобретении выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут ингибировать ЭПО-зависимую клеточную пролиферацию, которую измеряют *in vitro* с помощью анализа пролиферации Ва/Ф3-ЕрoR клеток при IC₅₀, значение которой меньше или равно 338 пМ, меньше или равно 174 пМ, меньше или равно 112 пМ или меньше или равно 74 пМ.

Выделенные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, описанные в изобретении, могут быть использованы для ингибирования ЭПО-зависимой клеточной пролиферации В-клеток человека. Например, выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут ингибировать ЭПО-зависимую клеточную пролиферацию, как измерено *in vitro* с помощью анализа пролиферации клеток F36E при значении IC₅₀, которое меньше или равно 200 пМ, меньше или равно 190 пМ, меньше или равно 180 пМ, меньше или равно 170 пМ, меньше или равно 160 пМ, меньше или равно 150 пМ, меньше или равно 125 пМ, меньше или равно 100 пМ, или меньше или равно 90 пМ. Более конкретно, описанное в изобретении выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут ингибировать ЭПО-зависимую клеточную пролиферацию, которую измеряют *in vitro* с помощью анализа пролиферации F36E клеток при IC₅₀, значение которой меньше или равно 183 пМ, меньше или равно 175 пМ, меньше или равно 145 пМ, или меньше или равно 89 мкМ.

Выделенные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты также могут блокировать связывание ЭПО с рецептором ЭПО и/или предотвращать связывание ЭПО на поверхности клетки.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые специфично связываются с ЭПО обезьян циномоглус, с ЭПО человека, мыши и/или крысы. В дополнительном аспекте упомянутое выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурируют за связывание с антителом или с его антигенсвязывающим фрагментом, как описано в табл. 1.

Выделенные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, как описано в изобретении, могут представлять собой моноклональные антитела, антитела человека или гуманизированные антитела, химерные антитела, одноцепочечные антитела, Fab-фрагменты, Fv-фрагменты, F(ab')₂-фрагменты или ScFv фрагменты, и/или IgG изотипы.

Выделенные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, как описано в изобретении, могут также включать каркас, при этом в каркасе антитела была замещена аминокислота, из соответствующих последовательностей цепи VH или VL человека зародышевой линии.

В другом аспекте настоящее изобретение включает выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, имеющие полноразмерные тяжелые и легкие цепи последовательностей Fab, как описано в табл. 1. Более конкретно, выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут иметь последовательности тяжелых и легких цепей от Fab NVS1, NVS2, NVS3 или NVS4.

Еще в одном аспекте настоящее изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту с последовательностью переменных доменов тяжелых и легких цепей Fab, как описано в табл. 1. Более конкретно, выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут иметь последовательности переменных доменов тяжелых и легких цепей Fab NVS1 (SEQ ID NO: 13 и 14 соответственно), NVS2 (SEQ ID NO: 33 и 34 соответственно), NVS3 (SEQ ID NO: 53 и 54 соответственно) или NVS4 (SEQ ID NO: 73 и 74 соответственно).

Изобретение также относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые включают область, определяющую комплементарность CDR1 тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 21, 41 и 61; CDR2 тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 22, 42 и 62; и CDR3 тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, 23, 43 и 63, при этом выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с ЭПО человека. В другом аспекте упомянутое выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент

дополнительно содержат CDR1 легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 24, 44 и 64; CDR2 легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 25, 45 и 65; и CDR3 легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 26, 46 и 66.

Изобретение также относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые включают CDR1 легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 24, 44 и 64; CDR2 легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 25, 45 и 65; и CDR3 легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 26, 46 и 66, при этом выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с ЭПО человека.

Изобретение также относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые связываются с ЭПО, имеющим HCDR1, HCDR2, HCDR3 и LCDR1, LCDR2, LCDR3, при этом HCDR1, HCDR2, HCDR3 содержит SEQ ID NO: 1, 2, 3 и LCDR1, LCDR2, LCDR3 содержит SEQ ID NO: 4, 5, 6; или HCDR1, HCDR2, HCDR3 содержит SEQ ID NO: 21, 22, 23, и LCDR1, LCDR2, LCDR3 содержит SEQ ID NO: 24, 25, 26; или HCDR1, HCDR2, HCDR3 содержит SEQ ID NO: 41, 42, 43 и LCDR1, LCDR2, LCDR3 содержит SEQ ID NO: 44, 45, 46; или HCDR1, HCDR2, HCDR3 содержит SEQ ID NO: 61, 62, 63 и LCDR1, LCDR2, LCDR3 содержит SEQ ID NO: 64, 65, 66.

Настоящее изобретение также относится к антителу или к его антигенсвязывающему фрагменту, имеющим HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в вариательной тяжелой цепи SEQ ID NO: 13, 33, 53 или 73, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в вариательной легкой цепи SEQ ID NO: 14, 34, 54 или 74, согласно определению по Chothia. В другом аспекте настоящего изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут иметь HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в последовательности вариательного домена тяжелой цепи SEQ ID NO: 13, 33, 53 или 73, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в последовательности вариательного домена легкой цепи SEQ ID NO: 14, 34, 54 или 74, согласно определению по Kabat.

В одном из аспектов настоящего изобретения выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат последовательность вариательного домена тяжелой цепи (VH), выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, 33, 53 и 73. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно могут содержать последовательность вариательного домена (VL) легкой цепи, при этом объединяются вариательный домен тяжелой цепи и вариательный домен легкой цепи с образованием сайта связывания антигена для ЭПО. В частности, последовательность вариательного домена легкой цепи может быть выбрана из SEQ ID NO: 14, 34, 54 и 74, при этом указанное выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с ЭПО.

Изобретение также относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые включают последовательность вариательного домена легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 34, 54 и 74, при этом выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с ЭПО человека. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут дополнительно содержать последовательность вариательного домена тяжелой цепи, при этом объединяются вариательный домен легкой цепи и вариательный домен тяжелой цепи с образованием сайта связывания антигена для ЭПО.

В частности, выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с ЭПО, могут иметь вариательные домены тяжелой и легкой цепей, содержащие последовательности SEQ ID NO: 13 и 14, 33 и 34, 53 и 54 или 73 и 74, соответственно.

Настоящее изобретение дополнительно относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые включают вариательный домен тяжелой цепи, содержащий последовательности, по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичные последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, 33, 53 и 73, при этом указанное антитело связывается с ЭПО. В одном из аспектов выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент также включают вариательный домен легкой цепи, имеющий идентичность последовательности, которая составляет по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% к последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 34, 54 и 74. В другом аспекте настоящего изобретения выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеют HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 согласно определению по Kabat и согласно описанию в табл. 1. Также предполагается, что HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 могут быть определены по Chothia и соответствовать описанию в табл. 1.

Изобретение также относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, имеющим вариательный домен легкой цепи, который имеет последовательность, по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 34, 54 и 74, при этом указанное антитело связывается с ЭПО.

В другом аспекте настоящего изобретения выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с ЭПО, могут иметь тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO: 15, 35, 55 или 75. Выделенное антитело может также включать легкую цепь, которая может быть комбинирована с тяжелой цепью с образованием сайта связывания антигена для ЭПО человека. В частности, легкая цепь может иметь последовательность, содержащую SEQ ID NO: 16, 36, 56 или 76. В частности, выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с ЭПО,

могут иметь тяжелую цепь и легкую цепь, содержащую последовательности SEQ ID NO: 15 и 16, 35 и 36, 55 и 56 или 75 и 76 соответственно.

Изобретение также относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые включают тяжелую цепь, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15, 35, 55 и 75, при этом указанное антитело связывается с ЭПО. В одном из аспектов выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент также включают легкую цепь, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 36, 56 и 76.

Изобретение дополнительно относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые включают легкую цепь, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 36, 56 и 76, при этом указанное антитело связывается с ЭПО.

Изобретение также относится к композициям, содержащим выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению. При этом композиции антитела представлены в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем. В частности, изобретение дополнительно включает фармацевтические композиции, содержащие антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, как показано в табл. 1, такие как, например, антитела NVS1, NVS2, NVS3 или NVS4. Изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим комбинацию двух или больше выделенных антител или их антигенсвязывающих фрагментов, приведенных в табл. 1.

Изобретение также относится к выделенной последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей вариабельную тяжелую цепь, которая имеет последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 13, 33, 53 и 73. В частности, такая нуклеиновая кислота идентична по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 17, 37, 57 и 77. В другом аспекте настоящего изобретения эта последовательность представляет собой SEQ ID NO: 17, 37, 57 или 77.

Настоящее изобретение также относится к выделенной последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей вариабельную легкую цепь, которая имеет последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 14, 34, 54 и 74. В частности, такая нуклеиновая кислота идентична по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, 38, 58 и 78. В другом аспекте настоящего изобретения последовательность представляет собой SEQ ID NO: 18, 38, 58 или 78.

Настоящее изобретение также относится к выделенной нуклеиновой кислоте, содержащей последовательность, кодирующую полипептид, которая включает вариабельный домен легкой цепи и идентична по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, 38, 58 и 78.

Настоящее изобретение также относится к вектору, который содержит одну или несколько молекул нуклеиновых кислот, описанных в изобретении.

Изобретение также относится к выделенной клетке-хозяину, которая содержит одну или несколько молекул нуклеиновых кислот или векторов, описанных в изобретении. Изобретение также относится к выделенной клетке-хозяину, которая содержит рекомбинантную последовательность ДНК, кодирующую тяжелую цепь описанного выше антитела, и вторую рекомбинантную последовательность ДНК, кодирующую легкую цепь описанного выше антитела, при этом указанные последовательности ДНК функционально связаны с промотором и способны экспрессироваться в клетке-хозяине. Следует понимать, что указанное антитело может представлять собой моноклональное антитело человека. Также предполагается, что клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающих, отличную от клетки человека, например клетку CHO.

Настоящее изобретение также относится к способу ингибирования ЭПО-зависимой клеточной пролиферации, при этом указанный способ включает стадию приведения в контакт ЭПО (например, контактирование ЭПО в организме индивида) с эффективным количеством композиции, содержащей выделенное антитело или его антигенсвязывающие фрагменты, как описано в изобретении; в частности, композиция может содержать антитело NVS1, NVS2, NVS3 или NVS4. В одном из аспектов этот способ предусматривает приведение в контакт клетки (например, клетки, содержащей ЭПО) с композицией, содержащей выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, по изобретению. Изобретение также относится к композиции, содержащей описанное в изобретении выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, для применения в целях ингибирования ЭПО-зависимой клеточной пролиферации у индивида. Следует понимать, что клетка является клеткой человека. Дополнительно предполагается, что клетка находится в организме индивида. Также следует понимать, что клетка находится в глазу индивида. Дополнительно предполагается, что индивидом является человек.

Изобретение также относится к способу ингибирования ЭПО-зависимого клеточного сигнального пути, при этом указанный способ предусматривает стадию приведения в контакт ЭПО с эффективным количеством композиции, содержащей выделенное антитело или его антигенсвязывающие фрагменты, как описано в изобретении, в целях предотвращения взаимодействия ЭПО с рецептором на клеточной

поверхности. В одном из аспектов способ предусматривает приведение в контакт клетки, содержащей ЭПО, с композицией, содержащей выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, как описано в изобретении. Изобретение также относится к композиции, содержащей выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, как описано в изобретении, для ингибирования ЭПО-зависимого клеточного сигнального пути у индивида. Следует понимать, что клетка является клеткой человека. Дополнительно предполагается, что клетка находится в организме индивида. Также следует понимать, что клетка находится в глазу индивида. Дополнительно предполагается, что индивидом является человек.

Настоящее изобретение также относится к способу ингибирования ЭПО-зависимой клеточной пролиферации или сигнального пути, при этом указанный способ предусматривает стадию приведения в контакт ЭПО с эффективным количеством композиции, содержащей выделенное антитело или его антигенсвязывающие фрагменты, как описано в изобретении, для предотвращения взаимодействия ЭПО с рецептором на поверхности клетки. Следует понимать, что клетка представляет собой В-клетку. Следует понимать, что клетка является клеткой человека.

Изобретение также относится к способу ингибирования связывания ЭПО с ЭПО-рецептором, при этом указанный способ предусматривает стадию приведения в контакт ЭПО (например, контактирование ЭПО в организме индивида) с эффективным количеством композиции, содержащей выделенное антитело или его антигенсвязывающие фрагменты, как описано в изобретении; в частности, композиция может содержать антитело NVS1, NVS2, NVS3 или NVS4. Изобретение также относится к композиции, содержащей выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, как описано в изобретении, для ингибирования связывания ЭПО с ЭПО-рецептором на клетке индивида; в частности, композиция может содержать антитело NVS1, NVS2, NVS3 или NVS4. Следует понимать, что клетка является клеткой человека. Дополнительно предполагается, что клетка расположена в организме индивида. Также следует понимать, что клетка находится в глазу индивида. Дополнительно предполагается, что индивидом является человек.

Изобретение также относится к способу ингибирования связывания ЭПО с клеткой, при этом указанный способ предусматривает стадию приведения в контакт ЭПО (например, в организме индивида) с эффективным количеством композиции, содержащей выделенное антитело или его антигенсвязывающие фрагменты, как описано в изобретении; в частности композиция может содержать антитело NVS1, NVS2, NVS3 или NVS4. В одном из аспектов способ предусматривает приведение в контакт клетки (например, клетки, которая содержит ЭПО) с композицией, содержащей выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, как описано в изобретении. Изобретение также относится к композиции, содержащей выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, как описано в изобретении, для ингибирования связывания ЭПО в клетке у индивида. В одном из аспектов предполагается, что клетка является клеткой человека. Дополнительно предполагается, что клетка расположена в организме индивида. Также следует понимать, что клетка находится в глазу индивида. Дополнительно предполагается, что индивидом является человек.

Изобретение также относится к способу лечения макулярного отека у индивида, при этом указанный способ включает стадию введения индивиду эффективного количества композиции, содержащей антитело или его антигенсвязывающие фрагменты, как описано в изобретении; в частности композиция может содержать антитело NVS1, NVS2, NVS3 или NVS4. Изобретение также относится к композиции, содержащей антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, как описано в изобретении, для лечения макулярного отека у индивида. В одном из аспектов макулярный отек связан с сосудистым заболеванием сетчатки. Следует понимать, что сосудистое заболевание сетчатки, связанное с макулярным отеком, может включать диабетическую ретинопатию, диабетический макулярный отек, пролиферативную диабетическую ретинопатию, непролиферативную диабетическую ретинопатию, возрастную макулярную дегенерацию, окклюзию вен сетчатки, мультифокальный хориоидит, миопическую хориоидальную неоваскуляризацию или ретинопатию недоношенных. Также предполагается, что индивидом является человек.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения состояния или расстройства, связанного с заболеванием сосудов сетчатки у индивида, при этом указанный способ включает стадию введения индивиду эффективного количества композиции, содержащей антитело или его антигенсвязывающие фрагменты, как описано в изобретении; в частности композиция может содержать антитело NVS1, NVS2, NVS3 или NVS4. Изобретение также относится к композиции, содержащей антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению, для лечения состояния или расстройства, связанного с заболеванием сосудов сетчатки у индивида. В одном из аспектов предполагается, что состоянием или расстройством, связанным с болезнью сосудов сетчатки, является диабетическая ретинопатия. В другом аспекте предполагается, что состояние или заболевание представляет собой возрастную макулярную дегенерацию. Дополнительно предполагается, что состояние или расстройство, связанное с заболеванием сосудов сетчатки, может представлять собой окклюзию вен сетчатки, мультифокальный хориоидит, миопическую хориоидальную неоваскуляризацию или ретинопатию недоношенных. Также предполагается, что индивидом является человек.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения состояния или расстройства, связанного с диабетической ретинопатией у индивида, при этом указанный способ включает стадию введения инди-

виду эффективного количества композиции, содержащей антитело или его антигенсвязывающие фрагменты, как описано в изобретении; в частности композиция может содержать антитело NVS1, NVS2, NVS3 или NVS4. Изобретение также относится к композиции, содержащей антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, по изобретению, для лечения состояния или расстройства, связанного с диабетической ретинопатией у индивида. Следует понимать, что индивидом является человек.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения состояния или расстройства, связанного с макулярным отеком, у индивида, при этом указанный способ включает стадию введения индивиду эффективного количества композиции, содержащей антитело или его антигенсвязывающие фрагменты, как описано в изобретении; в частности композиция может содержать антитело NVS1, NVS2, NVS3 или NVS4. Изобретение также относится к композиции, содержащей антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, по изобретению, для лечения состояния или расстройства, связанного с макулярным отеком у индивида. Кроме того, предполагается, что состояние или расстройство, связанное с макулярным отеком, представляет собой диабетический макулярный отек. Также предполагается, что индивидом является человек.

Изобретение также относится к способу лечения пролиферативной диабетической ретинопатии у индивида, при этом указанный способ включает стадию введения индивиду эффективного количества композиции, содержащей антитело или его антигенсвязывающие фрагменты, как описано в изобретении; в частности композиция может содержать антитело NVS1, NVS2, NVS3 или NVS4. Изобретение также относится к композиции, содержащей антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, по изобретению, для лечения пролиферативной диабетической ретинопатии у индивида. Дополнительно предполагается, что композиция вводится в глаз индивида, при этом композиция уменьшает расширение вен сетчатки, уменьшает протекание жидкости через сосуды и/или увеличивает приток крови в глаз. Также предполагается, что индивидом является человек.

Любое из вышеуказанных выделенных антител или их антигенсвязывающих фрагментов может представлять собой моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

Определения.

Если не указано иное, то все технические и научные термины, используемые в изобретении, имеют такое же значение, которое обычно понимается специалистами в данной области, к которой относится настоящее изобретение.

Термин "антитело", используемый в изобретении, означает целое антитело и любой антигенсвязывающий фрагмент (т.е. "антигенсвязывающий участок") или его одинарную цепь. Целое антитело представляет собой гликопротеин, содержащий по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, связанные между собой дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь состоит из вариательной области тяжелой цепи (сокращенно обозначенной в изобретении как VH) и константной области тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов, CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь состоит из вариательной области легкой цепи (сокращенно обозначенной в изобретении как VL) и константной области легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена CL. Области VH и VL могут дополнительно подразделяться на участки гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), которые перемежаются с участками, являющимися более консервативными, которые называются каркасными областями (FR). Каждая область VH и VL состоит из трех участков CDR и четырех участков FR, расположенных от аминоконца к карбоксиконцу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Вариательные области тяжелой и легкой цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями-хозяевами или с факторами, включающими различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классической системы комплемента.

Термины "антигенсвязывающий участок" или "антигенсвязывающий фрагмент" антитела, используемые в изобретении, относятся к одному или нескольким фрагментам интактного антитела, которые сохраняют способность к специфичному связыванию с заданным антигеном (например, с эритропоэтином, ЭПО). Антигенсвязывающие функции антитела могут осуществляться фрагментами интактного антитела. Примеры связывающих фрагментов, которые входят в термины "антигенсвязывающий участок" или "антигенсвязывающий фрагмент" антитела, включают моновалентный фрагмент Fab, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1, бивалентный фрагмент F(ab)₂, содержащий два Fab-фрагмента, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области, Fd-фрагмент, состоящий из доменов VH и CH1, Fv-фрагмент, состоящий из доменов VL и VH одного плеча антитела, фрагмент однодоменного антитела (dAb) (Ward et al., 1989 Nature 341: 544-546), состоящий из домена VH или домена VL, и выделенную область, определяющую комплементарность (CDR).

Дополнительно, несмотря на то, что два домена Fv-фрагмента, VL и VH, кодируются отдельными генами, они могут быть соединены с помощью рекомбинантных способов, с использованием искусственного пептидного линкера, что дает возможность создавать их в виде одиночной белковой цепи, в которой области VL и VH спарены с образованием моновалентных молекул (известных как одноцепочечный Fv (ScFv), см., например, Bird et al., 1988 Science 242:423-426; и Huston et al., 1988 Proc. Natl. Acad.

Sci. 85:5879-5883). Такие одноцепочечные антитела включают один или несколько антигенсвязывающих участков или фрагментов антитела. Эти фрагменты антител получают с использованием общепринятых способов, известных специалистам в данной области, и скрининг этих фрагментов на полезность проводят таким же образом, как и скрининг интактных антител.

Антигенсвязывающие фрагменты могут быть также включены в однодоменные антитела, максите-ла, мините-ла, интрите-ла, диате-ла, триате-ла, тетрате-ла, v-NAR и бис-ScFv (см., например, Hollinger and Hudson, 2005, Nature Biotechnology, 23, 9, 1126-1136).

Антигенсвязывающие участки антител могут быть имплантированы в каркасы на полипептидной основе, такой как фибронектин типа III (Fn3) (см. патент США № 6703199, в котором описаны фибро-нектиновые полипептидные моноките-ла).

Антигенсвязывающие фрагменты могут быть введены в одноцепочечные молекулы, содержащие пару tandemных Fv-сегментов (VH-CH1-VH-CH1), которые вместе с комплементарными полипептидами легкой цепи образуют пару антигенсвязывающих областей (Zapata et al., 1995 Protein Eng. 8 (10): 1057-1062, и патент США № 5641870).

Используемый в изобретении термин "аффинность" относится к силе взаимодействия между анти-телом и антигеном в одиночных антигенных сайтах. В каждом антигенном сайте вариабельная область "плеча" антитела взаимодействует с антигеном посредством слабых нековалентных сил на многочислен-ных сайтах; чем больше взаимодействий, тем сильнее аффинность. Используемый в изобретении термин "высокая аффинность" антитела или его антигенсвязывающего фрагмента (например, Fab-фрагмента) обычно относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые имеют K_D 10^{-9} М или меньше.

Термин "аминокислота" относится к природным и синтетическим аминокислотам, а также к амино-кислотным аналогам и аминокислотным миметикам, которые функционируют аналогично природным аминокислотам. Встречающиеся в природе аминокислоты представляют собой аминокислоты, кодируе-мые генетическим кодом, а также аминокислоты, которые подверглись модификации, например, гидро-ксипролин, γ -карбоксихлутамат и O-фосфосерин. Аминокислотные аналоги относятся к соединениям, которые имеют такую же основную химическую структуру, как и природная аминокислота, т.е. α -углерод, который связан с водородом, карбоксильной группой, аминогруппой и R-группой, например гомосерин, норлейцин, метионин-сульфоксид, метионин-метилсульфоний. Такие аналоги имеют моди-фицированные R-группы (например, норлейцин) или модифицированные пептидные каркасы, но сохра-няют ту же основную химическую структуру, как и природная аминокислота. Аминокислотные мимети-ки относятся к химическим соединениям, которые имеют структуру, отличающуюся от общей химиче-ской структуры аминокислоты, но при этом функционируют подобно природным аминокислотам.

Термин "специфичность связывания", используемый в изобретении, относится к способности цен-тра связывания отдельного антитела реагировать только с единственной антигенной детерминантой.

Выражение "специфично (или селективно) связывается" с антителом (например, с ЭПО-связывающим антителом) относится к реакции связывания, которая является определяющей в отноше-нии присутствия когнатного антигена (например, ЭПО человека или ЭПО обезьян циномоглус) в гетеро-генной популяции белков и других биологических индивидах. Понятия "антитело, распознающее анти-ген" и "антитело, специфичное к антигену" используются в изобретении взаимозаменяемо с понятием "антитело, которое специфично связывается с антигеном".

Понятие "состояние или расстройство, связанное с сосудистым заболеванием сетчатки" относится к состояниям, расстройствам или заболеваниям, при которых возникает десоздание или дисфункция сет-чатки. Это понятие включает диабетическую ретинопатию (ДР), диабетический макулярный отек (ДМО), пролиферативную диабетическую ретинопатию (ПДР), непролиферативную диабетическую ретинопатию (НПДР), возрастную макулярную дегенерацию (ВМД), окклюзию вен сетчатки (РВО), мультифо-кальный хориоидит, миопическую хориоидальную неоваскуляризацию или ретинопатию недоношенных. Анатомические признаки сосудистых заболеваний сетчатки, которые можно лечить путем ингибирован-ия ЭПО, включают макулярный отек, расширение венозных сосудов, извитость сосудов, пропотевание жидкости через сосуды, которое измеряют с помощью флуоресцентной ангиографии, по кровоизлияниям сетчатки и микрососудистым аномалиям (таким как микроаневризмы, ватные пятна, интратретинальные микрососудистые аномалии (ИРМА), закупорку капилляров, лейкоцитарную адгезию, ишемию сетчатки, неоваскуляризацию диска зрительного нерва, неоваскуляризацию заднего полюса, неоваскуляризацию радужной оболочки, интратретинальное кровоизлияние, кровоизлияние в стекловидное тело, макулярную звезду, субретинальный фиброз и фиброз сетчатки).

Понятие "состояние или расстройство, связанное с диабетической ретинопатией" относится к со-стояниям, при которых наблюдается десоздание или дисфункция сетчатки вследствие воздействия са-харного диабета (1 типа или 2 типа) на сосудистую сеть сетчатки, метаболизм сетчатки, пигментный эпителий сетчатки, гемато-ретинальный барьер или на уровни конечных продуктов глубокого гликиро-вания (AGE) в глазах, на активность альдозоредуктазы, уровни гликозилированного гемоглобина и про-теинкиназы С. Потеря зрения у пациентов с диабетической ретинопатией может быть обусловлена ише-

мией сетчатки, макулярным отеком, пропотеванием жидкости через сосуды, кровоизлиянием в стекловидное тело или прямым воздействием повышенного уровня глюкозы на нейроны сетчатки. Анатомические признаки диабетической ретинопатии, которые можно лечить путем ингибирования ЭПО, включают микроаневризмы, ватные пятна, расширение венозных сосудов, макулярный отек, интратретинальные микроваскулярные аномалии (ИРМА), интратретинальное кровотечение, пролиферацию сосудов, неоваскуляризацию диска зрительного нерва, рубец радужки и ишемию сетчатки. "Диабетический макулярный отек" возникает у индивида с диабетической ретинопатией и может наблюдаться на любой стадии заболевания.

Понятие "состояние или расстройство, связанное с макулярным отеком" относится к состояниям или расстройствам, при которых отечность или утолщение макулы возникает в результате пропотевания жидкости через кровеносные сосуды сетчатки, т.е. "макулярного отека". Макулярный отек возникает при сосудистом заболевании сетчатки и часто является его осложнением. Конкретные состояния или нарушения, связанные с макулярным отеком, включают диабетическую ретинопатию, диабетический макулярный отек, пролиферативную диабетическую ретинопатию, непролиферативную диабетическую ретинопатию, возрастную макулярную дегенерацию, окклюзию вен сетчатки, мультифокальный хориоидит, миопическую хориоидальную неоваскуляризацию или ретинопатию недоношенных. Лечение макулярного отека путем ингибирования ЭПО можно контролировать с помощью исследования глазного дна, оптической когерентной томографии и путем улучшения остроты зрения.

Термин "химерное антитело" обозначает молекулу антитела, в которой (а) константная область или ее часть является измененной, перемещенной или замещенной таким образом, что антигенсвязывающий участок (вариабельная область) связан с константной областью другого класса или измененного класса, другой или измененной эффекторной функцией и/или видами, или совсем с другой молекулой, что придает химерному антителу новые свойства, например, фермента, токсина, гормона, фактора роста, лекарства и т.д.; или (б) вариабельный участок или его часть является измененной, перемещенной или замещенной на вариабельную область, имеющую другую или измененную антигенную специфичность. Например, антитело мыши можно модифицировать путем замены его константной области на константную область из иммуноглобулина человека. Благодаря замене на константную область человека, химерное антитело может сохранять свою специфичность в распознавании антигена, и при этом обладать уменьшенной антигенностью для человека по сравнению с исходным антителом мыши.

Термины "белок ЭПО", или "антиген ЭПО", или "ЭПО" или "Эпо" используются взаимозаменяемо и относятся к белку эритропоэтину у разных видов. Например, последовательность ЭПО человека показана в табл. 1: SEQ ID NO: 81. Примеры белков ЭПО от других видов приведены в табл. 1, SEQ ID NO: 82, 83, 84 или 85. Белковые последовательности ЭПО обезьян, циномогус, ЭПО человека, мыши, крысы и кролика являются общедоступными и представлены в табл. 1. ЭПО человека также может быть гипергликозилированным. Гипергликозилированный ЭПО в данной области также называется "дарбопоэтином" и может быть получен из разных источников, в том числе в компании LEK Pharmaceuticals.

Понятие "консервативно модифицированный вариант" относится как к аминокислотным последовательностям, так и к последовательностям нуклеиновых кислот. В отношении конкретных последовательностей нуклеиновых кислот, консервативно модифицированные варианты относятся к тем нуклеиновым кислотам, которые кодируют идентичные или, по существу, идентичные аминокислотные последовательности, или, в случае, если нуклеиновая кислота не кодирует аминокислотную последовательность, относятся, по существу, к идентичным последовательностям. По причине вырожденности генетического кода большое количество функционально идентичных нуклеиновых кислот кодирует любой заданный белок. Например, все из кодонов GCA, GCC, GCG и GCU кодируют аминокислоту аланин. Таким образом, в каждом положении, где кодоном устанавливается аланин, этот кодон может быть заменен на любой из соответствующих описанных кодонов, без изменения кодируемого полипептида. Такие вариации нуклеиновых кислот представляют собой "молчащие вариации", которые являются одним из видов консервативно модифицированных вариаций. Каждая последовательность нуклеиновой кислоты в изобретении, которая кодирует полипептид, также описывает каждую возможную вариацию молчащей нуклеиновой кислоты. Специалисту будет очевидно, что можно модифицировать каждый кодон в нуклеиновой кислоте (кроме AUG, который обычно является единственным кодоном для метионина, и TGG, который обычно является единственным кодоном для триптофана) с получением функционально идентичной молекулы. Таким образом, в каждой описанной последовательности подразумевается каждая молчащая вариация нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид.

В отношении полипептидных последовательностей "консервативно модифицированные варианты" включают отдельные замены, делеции или дополнения к полипептидной последовательности, которые приводят к замене аминокислоты на химически аналогичную аминокислоту. В данной области хорошо известны таблицы консервативных замещений, показывающие функционально аналогичные аминокислоты. Такие консервативно модифицированные варианты являются дополнением к изобретению и не исключают полиморфные варианты, межвидовые гомологи и аллели по изобретению. Существуют следующие восемь групп, содержащие аминокислоты, которые являются консервативными заменами по отношению друг к другу: 1) аланин (A), глицин (G); 2) аспарагиновая кислота (D), глутаминовая кислота

(E); 3) аспарагин (N), глутамин (Q); 4) аргинин (R), лизин (K); 5) изолейцин (I), лейцин (L), метионин (M), валин (V); 6) фенилаланин (F), тирозин (Y), триптофан (W); 7) серин (S), треонин (T); и 8) цистеин (C), метионин (M) (см., например, Creighton, Proteins (1984)). В некоторых вариантах осуществления понятие "консервативные модификации последовательностей" используется для обозначения аминокислотных модификаций, которые не оказывают значительного влияния или не изменяют свойства связывания антитела, содержащего эту аминокислотную последовательность.

Термин "эпитоп" означает детерминанту белка, которая может специфично связываться с антителом. Эпитопы обычно состоят из химически активных поверхностных групп молекул, таких как аминокислоты или боковые цепи сахаров, и обычно имеют конкретные характеристики трехмерной структуры, а также конкретные характеристики зарядов. Конформационные и неконформационные эпитопы отличаются тем, что в присутствии денатурирующих растворителей утрачивается связывание с конформационным эпитопом, в отличие от неконформационного эпитопа.

Термин "антитело человека", используемый в изобретении, предназначен включать антитела, имеющие вариабельные области, в которых и каркасные участки, и участки CDR получены из последовательностей человеческого происхождения. Кроме того, если антитело содержит константную область, эта константная область также получена из последовательностей человека, например из последовательности человека зародышевой линии или мутантных версий последовательностей человека зародышевой линии. Антитела человека по изобретению могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями человека (например, мутации, вставленные путем случайного или сайт-направленного мутагенеза *in vitro* или путем соматической мутации *in vivo*).

Термин "моноклональное антитело человека" относится к антителам, проявляющим единственную специфичность связывания и имеющим вариабельные области, в которых и каркасные участки, и участки CDR получены из последовательностей человека. В одном варианте осуществления моноклональные антитела человека получают с помощью гибридом, которые включают: (i) В-клетку, полученную из трансгенного животного, отличного от человека, например из трансгенной мыши, которая имеет геном, содержащий трансгенную тяжелую цепь человека и трансгенную легкую цепь, (ii) слияние с иммортализованной клеткой.

"Гуманизированное" антитело представляет собой антитело, которое сохраняет реактивность антитела нечеловеческого происхождения, и при этом является менее иммуногенным для людей. Это может быть достигнуто, например, путем сохранения нечеловеческих участков CDR и замены оставшихся частей антитела на их человеческие аналоги (т.е. константной области, а также каркасных участков вариабельной области). См., например, Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855, 1984; Morrison and Oi, Adv. Immunol., 44:65-92, 1988; Verhoeyen et al., Science, 239: 1534-1536, 1988; Padlan, Molec. Immun., 28:489-498, 1991; и Padlan, Molec. Immun., 31: 169-217, 1994. Другие примеры генноинженерной технологии человека включают без ограничения технологии Хота, описанные в патенте США 5766886.

Термины "идентичный" или "100% идентичность" в отношении двух или нескольких нуклеиновых кислот или полипептидных последовательностей относятся к двум или нескольким последовательностям или подпоследовательностям, которые являются одинаковыми. Две последовательности являются "по существу, идентичными", если эти две последовательности имеют установленный процент аминокислотных остатков или нуклеотидов, которые являются одинаковыми (т.е. 60% идентичности, необязательно, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 99% идентичности на протяжении конкретного участка, или, если не указано, по всей последовательности), при сравнении и выравнивании для максимального соответствия в окне сравнения или в обозначенной области, что измеряют с помощью одного из следующих алгоритмов сравнения последовательностей или путем неавтоматизированного выравнивания и визуального осмотра. Необязательно, идентичность имеет место на участке, длина которого составляет по меньшей мере приблизительно 50 нуклеотидов (или 10 аминокислот), и более предпочтительно, на участке, который имеет длину от 100 до 500 или 1000 или больше нуклеотидов (или длину 20, 50, 200 или больше аминокислот).

При сравнении последовательностей обычно одна последовательность выступает в качестве эталонной последовательности, с которой сравнивают тестируемые последовательности. При использовании алгоритма сравнения последовательностей тестируемые последовательности и референс-последовательности вводятся в компьютер, при необходимости указываются координаты подпоследовательности и указываются параметры программы алгоритма последовательности. Можно использовать параметры программы по умолчанию или можно устанавливать альтернативные параметры. Затем на основе параметров программы в алгоритме сравнения последовательностей вычисляется процент идентичности последовательности для тестируемых последовательностей по отношению к референс-последовательности.

Термин "окно сравнения", используемый в изобретении, включает ссылку на сегмент из любого одного из расположенных подряд положений, выбранных из группы, состоящей из от 20 до 600, обычно приблизительно от 50 приблизительно до 200, чаще приблизительно от 100 приблизительно до 150, и в упомянутом сегменте можно сравнить последовательность с референс-последовательностью одного и того же числа непрерывных положений после оптимального выравнивания этих двух последовательностей. Способы выравнивания последовательностей для сравнения хорошо известны в данной области.

Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения может быть проведено, например, с помощью алгоритма локальной гомологии Smith and Waterman (1970) *Adv. Appl. Math.* 2:482с, с помощью алгоритма выравнивания гомологии Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48: 443, 1970, с помощью способа поиска подобия Пирсона и Липмана (Pearson and Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444, 1988, с помощью методик компьютерной реализации этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в пакете программ Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), или с помощью неавтоматизированного выравнивания и визуального осмотра (см., например, Brent et al., *Current Protocols*, в издании *Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. (Ringbou ed., 2003)).

Алгоритмы BLAST и BLAST 2.0 представляют собой два примера алгоритмов, которые подходят для определения процента идентичности последовательностей и сходства последовательностей, и эти алгоритмы описаны авторами Altschul et al., *Nuc. Acids Res.* 25: 3389-3402, 1977; и Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215: 403-410, 1990 соответственно. Программное обеспечение для проведения анализа BLAST общедоступно в Национальном центре биотехнологической информации (National Center for Biotechnology Information). Этот алгоритм предполагает в первую очередь выявление пар последовательностей высокого счета (HSP), для чего сначала идентифицируют короткие слова длины W в рассматриваемой последовательности, которые при выравнивании со словом такой же длины в последовательности из базы данных или соответствуют этому слову, или удовлетворяют некоему положительному пороговому значению T . Параметр T называют пороговым счетом слова соседства (Altschul et al., там же). Исходное слово соседства представляет собой семя для инициации поиска более длинных HSP, которые содержатся в нем. Затем это слово удлиняется в обоих направлениях на протяжении каждой последовательности до тех пор, пока может повышаться кумулятивный счет выравнивания. Для определения кумулятивного счета для нуклеотидных последовательностей используют параметры M ("награда" для пары соответствующих остатков, всегда >0) и N ("штраф" для пары несоответствующих остатков, всегда <0). Кумулятивный счет для аминокислотных последовательностей подсчитывают с помощью матрицы счета. Удлинение слова в каждом направлении останавливается, если кумулятивный счет выравнивания падает ниже величины X от его максимального достигнутого значения; если кумулятивный счет падает до 0 или ниже, по причине накопления одного или больше выравниваний остатков с отрицательным счетом, и если был достигнут конец последовательности. Параметры W , T и X в алгоритме BLAST определяют чувствительность и скорость выравнивания. В программе BLASTN (для нуклеотидных последовательностей) используются по умолчанию длина слова (W)=11, ожидание (E)=10, $M=5$, $N=-4$ и сравнение обеих цепей. Для аминокислотных последовательностей используются по умолчанию следующие значения параметров: длина слова 3, ожидание (E) 10 и матрица счета BLOSUM62 (см. Henikoff and Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915, 1989), выравнивания (B)=50, ожидание (E)=10, $M=5$, $N=-4$ и сравнение обеих цепей.

С использованием алгоритма BLAST также проводят статистический анализ сходства между двумя последовательностями (см., например, Karlin and Altschul, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 90:5873-5787, 1993). Одной из характеристик сходства, измеряемой в алгоритме BLAST, является наименьшая суммарная вероятность ($P(N)$), которая указывает вероятность того, что совпадение между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями будет возникать случайно. Например, нуклеиновая кислота считается сходной с референс-последовательностью, если наименьшая суммарная вероятность при сравнении тестируемой нуклеиновой кислоты с эталонной нуклеиновой кислотой меньше, чем приблизительно 0,2, более предпочтительно, если меньше, чем приблизительно 0,01, и наиболее предпочтительно, если меньше, чем приблизительно 0,001.

Процент идентичности между двумя аминокислотными последовательностями также может быть определен с использованием алгоритма авторов E. Meyers и W. Miller (*Comput. Appl. Biosci.*, 4:11-17, 1988), который был включен в программу ALIGN (версия 2.0), с использованием таблицы веса остатков PAM120, штрафа за длину пропуска 12 и штрафа за пропуск 4. Дополнительно процент идентичности между двумя аминокислотными последовательностями может быть определен с помощью алгоритма авторов Needleman и Wunsch (*J. Mol., Biol.* 48: 444-453, 1970), который был включен в программу GAP в пакете программ GCG программного обеспечения (предоставляемого в открытом доступе в интернете gcg.com), с использованием матрицы Blossom 62 или матрицы PAM250, значениями пропуска 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4 и значениями длины 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

В отличие от описанного выше определения процента идентичности последовательностей другой признак того, что две последовательности нуклеиновой кислоты или полипептидные последовательности являются, по существу, идентичными, состоит в том, что полипептид, кодируемый первой нуклеиновой кислотой, иммунологически перекрестно реагирует с антителами, вырабатываемыми против полипептида, который кодируется второй нуклеиновой кислотой, как описано ниже. Таким образом, полипептид обычно, по существу, идентичен второму полипептиду, например, если эти два пептида отличаются только консервативными заменами. Другой признак того, что две последовательности нуклеиновой кислоты, по существу, являются идентичными, состоит в том, что эти две молекулы или их комплексы гибридизуются друг с другом в строгих условиях, как описано ниже. Еще один признак того, что две последовательности нуклеиновой кислоты, по существу, являются идентичными, состоит в том, что для

амплификации последовательности можно использовать одни и те же праймеры.

Термин "ингибировать (или ингибирование) ЭПО-зависимую клеточную пролиферацию" относится к способности анти-ЭПО антитела нарушать активацию клеток (например, клеточный сигнальный путь), репликацию и/или пролиферацию, которая стимулируется и/или индуцируется посредством ЭПО. В частности, "ингибировать" относится к статистически значимому снижению (т.е. $p < 0,05$) ЭПО-зависимой клеточной пролиферации или другого параметра (например, ЭПО-зависимого клеточного сигнального пути, ангиогенеза) у индивида после контакта с анти-ЭПО антителом или его фрагментом по изобретению по сравнению с контролем. Используемый в изобретении термин "ингибировать (или ингибирование) ЭПО-зависимую клеточную пролиферацию" может также относиться к клинически значимому улучшению зрительной функции или анатомии сетчатки после лечения анти-ЭПО антителом, как описано в изобретении, у пациента с диагностированным состоянием или заболеванием, связанным с сосудистым заболеванием сетчатки, как описано ниже.

Используемый в изобретении термин "ингибировать (или ингибирование) ЭПО-зависимый клеточный сигнальный путь" относится к способности анти-ЭПО антитела по изобретению вызывать статистически значимое (т.е. $p < 0,05$) уменьшение активации внутриклеточных сигнальных путей, которые стимулируются или индуцируются посредством ЭПО.

Термин "выделенное антитело" относится к антителу, которое, по существу, не содержит других антител, имеющих другие антигенные специфичности (например, выделенное антитело, которое специфично связывается с ЭПО, по существу, не содержит антител, которые специфично связываются с антигенами, отличными от ЭПО). Вместе с тем, выделенное антитело, которое специфично связывается с ЭПО, может обладать перекрестной реактивностью к другим антигенам. Кроме того, выделенное антитело может, по существу, не содержать другой клеточный материал и/или химические вещества.

Термин "изотип" относится к классу антител (например, IgM, IgE, IgG, такие как IgG1 или IgG4), который характеризуется генами константной области тяжелой цепи. Изотип также включает модифицированные версии одного из этих классов, которые подверглись модификации для изменения функции Fc, например, в целях повышения или снижения эффекторных функций или связывания с Fc рецепторами. Изотип также относится к классу антитела (например, каппа, лямбда), который характеризуется константными областями легкой цепи.

Термин " K_{assoc} " или "Ka", используемый в изобретении, предназначен для обозначения скорости ассоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген, тогда как термин " K_{dis} " или "Kd", используемый в изобретении, предназначен для обозначения скорости диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген. Термин " K_D ", используемый в изобретении, предназначен для обозначения константы диссоциации, которую получают из соотношения Kd и Ka (т.е. Kd/Ka) и выражают в виде молярной концентрации (M). Значения K_D для антител можно определять с помощью способов, хорошо известных в данной области. Способы определения K_D антитела включают измерения поверхностного плазмонного резонанса с использованием системы биосенсоров, такой как система Biacore®, или измерения аффинности в растворе с помощью раствора равновесного титрования (SET).

Термины "моноклональное антитело" или "композиция моноклонального антитела", используемые в настоящем изобретении, относятся к препарату молекул антител в виде моноклональной молекулярной композиции. Композиция моноклонального антитела отражает единственную специфичность связывания и аффинность к конкретному эпитопу.

Термин "нуклеиновая кислота" используется в изобретении взаимозаменяемо с термином "поли-нуклеотид" и относится к дезоксирибонуклеотидам или рибонуклеотидам и их полимерам, как в одноцепочечной, так и в двухцепочечной форме. Термин охватывает нуклеиновые кислоты, содержащие известные нуклеотидные аналоги или модифицированные скелетные остатки или связи, которые являются синтетическими, имеют природное и неприродное происхождение, которые имеют свойства связывания, аналогичные эталонной нуклеиновой кислоте, и которые метаболизируются аналогично метаболизму эталонных нуклеотидов. Примеры таких аналогов включают, без ограничения, фосфоротиоаты, фосфорамидаты, метилфосфонаты, хиральные метилфосфонаты, 2-О-метилрибонуклеотиды, пептид-нуклеиновые кислоты (ПНК).

Если не указано иное, конкретная последовательность нуклеиновой кислоты также косвенно охватывает ее консервативно модифицированные варианты (например, замены вырожденных кодонов) и комплементарные последовательности, а также явно указанные последовательности. В частности, как подробно описано ниже, замены вырожденных кодонов можно выполнять путем создания последовательностей, в которых третье положение одного или нескольких выбранных (или всех) кодонов замещено остатками смешанных оснований и/или дезоксиинозина (Batzer et al., *Nucleic Acid Res.* 19:5081, 1991; Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608, 1985 и Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes* 8:91-98, 1994).

Термин "функционально связанный" относится к функциональной связи между двумя или несколькими полинуклеотидными сегментами (например, сегментами ДНК). Обычно этот термин относится к функциональной зависимости последовательности регуляции транскрипции от транскрибируемой последовательности. Например, промоторная или энхансерная последовательность функционально связана с кодирующей последовательностью, если она стимулирует или модулирует транскрипцию кодирующей

последовательности в подходящей клетке-хозяине или в другой системе экспрессии. В общем, промоторные последовательности регуляции транскрипции, которые функционально связаны с транскрибируемой последовательностью, физически расположены смежно с транскрибируемой последовательностью, т.е. они являются *cis*-активными. Вместе с тем, некоторые транскрипционные регуляторные последовательности, такие как энхансеры, не обязательно должны физически располагаться смежно или в непосредственной близости от кодирующих последовательностей, транскрипцию которых они усиливают.

Используемый в изобретении термин "оптимизированный" означает, что нуклеотидная последовательность подверглась такому изменению, чтобы она кодировала аминокислотную последовательность с использованием кодонов, которые являются предпочтительными при образовании клетки или организма, обычно при образовании эукариотических клеток, например клеток дрожжей *Pichia*, клеток яичника китайского хомячка (СНО) или клеток человека. Оптимизированная нуклеотидная последовательность сконструирована таким образом, чтобы сохранить в максимальной степени или полностью аминокислотную последовательность, первоначально кодируемую исходной нуклеотидной последовательностью, которую также называют "родительской" последовательностью. Оптимизированные последовательности по изобретению сконструированы таким образом, чтобы в них имелись кодоны, которые предпочтительны в клетках млекопитающих. Вместе с тем, в настоящем изобретении также рассматривается оптимизированная экспрессия этих последовательностей в других эукариотических клетках или прокариотических клетках. Аминокислотные последовательности, которые кодируются оптимизированными нуклеотидными последовательностями, также называются оптимизированными.

Термины "полипептид" и "белок" используются в изобретении взаимозаменяемо для обозначения полимера из аминокислотных остатков. Термины относятся к аминокислотным полимерам, в которых один или несколько аминокислотных остатков представляет собой искусственный химический миметик соответствующей природной аминокислоты, а также к природным аминокислотным полимерам и неприродным аминокислотным полимерам. Если не указано иное, конкретная полипептидная последовательность также неявно охватывает ее консервативно модифицированные варианты.

Термин "рекомбинантное антитело человека", используемый в изобретении, включает все антитела человека, которые получены, экспрессированы, созданы или выделены с помощью рекомбинантных технологий, например антитела, выделенные из животного (например, из мыши), которые являются трансгенными или трансхромосомными в отношении генов иммуноглобулина человека или полученных из него гибридом, антитела, выделенные из клетки-хозяина, которые трансформированы, чтобы экспрессировать антитело человека, например выделенные из трансфектомы, антитела, выделенные из рекомбинантной, комбинаторной библиотеки антител человека, и антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любыми другими способами, в число которых входит сплайсинг всей последовательности или части последовательности гена иммуноглобулина человека с другими последовательностями ДНК. Такие рекомбинантные антитела человека имеют переменные участки, в которых карманные области и области CDR происходят из последовательности иммуноглобулина человека зародышевой линии. Вместе с тем, в некоторых вариантах осуществления такие рекомбинантные антитела человека могут подвергаться мутагенезу *in vitro* (или в случае использования трансгенного по последовательностям Ig человека животного применяется соматический мутагенез *in vivo*) и, таким образом, аминокислотные последовательности этих VH и VL областей из рекомбинантных антител представляют собой последовательности, которые, будучи полученными из VH и VL последовательностей зародышевой линии человека и родственных им последовательностей, могут не существовать в природе в репертуаре зародышевой линии человека *in vivo*.

Термин "рекомбинантная клетка-хозяин" (или просто "клетка-хозяин") относится к клетке, в которую был введен рекомбинантный вектор экспрессии. Следует понимать, что такие термины предназначены для обозначения не только конкретной рассматриваемой клетки, но и потомства такой клетки. Поскольку некоторые модификации могут происходить в последующих поколениях вследствие мутаций или воздействий окружающей среды, такое потомство фактически может не быть идентичным родительской клетке, но, тем не менее, включено в объем термина "клетка-хозяин", используемого в настоящем изобретении.

Термин "индивид" включает человека и животных, не являющихся человеком. Животные, не являющиеся человеком, включают всех позвоночных (например, млекопитающих и не млекопитающих), таких как приматы (например, обезьяны циномогус), овцы, собаки, коровы, куры, амфибии и рептилии. Кроме случаев конкретного примечания, термины "пациент/больной" или "индивид" используются в настоящем изобретении взаимозаменяемо. Используемые в изобретении термины "супо" или "циномолгус" относятся к обезьяне циномогус (*Macaca fascicularis*).

Используемый в изобретении термин "лечить" или "лечение" какого-либо заболевания или нарушения (например, сосудистых заболеваний сетчатки, диабетической ретинопатии, макулярного отека) относится в одном варианте осуществления к облегчению заболевания или расстройства (т.е. к замедлению, или прекращению, или уменьшению развития заболевания, или по меньшей мере одного из его клинических симптомов). В другом варианте осуществления "лечить" или "лечение" относится к облегчению или улучшению по меньшей мере одного физического параметра, в том числе параметра, который не может

быть распознан пациентом. Еще в одном варианте осуществления "лечить" или "лечение" относится к модуляции заболевания или расстройства как в физическом отношении (например, стабилизация явного симптома), так и в физиологическом отношении (например, стабилизации физического параметра), или и к тому, и к другому. В еще одном варианте осуществления "лечить" или "лечение" относится к предотвращению или к отсрочке начала или развития или прогрессирования заболевания или нарушения. "Профилактика" в отношении показаний, описанных в изобретении, в том числе состояний или расстройств, связанных с сосудистыми заболеваниями сетчатки, состояний или расстройств, связанных с диабетической ретинопатией, и/или состояний или расстройств, связанных с макулярным отеком, означает любое действие, которое предотвращает или замедляет ухудшение зрительной функции, анатомии сетчатки, параметров сосудистых заболеваний сетчатки, параметров заболевания диабетической ретинопатии и/или параметров заболевания макулярного отека согласно описанию ниже у пациента, имеющего риск ухудшения указанных заболеваний. Более конкретно, "лечение" состояний или расстройств, связанных с сосудистым заболеванием сетчатки, состояний или расстройств, связанных с диабетической ретинопатией, и/или состояний или расстройств, связанных с макулярным отеком, означает любое действие, которое предполагает или вызывает в качестве результата улучшение или сохранение зрительной функции и/или анатомии сетчатки. Способы оценки лечения и/или профилактики заболеваний известны в данной области и описаны ниже в настоящем изобретении.

Термин "вектор" предназначен для обозначения полинуклеотидной молекулы, способной транспортировать другой полинуклеотид, с которым эта молекула была соединена. Одним типом вектора является "плазида", которая относится к петле кольцевой двухцепочечной ДНК, в которую могут быть лигированы дополнительные сегменты ДНК. Другим типом вектора является вирусный вектор, такой как аденоассоциированный вирусный вектор (AAV или AAV2), в котором дополнительные сегменты ДНК могут быть лигированы в вирусный геном. Некоторые векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они введены (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальное начало репликации и эписомные векторы млекопитающих). Другие векторы (например, неэписомные векторы млекопитающих) могут быть интегрированы в геном клетки-хозяина при введении в клетку-хозяина и тем самым реплицироваться вместе с геномом хозяина. Кроме того, некоторые векторы способны регулировать экспрессию генов, с которыми они функционально связаны. Такие векторы называются в изобретении "рекомбинантными экспрессирующими векторами" (или просто "экспрессирующими векторами"). В общем, экспрессирующие векторы, используемые в рекомбинантных ДНК, часто существуют в виде плазмид. В настоящем изобретении термины "плазида" и "вектор" могут быть использованы взаимозаменяемо, поскольку плазида является наиболее часто используемой формой вектора. Тем не менее, предполагается, что изобретение включает другие формы экспрессирующих векторов, такие как вирусные векторы (например, репликации дефектных ретровирусов, аденовирусов и аденоассоциированных вирусов), которые действуют с эквивалентными функциями.

Краткое описание фигур

Фиг. 1 показывает, что ЭПО индуцирует расширение сосудов в центральной зоне сетчатки;
 фиг. 2 показывает, что анти-ЭПО Fab нейтрализует ЭПО в глазах кролика;
 фиг. 3 показывает, что анти-ЭПО Fab нейтрализует ЭПО в глазах кролика.

Подробное описание

Настоящее изобретение частично основано на обнаружении молекул антител, которые специфично связываются с ЭПО. Изобретение относится и к полноразмерным антителам формата IgG, и к их антигенсвязывающим фрагментам, таким как Fab-фрагменты (например, см. антитела NVS1, NVS2, NVS3 и NVS4).

Таким образом, настоящее изобретение относится к антителам, которые специфично связываются с ЭПО (например, с ЭПО обезьян циномоглус, ЭПО человека, ЭПО крысы и ЭПО мыши), к фармацевтическим композициям, способам получения и способам применения таких антител и композиций.

Антитела и антигенсвязывающие фрагменты для ЭПО

Настоящее изобретение относится к антителам, которые специфично связываются с ЭПО. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антителам, которые специфично связываются с ЭПО обезьян циномоглус, ЭПО человека, крысы и/или мыши, а также с гипергликозилированным ЭПО (дарбопозтин) человека. Антитела по изобретению включают без ограничения моноклональные антитела человека и Fab-, выделенные, как описано в разделе примеров.

Настоящее изобретение относится к антителам, которые специфично связываются с белком ЭПО (например, ЭПО обезьян циномоглус, ЭПО человека, крысы и/или мыши), при этом антитела содержат домен VH, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, 33, 53 или 73. Настоящее изобретение также относится к антителам, которые специфично связываются с белком ЭПО, при этом антитела содержат область CDR в VH, имеющую аминокислотную последовательность какой-либо одной из областей CDR в VH, перечисленных в табл. 1 ниже. В частности, настоящее изобретение относится к антителам, которые специфично связываются с белком ЭПО (например, ЭПО обезьян циномоглус, ЭПО человека, крысы и/или мыши), при этом упомянутые антитела содержат (или, альтернативно, состоят из) одну, две, три или больше областей CDR в VH, которые имеют аминокислотную последова-

тельность любой из областей CDR в VH, перечисленных в табл. 1 ниже.

Настоящее изобретение относится к антителам, которые специфично связываются с белком ЭПО, и указанные антитела, содержат домен VL, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, 34, 54 или 74. Настоящее изобретение относится также к антителам, которые специфично связываются с белком ЭПО (например, ЭПО обезьян циномогус, ЭПО человека, крысы и/или мыши), и указанные антитела содержат область CDR в VL, имеющую аминокислотную последовательность из какой-либо одной из областей CDR в VL, перечисленных в табл. 1 ниже. В частности, настоящее изобретение относится к антителам, которые специфично связываются с белком ЭПО (например, ЭПО обезьян циномогус, ЭПО человека, крысы и/или мыши), и указанные антитела содержат (или, альтернативно, состоят из) одну, две, три или больше областей CDR в VL, имеющих аминокислотную последовательность какой-либо из областей CDR в VL, перечисленных в табл. 1 ниже.

Другие антитела по изобретению включают аминокислоты, которые подверглись мутации, и при этом их области CDR имеют процент идентичности по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% по отношению к областям CDR, обозначенным в последовательностях, как описано в табл. 1. В некоторых вариантах осуществления эти антитела включают мутантные аминокислотные последовательности, в которых подверглись мутации не более чем одна, две, три, четыре или пять аминокислот в областях CDR по сравнению с CDR-областями, которые показаны в последовательности, описанной в табл. 1.

Настоящее изобретение также относится к последовательности нуклеиновых кислот, кодирующей VH, VL, полноразмерную тяжелую цепь, и полноразмерную легкую цепь антител, которые специфично связываются с белком ЭПО (например, ЭПО обезьян циномогус, ЭПО человека, крысы и/или мыши). Такие последовательности нуклеиновых кислот могут быть оптимизированы для экспрессии в клетках млекопитающих (например, табл. 1 показывает оптимизированные последовательности нуклеиновых кислот для тяжелой цепи и легкой цепи антитела по изобретению).

Таблица 1

Примеры ЭПО антител, Fab и белков ЭПО

Аминокислотная последовательность или полинуклеотид (PN)	Идентификатор последовательностей (SEQ ID NO:) и последовательность
NVS1	
CDRH1 Kabat	1 SYAIS
CDRH2 Kabat	2 GIDPISGFADYAQKFQG
CDRH3 Kabat	3 ELYYPGTWMAVMAY
CDRL1 Kabat	4 SGDNIPEYYVH
CDRL2 Kabat	5 RDNERPS
CDRL3 Kabat	6 QVFDESSWHWV
CDRH1 Chothia	7 GGTFRSY
CDRH2 Chothia	8 DPISGF
CDRH3 Chothia	9 ELYYPGTWMAVMAY
CDRL1 Chothia	10 DNIPEYY
CDRL2 Chothia	11 RDN
CDRL3 Chothia	12 FDESSWHW
VH	13 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFRSYAISWVRQA PGQGLEWMGGIDPISGFADYAQKFQGRVTITADESTSTAY MELSSLRSEDTAVYYCARELYYPGTWMAVMAYWGRGTLVT VSS
VL	14 SYVLTQPPSVSVAPGKTARITCSGDNIPEYYVHWYQQKPG QAPVLIYRDNERPSGIPERFSGNSGNTATLTISRVEAG DEADYYCQVFDESSWHWVFGGKTLTVL
Тяжелая цепь	15 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFRSYAISWVRQA PGQGLEWMGGIDPISGFADYAQKFQGRVTITADESTSTAY MELSSLRSEDTAVYYCARELYYPGTWMAVMAYWGRGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVKRVEPKSC

033643

Легкая цепь	<p>16</p> <p>SYVLTQPPSVSVAPGKTARITCSGDNIPEYYVHWYQKPG QAPVLVIYRDNERPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAG DEADYVCQVFEDESSWHWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLF PPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAG VETTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSQVTHE GSTVEKTVAPTECS</p>
<p>PN, кодирующий SEQ ID NO:13</p>	<p>17</p> <p>cagggtgcagctggtgcagtcaggcgccgaagtgaagaaac ccggctctagcgtgaaggtgcctgtaaagctagtggcgg cacctttagatcctacgctattagctgggtgcgacaggct ccaggccaggcctcgaatggatggcgcatcgacccta ttagcggcttcgccgactacgctcagaaatcagggcag agtgactatcaccgcccagcaggtctactagcaccgacctac atggaactgtctagcctgagatcagaggacaccgacctgt actactgcgctagagagctgtactaccccgccacctggat ggccgtgatggcctattggggcagaggcaccctggtgaca gtgtcttct</p>
<p>PN, кодирующий SEQ ID NO:14</p>	<p>18</p> <p>agctacgtgctgaccagccccctagcgtgctcagtgccc ctggcaagaccgctagaatcacctgtagcggcgataacat ccccgagtactacgtgactggtatcagcagaagccccgpc caggccccgctgctggtgatctatagagataacgagcggc ctagcggcatccccgagcggtttccggctctaatacggg caacaccgctaccctgactattcaagagtgaagccggc gacgaggccgactactactgtcagtggttcgacgagtctt catggcactgggtgttcggcgaggcaccagctgaccgt gctg</p>
<p>PN, кодирующий SEQ ID NO:15</p>	<p>19</p> <p>cagggtgcagctggtgcagtcaggcgccgaagtgaagaaac ccggctctagcgtgaaggtgcctgtaaagctagtggcgg cacctttagatcctacgctattagctgggtgcgacaggct ccaggccaggcctcgaatggatggcgcatcgacccta ttagcggcttcgccgactacgctcagaaatcagggcag agtgactatcaccgcccagcaggtctactagcaccgacctac atggaactgtctagcctgagatcagaggacaccgacctgt actactgcgctagagagctgtactaccccgccacctggat ggccgtgatggcctattggggcagaggcaccctggtgaca gtgtcttctgctagcactaaggccccctccgtgtccctc tggccccctccagcaagtctacctctggcggcaccgctgc tctgggctgctggtgaaggactactccctgagcctgtg acagtgctctggaactctggcgcctgacctccggcgtgc acacctccctgcccgtgctgcagtcctccggcctgtactc cctgtcctccgtggtgacagtgcttccctccagcctgggc accagacctatctgcaacgtgaaccacaagccttcca acaccaaggtggacaagcgggtggagcctaagtcatgc</p>

033643

PN, кодирующий SEQ	20
ID NO:16	agctacgtgctgacccagccccctagcgtgtcagtgccc ctggcaagaccgctagaatcacctgtagcggcgataacat ccccgagtactacgtgcaactggtatcagcagaagcccggc cagggccccgtgctggtgatctatagagataacgagcggc ctagcggcatccccgagcgggtttccggctctaatacggg caacaccgctaccctgactatttcaagagtggagccggc gacgaggccgactactactgtcaggtgttcgacgagtctt catggcactgggtgttcggcggaggcaccaagctgaccgt gctggggcagcctaaggctgccccagcgtgaccctgttc ccccccagcagcagcgtgagcagcagcagcagcagcagc tggtgtgctgatcagcagcttctaccaggcgcgctgac cgtggcctggaaggccgacagcagccccgtgagccggc gtggagaccaccaccagcaagcagagcaacaacaagt acgccgaccagcgtacctgagcctgacccccgagcagtg gaagagccacaggtcctacagctgccaggtgaccacgag ggcagcaccgtgaaaagaccgtggccccaccgagtgca gc
NVS2	
CDRH1_Kabat	21SYWIG
CDRH2_Kabat	22 WIDPYRSEIRYSPSFQG
CDRH3_Kabat	23 VSSEPFDS
CDRL1_Kabat	24 SGDKLGDHYAY
CDRL2_Kabat	25 DDSKRPS
CDRL3_Kabat	26 ATWTFEGDYV
CDRH1 Chothia	27 GYSFTSY
CDRH2 Chothia	28 DPYRSE
CDRH3 Chothia	29 VSSEPFDS
CDRL1 Chothia	30 DKLGDHY
CDRL2 Chothia	31 DDS
CDRL3 Chothia	32 WTFEGDY
VH	33 EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQM PGKLEWMGWIDPYRSEIRYSPSFQGQVTISADKSIKSTAY LQWSSLKASDTAMYYCARVSEPFDSWGQGLTIVTSS

VL	34 SYVLTQPPSVSVAPGKTARITCSGDKLGDHYAYWYQQKPG QAPVLVIYDDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAG DEADYYCATWTFEGDYVFGGGTKLTVL
Тяжелая цепь	35 EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQM PGKGLEWMMGWDIPYRSEIRYSFSFQGGVTISADKSI STAY LQWSSLKASDTAMYYCARVSEPFDSWGQGLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYIC NVNHRKPSNTKVKRVEPKSC
Легкая цепь	36 SYVLTQPPSVSVAPGKTARITCSGDKLGDHYAYWYQQKPG QAPVLVIYDDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAG DEADYYCATWTFEGDYVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPP PSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGV ETTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSQRSYSCQVTHEG STVEKTVAPTECS
PN, кодирующий SEQ ID NO:33	37 Gaggtgcagctggtgcagtcaggcgccgaagtgaagaagc ccggcgagtcactgaagattagctgtaaaggctcaggcta tagcttactagctactggatcggctgggtgcgacagatg cccgcaaggcctggaatggatggctggatcgaccct atagatcagagattaggtatagccctagcttccaggcca ggtgacaattagcgcgataagtctattagcaccgctac ctgcagtggtctagcctgaaggctagtgacaccgctatgt actactgcgctagagtgctagcagcccttcgatagctg gggccaggccaccctggtgacagtgctctca
PN, кодирующий SEQ ID NO:34	38 agctacgtgctgaccagccccctagcgtgctcagtgccc ctggcaagaccgctagaatcacctgtagcggcgataagct ggcgatcactacgcctactggtatcagcagaagcccgcc caggccccgtgctggtgatctacgacgactctaagcggc ctagcggcatccccgagcggcttagcggctctaatagcgg caacaccgctaccctgactattcaagagtgaagccggc gacgagggcactactactgcgctacctggacccttcgagg gcgactacgtgttcggcgaggcactaagctgaccgtgct g
PN, кодирующий SEQ ID NO:35	39 gaggtgcagctggtgcagtcaggcgccgaagtgaagaagc ccggcgagtcactgaagattagctgtaaaggctcaggcta tagcttactagctactggatcggctgggtgcgacagatg cccgcaaggcctggaatggatggctggatcgaccct atagatcagagattaggtatagccctagcttccaggcca ggtgacaattagcgcgataagtctattagcaccgctac ctgcagtggtctagcctgaaggctagtgacaccgctatgt actactgcgctagagtgctagcagcccttcgatagctg gggccaggccaccctggtgacagtgcttccagctagcact aaggccccctcgtgtccctctggccccctccagcaagt ctacctctggcgccaccgctgctctgggctgcctggtgaa ggactactccctgagcctgtgacagtgctcctggaactct ggcgccctgacctccggcgtgcacacctccctgcccgtgc tgagctcctccggcctgactccctgtcctccgtggtgac agtgccttctccagcctgggaccagacctatctctgc aacgtgaaccacaagccttccaacccaaggtggacaagc gggtggagcctaagtcatgc

033643

PN, кодирующий SEQ ID NO:36	40 agctacgtgctgaccagccccctagcgtgtcagtgccc ctggcaagaccgctagaatcacctgtagcggcgataagct ggcgatcactacgcctactggtatcagcagaagccggc caggccccgtgctggtgatctacgacactctaagcggc ctagcggcatccccgagcggtttagcggctctaatacggg caacaccgctaccctgactattcaagagtgaagccggc gacgaggccgactactactgcgctacctggacctcggg gcgactacgtgttcggcggaggcactaagctgacctgct ggccagcctaaggctgccccagcgtgacctgttcccc cccagcagcaggagctgcaggccaacaagccaccctgg tgtgcctgatcagcacttctaccaggcggcgtgacctg ggcctggaaggccgacagcagccccgtgaaggccggcgtg gagaccaccaccccagcaagcagacaacaagaatcag ccgccagcagctacctgagcctgacccccgagcagtgaa gagccacaggtcctacagctgccaggtgacccacgagggc agcaccgtggaagaccgtggccccaccgagtgacgc
NVS3	
CDRH1_Kabat	41 SNTAAWN
CDRH2_Kabat	42 VIYYRSKWYNDYAVSVKS
CDRH3_Kabat	43 SVPGGDPGLEHAFAY
CDRL1_Kabat	44 SGDNLGTYIVE
CDRL2_Kabat	45 DDSDRPS
CDRL3_Kabat	46 ASFASWSDSV
CDRH1 Chothia	47 GDSVSSNTA
CDRH2 Chothia	48 YYRSKWY
CDRH3 Chothia	49 SVPGGDPGLEHAFAY
CDRL1 Chothia	50 DNLGTYI
CDRL2 Chothia	51 DDS
CDRL3 Chothia	52 FASWSDS
VH	53 QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNTAAWNIR QSPSRGLEWLGVIYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKN QFSLQLNSVTPEDTAVYYCARSVPGGDPGLEHAFAYWGRG TLVTVSS

PN, кодирующий SEQ ID NO:56	60 agctacgtgctgaccagccccctagcgtgtcagtgggccc ctggcaagaccgctagaatcacctgtagcggcgataacct gggcacctactacgtggaatggatcagcagaagcccggc caggccccctgctggtgatctacgacgatagcgatagac ctagcggcatccccgagcgggttagcggctctaatacggg caacaccgctaccctgactattagtagagtggaagccggc gacgagggcactactactgctagtttcgctagttgga gcgattcagtggtcggcggaggcactaagctgaccgtgct gggcccagcctaaggctgccccagcgtgaccctgttcccc cccagcagcagagctgcaggccaacaaggccaccctgg tgtgcctgatcagcgaacttaccaggcgcctgaccgt ggcctggaagccgacagcagccccgtgaaggccggcgtg gagaccaccaccccagcaagcagagcaacaacaagtacg ccgcccagcagctacctgagcctgacccccagcagtgaa gagccacaggtcctacagctgccaggtgaccacaggggc agcaccgtggaaaagaccgtggccccaccagtgacgc
NVS4	
CDRH1_Kabat	61 SYYS
CDRH2_Kabat	62 WINPLKGNNTNYAQKFGQ
CDRH3_Kabat	63 EGMFYDI
CDRL1_Kabat	64 SGDSIGDKYVY
CDRL2_Kabat	65 DTNKRPS
CDRL3_Kabat	66 QSWDLDFNTYV
CDRH1 Chothia	67 GYTFTSY
CDRH2 Chothia	68 NPLKGN
CDRH3 Chothia	69 EGMFYDI
CDRL1 Chothia	70 DSIGDKY
CDRL2 Chothia	71 DTN
CDRL3 Chothia	72 WDLDFNTY
VH	73 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYYSWVRQA PGQGLEWMGWINPLKGNNTNYAQKFGGRVTMTRDTSISTAY MELSRRLRSEDVAVYYCAREGMFYDIWGQGLTVTVSS
VL	74 SYELTQPLSVSVALGQTARITCSGDSIGDKYVYVYQKPG QAPVLVIYDTNKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRAGAG DEADYYCQSWDLDFNTYVFGGGTKLTVL
Тяжелая цепь	75 qvqlvqsgaevkkpgasvkvskasgytftsyyswvrqa pgqglewmgwiplkgnntnyaqkfggrvtmtrdtsistay melsrllrsedtavyycaregmfydiwgqglvtvssastk gpsvfplapsskstsggtaalgclvkdyfpepvtvswng altsgvhtfpavllqssgylslsvvtvpssslgtqtyicn vnhkpsntkvdkrvepksc
Легкая цепь	76 SYELTQPLSVSVALGQTARITCSGDSIGDKYVYVYQKPG QAPVLVIYDTNKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRAGAG DEADYYCQSWDLDFNTYVFGGGTKLTVLQPKAAPSVTLF PPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAG VETTTPSKQSNKKAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHE GSTVEKTVAPTECS
PN, кодирующий SEQ ID NO:73	77 caggtgcagctggtgcagtcaggcggcgaagtgaagaac ccggcgtcagtggaagtgctcctgtaagctagtgcta caccttactagctactacatgagctgggtgcgacaggcc cctggacaggcctggaatggatgggtggattaacccc tgaagggcaactaactacgccagaaatccaggccg agtgactatgactaggacactagcattagcaccgcctac atggaactgtctaggctgagatcagaggacaccgcctgt actactgctagagaagcatgtacttcgacatctgggg ccagggcacctggtgacagtgctctct

033643

PN, кодирующий SEQ ID NO: 74	78 agctacgagctgactcagccccctgagcgtgtcagtggccc tgggacagaccgctagaatcacctgtagcggcgactctat cggcgacaaatacgtgtactggtatcagcagaagcccggc caggccccctgctggtgatctacgacactaacaagcggc ctagcggcatccccgagcggtttagcggctctaatagcgg caacaccgctaccctgactattagtagggctcaggccggc gacgaggcggactactactgtcagtcattgggacctggact tcaacacctacgtgttcggcggaggcactaagctgaccgt gctg
PN, кодирующий SEQ ID NO: 75	79 caggtgcagctggtgcagtcaggcggcgaagtgaagaaac ccggcgctagtgtgaaggtgtcctgtaagctagtggcta caccttactagctactacatgagctgggtgacagggcc cctggacagggcctggaatggatgggctggattaaccccc tgaagggcaactaactacgcccagaaattccagggccg agtgactatgactagggacactagcattagcaccgcctac atggaactgtctaggctgagatcagaggacaccgccgtgt actactgctgtagagagcagcattctcgacatctgggg ccagggcaccctggtgacagtgctctctgctagcactaag ggccccctcgtgttcctctggccccctccagcaagtcta cctctggcggcaccgctgctctgggctgcctggtgaagga ctacttcctgagcctgtgacagtgctctggaactctggc gccctgacctccggcgtgcacaccttcctgccgtgctgc agtctccggcctgtactccctgtcctccgtggtgacagt gccttctccagcctgggcacccagacctatctgcaac gtgaaccacaagcctccaacaccaaggtggacaagcggg tggagcctaagtcattgc
PN, кодирующий SEQ ID NO: 76	80 agctacgagctgactcagccccctgagcgtgtcagtggccc tgggacagaccgctagaatcacctgtagcggcgactctat cggcgacaaatacgtgtactggtatcagcagaagcccggc caggccccctgctggtgatctacgacactaacaagcggc ctagcggcatccccgagcggtttagcggctctaatagcgg caacaccgctaccctgactattagtagggctcaggccggc gacgaggcggactactactgtcagtcattgggacctggact tcaacacctacgtgttcggcggaggcactaagctgaccgt gctgggccagcctaaggctgccccagcgtgacctgttc cccccagcagcggagcgtgcaggccaacaaggccaccc tgggtgctgatcagcagcttctaccagcggccgtgac cgtggcctggaaggccgacagcagccccgtgaaggccggc gtggagaccaccacccccagcaagcagagcaacaacaagt acgccgccagcagctacctgagcctgacccccgagcagtg gaagagccacaggtctacagctgccaggtgacccacgag ggcagcaccgtggaagaccgtggcccccaaccgagtgca gc
ЭПО человека NP_000790.2	81 apprlicdsrvlerylleakeaenittgcaehcslnenit vpdtkvnfyawkrmevqqavevwgglallseavlrqqal lvnssqpweplqlhvdkaavslrsittllralgaqkeais ppdaasaaplrtitadtfrklfrvysnflrgklklytgea crtgdr
ЭПО циномолгус Uniprot: P07865	82 apprlicdsrvlerylleakeaenvtmgcsescslnenit vpdtkvnfyawkrmevqqavevwgglallseavlrqqav lanssqpfepqlhmdkaisglrsittllralgaqeaaisl pdaasaaplrtitadtfcflfrvysnflrgklklytgeac rrgdr

ЭПО мыши NP_031968.1	83 apprlicdsrvleryileakeaenvtmgcaegprlrsnit vpdtkvnfyawkrmeveeqaievwqglsllseailqaqal lanssqppetlqlhidkaisglrsllrvlgaqkelms ppdtppaplrtiltvdtdfcklfrvyanflrgklklytgev crrgdr
ЭПО крысы NP_058697.1	84 apprlicdsrvleryileakeaenvtmgcaegprlrsnit vpdtkvnfyawkrmeveeqavevwqglsllseailqaqal qanssqpeslqlhidkaisglrs ltsllrvlgaqkelmsppdatqaaplrtiltadtfdcklfrv ysnflrgklklytgeacrrgdr
ЭПО кролика NP_001075559.1	85 Klatmgvrgrlallplallicllvlalglpvlgaparlicd svleryileakeaenvtmgcaegcslgenitvpdtkvnf hhwkseagrhavevwqglallseamlrsqallanssqpl etlqvhvdkaavsglrsllralgvqkeavsppeaassa aplrtaadtclcklfriysnflrgklklytgeacrrgdr
Спираль А из ЭПО, аминокислоты 4-26 из SEQ ID NO: 81	86 rlicdsrvlerylleakeaenit
Спираль В из ЭПО, аминокислоты 56-83 из SEQ ID NO: 81	87 vqqavevwqglallseavlrqgallvn
Спираль D из ЭПО, аминокислоты 138- 162 из SEQ ID NO: 81	88 frklfrvysnflrgklklytgeacr
Петля А-В из ЭПО, аминокислоты 27-55 из SEQ ID NO: 81	89 tgcaehcslnenitvpdtkvnfawkrme

Другие антитела по изобретению включают антитела, в которых аминокислоты или нуклеиновые кислоты, кодирующие эти аминокислоты, подверглись мутации, и при этом имеющие процент идентичности по меньшей мере 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 или 95% с последовательностями, как описано в табл. 1. Некоторые варианты осуществления включают мутантные аминокислотные последовательности, в которых мутации подверглись не более чем одна, две, три, четыре или пять аминокислот в переменных областях по сравнению с переменными областями, которые показаны в последовательности, описанной в табл. 1, при сохранении, по существу, такой же активности связывания антигена. Поскольку каждое из упомянутых антител может связываться с ЭПО, можно "сочетать и комбинировать" последовательности VH, VL, полноразмерной легкой цепи и полноразмерной тяжелой цепи (аминокислотные последовательности и нуклеотидные последовательности, кодирующие эти аминокислотные последовательности), чтобы создать другие ЭПО-связывающие антитела по изобретению. Такие ЭПО-связывающие антитела после их "сочетания и комбинирования" можно тестировать с использованием анализов связывания, известных в данной области (например, ELISA и других анализов, описанных в разделе примеров). После сочетания и комбинирования этих цепей последовательность VH из конкретной пары VH/VL должна быть заменена на структурно подобную последовательность VH. Подобным же образом полноразмерная последовательности тяжелой цепи из конкретной пары полноразмерной тяжелой цепи/полноразмерной легкой цепи должна быть заменена на структурно подобную полноразмерную последовательность тяжелой цепи. Аналогично, последовательность VL из конкретной пары VH/VL должна быть заменена на структурно подобную последовательность VL. Подобным же образом полноразмерная последовательность легкой цепи из конкретной пары полноразмерной тяжелой цепи/полноразмерной легкой цепи должна быть заменена на структурно подобную полноразмерную последовательность легкой цепи. Соответственно, в одном из аспектов изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему участку, в котором имеется переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, 33, 53 и 73, и переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 34, 54 и 74, при этом антитело специфично связывается с ЭПО (например, ЭПО обезьян циномогус ЭПО человека, крысы и/или мыши). Более конкретно, в некоторых аспектах изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему участку, в котором имеется переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи, содержащие аминокислотные после-

довательности, выбранные из SEQ ID NO: 13 и 14 соответственно. В других конкретных аспектах изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему участку, в котором имеется переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности, выбранные из SEQ ID NO: 33 и 34 соответственно. В других аспектах настоящее изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему участку, в котором имеется переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности, выбранные из SEQ ID NO: 53 и 54 соответственно. В других аспектах настоящее изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему участку, в котором имеется переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности, выбранные из SEQ ID NO: 73 и 74 соответственно.

В другом аспекте настоящее изобретение относится: (i) к выделенному антителу, в котором имеется полноразмерная тяжелая цепь, содержащая аминокислотную последовательность, которая была оптимизирована для экспрессии в клетке млекопитающего, выбранная из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15, 35, 55 и 75, и полноразмерная легкая цепь, содержащая аминокислотную последовательность, которая была оптимизирована для экспрессии в клетке млекопитающего, выбранная из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 36, 56 и 76; или (ii) к функциональному белку, содержащему его антигенсвязывающую часть. Более конкретно, в некоторых аспектах изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему участку, в котором имеется тяжелая цепь и легкая цепь, содержащие аминокислотные последовательности, выбранные из SEQ ID NO: 15 и 16 соответственно. В других конкретных аспектах изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему участку, в котором имеется тяжелая цепь и легкая цепь, содержащие аминокислотные последовательности, выбранные из SEQ ID NO: 35 и 36 соответственно. В других аспектах настоящее изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему участку, в котором имеется тяжелая цепь и легкая цепь, содержащие аминокислотные последовательности, выбранные из SEQ ID NO: 55 и 56 соответственно. В других аспектах настоящее изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему участку, в котором имеется тяжелая цепь и легкая цепь, содержащие аминокислотные последовательности, выбранные из SEQ ID NO: 75 и 76 соответственно.

Используемые в изобретении термины "область, определяющая комплементарность" и "CDR" относятся к последовательности аминокислот в переменных участках антитела, которые придают антигенную специфичность и аффинность связывания. В целом, существует три области CDR в каждом из переменных участков тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2, HCDR3) и три области CDR в каждом из переменных участков легкой цепи (LCDR1, LCDR2, LCDR3).

Точные границы аминокислотной последовательности заданной области CDR можно легко определить с помощью любой из ряда хорошо известных схем, в том числе с помощью схемы, описанной авторами Kabat et al. (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (схема нумерации по Kabat), Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273, 927-948 (схема нумерации по Chothia).

Например, в соответствии со схемой по Kabat, аминокислотные остатки CDR в переменном участке тяжелой цепи (VH) имеют нумерацию 31-35 (HCDR1), 50-65 (HCDR2) и 95-102 (HCDR3); и аминокислотные остатки CDR в переменном участке легкой цепи (VL) имеют нумерацию 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2) и 89-97 (LCDR3). В схеме по Chothia аминокислоты в CDR VH имеют нумерацию 26-32 (HCDR1), 52-56 (HCDR2) и 95-102 (HCDR3); и аминокислотные остатки в VL имеют нумерацию 26-32 (LCDR1), 50-52 (LCDR2) и 91-96 (LCDR3). При объединении определения CDR по обеим системам, по Kabat и Chothia, области CDR состоят из аминокислотных остатков 26-35 (HCDR1), 50-65 (HCDR2) и 95-102 (HCDR3) в VH человека, и из аминокислотных остатков 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2) и 89-97 (LCDR3) в VL человека.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к связывающимся с ЭПО антителам, которые содержат тяжелую цепь и легкую цепь областей CDR1, CDR2 и CDR3, как описано в табл. 1, или к их комбинации. Аминокислотные последовательности областей CDR1 VH из этих антител показаны в SEQ ID NO: 1, 21, 41 или 61. Аминокислотные последовательности областей CDR2 VH из этих антител и показаны в SEQ ID NO: 2, 22, 42 или 62. Аминокислотные последовательности областей CDR3 VH из этих антител показаны в SEQ ID NO: 3, 23, 43 или 63. Аминокислотные последовательности областей CDR1 VL из этих антител показаны в SEQ ID NO: 4, 24, 44 или 64. Аминокислотные последовательности областей CDR2 VL из этих антител показаны в SEQ ID NO: 5, 25, 45 или 65. Аминокислотные последовательности областей CDR3 VL из этих антител показаны в SEQ ID NO: 6, 26, 46 или 66. Границы этих CDR-областей определены с использованием системы Kabat.

Альтернативно, как определено с помощью системы Chothia (Al-Lazikani et al. (1997) JMB 273, 927-948), аминокислотные последовательности областей CDR1 VH из этих антител показаны в SEQ ID NO: 7, 27, 47 или 67. Аминокислотные последовательности областей CDR2 VH из этих антител показаны в SEQ ID NO: 8, 28, 48 или 68. Аминокислотные последовательности областей CDR3 VH из этих антител показаны в SEQ ID NO: 9, 29, 49 или 69. Аминокислотные последовательности областей CDR1 VL из этих антител показаны в SEQ ID NO: 10, 30, 50 или 70. Аминокислотные последовательности областей CDR2

VL из этих антител показаны в SEQ ID NO: 11, 31, 51 или 71. Аминокислотные последовательности областей CDR3 VL из этих антител показаны в SEQ ID NO: 12, 32, 52 или 72.

Учитывая, что каждое из упомянутых антител может связываться с ЭПО и что антигенсвязывающая специфичность обусловлена, прежде всего, областями CDR1, 2 и 3, можно "сочетать и комбинировать" последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из VH и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из VL (т.е. области CDR из разных антител можно сочетать и комбинировать, хотя каждое антитело предпочтительно будет содержать CDR1, CDR2 и CDR3 из VH и CDR1, CDR2 и CDR3 из VL для создания других связывающихся с ЭПО молекул по изобретению. Такие связывающиеся с ЭПО антитела после "сочетания и комбинирования" можно тестировать с использованием анализов связывания, известных в данной области, и анализов, описанных в разделе примеров (например, анализов ELISA, SET, Вiasoge). После сочетания и комбинирования последовательности VH CDR последовательность CDR1, CDR2 и/или CDR3 из конкретной последовательности VH должна быть заменена на структурно подобную последовательность (последовательности) CDR. Аналогичным образом, после сочетания и комбинирования последовательности VL CDR последовательность CDR1, CDR2 и/или CDR3 из конкретной последовательности VL должна быть заменена на структурно подобную последовательность (последовательности) CDR. Специалисту в данной области будет очевидно, что новые последовательности VH и VL для моноклональных антител по изобретению могут быть созданы путем замены одной или нескольких последовательностей из областей CDR VH и/или VL на структурно подобные последовательности, выбранные из последовательностей CDR, показанных в изобретении. В дополнение к вышесказанному в одном варианте осуществления антигенсвязывающие фрагменты антител, описанных в изобретении, могут содержать области CDR1, CDR2 и CDR3 из VH или CDR1, CDR2 и CDR3 из VL, при этом упомянутый фрагмент связывается с ЭПО как единый варибельный домен.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или их антигенсвязывающие фрагменты могут иметь последовательности тяжелых и легких цепей Fab, описанные в табл. 1. Более конкретно, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут иметь последовательность тяжелой и легкой цепи Fab NVS1, NVS2, NVS3 или NVS4.

В других вариантах осуществления изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфично связываются с ЭПО, содержат CDR1 варибельной области тяжелой цепи, CDR2 варибельной области тяжелой цепи, CDR3 варибельной области тяжелой цепи, CDR1 варибельной области легкой цепи, CDR2 варибельной области легкой цепи и CDR3 варибельной области легкой цепи согласно определению по Kabat и описанию в табл. 1. В других вариантах осуществления изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфично связываются с ЭПО, содержат CDR1 варибельной области тяжелой цепи, CDR2 варибельной области тяжелой цепи, CDR3 варибельной области тяжелой цепи, CDR1 варибельной области легкой цепи, CDR2 варибельной области легкой цепи и CDR3 варибельной области легкой цепи согласно определению по Chothia и описанию в табл. 1.

В конкретном варианте осуществления настоящее изобретение включает антитело, которое специфично связывается с ЭПО и содержит CDR1 варибельной области тяжелой цепи из SEQ ID NO: 1, CDR2 варибельной области тяжелой цепи из SEQ ID NO: 2, CDR3 варибельной области тяжелой цепи из SEQ ID NO: 3, CDR1 варибельной области легкой цепи из SEQ ID NO: 4, CDR2 варибельной области легкой цепи из SEQ ID NO: 5 и CDR3 варибельной области легкой цепи из SEQ ID NO: 6. В другом конкретном варианте осуществления настоящее изобретение включает антитело, которое специфично связывается с ЭПО и содержит CDR1 варибельной области тяжелой цепи из SEQ ID NO: 21, CDR2 варибельной области тяжелой цепи из SEQ ID NO: 22, CDR3 варибельной области тяжелой цепи из SEQ ID NO: 23, CDR1 варибельной области легкой цепи из SEQ ID NO: 24, CDR2 варибельной области легкой цепи из SEQ ID NO: 25 и CDR3 варибельной области легкой цепи из SEQ ID NO: 26. В другом конкретном варианте осуществления настоящее изобретение включает антитело, которое специфично связывается с ЭПО и содержит CDR1 варибельной области тяжелой цепи из SEQ ID NO: 41, CDR2 варибельной области тяжелой цепи из SEQ ID NO: 42, CDR3 варибельной области тяжелой цепи из SEQ ID NO: 43, CDR1 варибельной области легкой цепи из SEQ ID NO: 44, CDR2 варибельной области легкой цепи из SEQ ID NO: 45 и CDR3 варибельной области легкой цепи из SEQ ID NO: 46. В другом конкретном варианте осуществления настоящее изобретение включает антитело, которое специфично связывается с ЭПО и содержит CDR1 варибельной области тяжелой цепи из SEQ ID NO: 61, CDR2 варибельной области тяжелой цепи из SEQ ID NO: 62, CDR3 варибельной области тяжелой цепи из SEQ ID NO: 63, CDR1 варибельной области легкой цепи из SEQ ID NO: 64, CDR2 варибельной области легкой цепи из SEQ ID NO: 65 и CDR3 варибельной области легкой цепи из SEQ ID NO: 66.

В другом конкретном варианте осуществления настоящее изобретение включает антитело, которое специфично связывается с ЭПО и содержит CDR1 варибельной области тяжелой цепи из SEQ ID NO: 7, CDR2 варибельной области тяжелой цепи из SEQ ID NO: 8, CDR3 варибельной области тяжелой цепи из SEQ ID NO: 9, CDR1 варибельной области легкой цепи из SEQ ID NO: 10, CDR2 варибельной области легкой цепи из SEQ ID NO: 11 и CDR3 варибельной области легкой цепи из SEQ ID NO: 12. В другом конкретном варианте осуществления настоящее изобретение включает антитело, которое специ-

фично связывается с ЭПО и содержит CDR1 варибельной области тяжелой цепи из SEQ ID NO: 27, CDR2 варибельной области тяжелой цепи из SEQ ID NO: 28, CDR3 варибельной области тяжелой цепи из SEQ ID NO: 29, CDR1 варибельной области легкой цепи из SEQ ID NO: 30, CDR2 варибельной области легкой цепи из SEQ ID NO: 31 и CDR3 варибельной области легкой цепи из SEQ ID NO: 32. В другом конкретном варианте осуществления настоящее изобретение включает антитело, которое специфично связывается с ЭПО и содержит CDR1 варибельной области тяжелой цепи из SEQ ID NO: 47, CDR2 варибельной области тяжелой цепи из SEQ ID NO: 48, CDR3 варибельной области тяжелой цепи из SEQ ID NO: 49, CDR1 варибельной области легкой цепи из SEQ ID NO: 50, CDR2 варибельной области легкой цепи из SEQ ID NO: 51 и CDR3 варибельной области легкой цепи из SEQ ID NO: 52. В другом конкретном варианте осуществления настоящее изобретение включает антитело, которое специфично связывается с ЭПО и содержит CDR1 варибельной области тяжелой цепи из SEQ ID NO: 67, CDR2 варибельной области тяжелой цепи из SEQ ID NO: 68, CDR3 варибельной области тяжелой цепи из SEQ ID NO: 69, CDR1 варибельной области легкой цепи из SEQ ID NO: 70, CDR2 варибельной области легкой цепи из SEQ ID NO: 71 и CDR3 варибельной области легкой цепи из SEQ ID NO: 72.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает антитело или антигенсвязывающие фрагменты, которые специфично связываются с ЭПО, как показано в табл. 1. В предпочтительном варианте осуществления изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с ЭПО, представляют собой Fab NVS1, NVS2, NVS3 или NVS4.

Используемое в изобретении антитело человека содержит варибельные области тяжелой или легкой цепи или полноразмерные тяжелые или легкие цепи, которые "являются продуктом" или "происходят от" конкретной последовательности зародышевой линии, если эти варибельные области или полноразмерные цепи антитела были получены от системы, использующей гены иммуноглобулина человека зародышевой линии. Такие системы включают иммунизацию представляющим интерес антигеном трансгенной мыши, несущей гены иммуноглобулина человека, или скрининг библиотеки генов иммуноглобулина человека с фаговым дисплеем представляющего интерес антигена. Можно идентифицировать антитело человека, которое "является продуктом" или "происходит от" последовательности иммуноглобулина человека зародышевой линии, путем сравнения аминокислотной последовательности антитела человека с аминокислотными последовательностями иммуноглобулина человека зародышевой линии, и селекции последовательности иммуноглобулина человека зародышевой линии, которая наиболее близка по своей последовательности (т.е. имеет самый большой % идентичности) с последовательностью антитела человека. Антитело человека, которое "является продуктом" или "происходит от" конкретной последовательности иммуноглобулина человека зародышевой линии, может иметь различия в аминокислотах по сравнению с последовательностью зародышевой линии, например, обусловленные природными или соматическими мутациями или преднамеренной вставкой сайт-направленной мутации. Тем не менее, в каркасных участках VH или VL селектированное антитело человека обычно имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, кодируемой геном иммуноглобулина человека зародышевой линии, и содержит аминокислотные остатки, по которым антитело человека идентифицируется как человеческое по сравнению с аминокислотными последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии от других видов (например, последовательностями мыши зародышевой линии). В некоторых случаях антитело человека может быть идентично по аминокислотной последовательности по меньшей мере на 60, 70, 80, 90%, или по меньшей мере на 95%, или по меньшей мере даже на 96, 97, 98 или 99% аминокислотной последовательности, кодируемой геном иммуноглобулина зародышевой линии. Обычно рекомбинантное антитело человека будет проявлять не более 10 различий по аминокислотам в аминокислотной последовательности, кодируемой геном иммуноглобулина человека зародышевой линии в каркасных участках VH или VL. В некоторых случаях антитело человека будет проявлять не более 5 различий или даже не более 4, 3, 2 или 1 различия по аминокислотам в аминокислотной последовательности, кодируемой геном иммуноглобулина зародышевой линии. Примеры генов иммуноглобулина человека зародышевой линии включают без ограничения фрагменты варибельного домена зародышевой линии, описанные ниже, а также DP47 и DPK9.

Гомологичные антитела

Еще в одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему аминокислотные последовательности, которые гомологичны последовательностям, описанным в табл. 1, и при этом упомянутое антитело связывается с белком ЭПО (например, ЭПО обезьян циномолгус, ЭПО человека, крысы и/или мыши) и сохраняет желаемые функциональные свойства этих антител, как описано в табл. 1.

Например, настоящее изобретение относится к выделенному антителу или его функциональному антигенсвязывающему фрагменту, содержащему варибельный домен тяжелой цепи и варибельный домен легкой цепи, при этом варибельный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, 33, 53 и 73; варибельный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из

SEQ ID NO: 14, 34, 54 и 74; и упомянутое антитело специфично связывается с ЭПО (например, ЭПО обезьян циномоглус, ЭПО человека, крысы и/или мыши). В некоторых аспектах настоящего изобретения последовательности тяжелой и легкой цепей дополнительно содержат последовательности HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, что определено по системе Kabat, например, SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 и 6 соответственно; SEQ ID NO: 21, 22, 23, 24, 25 и 26 соответственно; SEQ ID NO: 41, 42, 43, 44, 45 и 46 соответственно или SEQ ID NO: 61, 62, 63, 64, 65 и 66 соответственно. В некоторых других аспектах изобретения последовательности тяжелой и легкой цепей дополнительно содержат последовательности HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, что определено по системе Chothia, например SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11 и 12 соответственно; SEQ ID NO: 27, 28, 29, 30, 31 и 32 соответственно; SEQ ID NO: 47, 48, 49, 50, 51 и 52 соответственно или SEQ ID NO: 67, 68, 69, 70, 71 и 72 соответственно.

В других вариантах осуществления VH и/или VL аминокислотные последовательности могут быть на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичны последовательностям, показанным в табл. 1. В других вариантах осуществления аминокислотные последовательности VH и/или VL могут быть идентичными за исключением аминокислотной замены не более чем в 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных позициях. Антитело, имеющее VH и VL области с высокой степенью идентичности (т.е. 80% или более) к VH и VL областям, которые описаны в табл. 1, может быть получено путем мутагенеза (например, сайт-направленного или ПЦР-опосредованного мутагенеза) молекул нуклеиновых кислот, кодирующих SEQ ID NO: 13, 33, 53 или 73 и SEQ ID NO: 14, 34, 54 или 74 соответственно, с последующим тестированием кодируемого измененного антитела на сохранение функций с помощью функциональных анализов, описанных в настоящем изобретении.

В других вариантах осуществления аминокислотные последовательности полноразмерной тяжелой цепи и/или полноразмерной легкой цепи могут быть на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичны последовательностям, показанным в табл. 1. Антитело, содержащее полноразмерную тяжелую цепь и полноразмерную легкую цепь, которое имеет высокую степень идентичности (т.е. 80% или более) с полноразмерными тяжелыми цепями любой из SEQ ID NO: 15, 35, 55 или 75 и с полноразмерными легкими цепями любой из SEQ ID NO: 16, 36, 56 или 76 может быть получено путем мутагенеза (например, сайт-направленного или ПЦР-опосредованного мутагенеза) молекул нуклеиновых кислот, кодирующих упомянутые полипептиды, с последующим тестированием кодируемых измененных антител на сохранение функции с помощью функциональных тестов, описанных в изобретении.

В других вариантах нуклеотидные последовательности полноразмерной тяжелой цепи и/или полноразмерной легкой цепи могут быть на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичны последовательностям, указанным в табл. 1.

В других вариантах осуществления нуклеотидные последовательности переменных областей тяжелой цепи и/или переменных областей легкой цепи могут быть на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичны последовательностям, указанным в табл. 1.

Используемый в настоящем изобретении процент идентичности между двумя последовательностями представляет собой функцию количества идентичных положений, общих для этих последовательностей (т.е. % идентичности равен количеству идентичных положений/от общего количества положений \times 100), с учетом количества пробелов и длины каждого пробела, которые должны быть введены для оптимального выравнивания двух последовательностей. Сравнение последовательностей и определение процента идентичности между двумя последовательностями можно проводить с использованием математического алгоритма, как описано в неограничивающих примерах.

Дополнительно или альтернативно, белковые последовательности настоящего изобретения можно также использовать в качестве "запрашиваемой последовательности", чтобы выполнить поиск в общедоступных базах данных, например, для установления родственных последовательностей. Например, такие запросы могут быть выполнены с помощью программы BLAST (версия 2.0) авторов Altschul et al., 1990 J. Mol. Biol. 215: 403-10.

Антитела с консервативными модификациями

В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению имеет переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, и переменную область легкой цепи, содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, при этом одна или несколько из указанных последовательностей CDR имеет определенные последовательности аминокислот на основе антител, описанных в изобретении, или их консервативных модификаций, и при этом эти антитела сохраняют желаемые функциональные свойства связывающихся с ЭПО антител по изобретению. Таким образом, изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему переменную область тяжелой цепи, которая содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, и переменную область легкой цепи, которая содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, и при этом аминокислотные последовательности CDR1 переменной области тяжелой цепи выбирают из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 21, 41 и 61 и их консервативных модификаций; аминокислотные последовательности CDR2 переменной области тяжелой цепи выбирают из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 22, 42 и 62, и их консервативных модификаций; аминокислотные последовательности CDR3 переменной области тяжелой цепи выбирают из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, 23, 43, и 63 и их

консервативных модификаций; аминокислотные последовательности CDR1 варибельной области легкой цепи выбирают из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 24, 44 и 64 и их консервативных модификаций; аминокислотные последовательности CDR2 варибельной области легкой цепи выбирают из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 25, 45 и 65 и их консервативных модификаций; аминокислотные последовательности CDR3 варибельной области легкой цепи выбирают из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 26, 46 и 66 и их консервативных модификаций; и антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфично связываются с ЭПО.

В других вариантах осуществления изобретения антитело по изобретению является оптимизированным для экспрессии в клетке млекопитающего и имеет полную последовательность тяжелой цепи и полную последовательность легкой цепи, при этом одна или несколько из этих последовательностей имеет определенные аминокислотные последовательности на основе антител, описанных в настоящем изобретении, или их консервативных модификаций, и при этом антитела сохраняют желаемые функциональные свойства связывающихся с ЭПО антител по изобретению. Таким образом, изобретение относится к выделенному антителу, оптимизированному для экспрессии в клетке млекопитающего, которое состоит из полноразмерной тяжелой цепи и полноразмерной легкой цепи, при этом полноразмерная тяжелая цепь имеет аминокислотные последовательности, выбранные из группы SEQ ID NO: 15, 35, 55 и 75, и их консервативные модификации; и полноразмерная легкая цепь имеет аминокислотные последовательности, выбранные из группы SEQ ID NO: 16, 36, 56 и 76, и их консервативные модификации; и антитело специфично связывается с ЭПО (например, с ЭПО обезьян циномоглус, ЭПО человека, крысы и/или мыши).

Антитела, которые связываются с одним и тем же эпитопом

Настоящее изобретение относится к антителам, которые связываются с тем же эпитопом, что и связывающиеся с ЭПО антитела, описанные в табл. 1. Следовательно, можно идентифицировать дополнительные антитела на основе их способности конкурировать (например, конкурентно ингибировать связывание статистически значимым образом) с другими антителами по изобретению, что определяют в анализах связывания с ЭПО (например, в анализах, которые описаны в разделе примеров). Способность тестируемого антитела ингибировать связывание антител по изобретению с белком ЭПО показывает, что тестируемое антитело может конкурировать с таким антителом за связывание с ЭПО; в соответствии с неограничивающей теорией такое антитело может связываться с тем же или с родственным эпитопом (например, структурно подобным или пространственно проксимальным) на белке ЭПО, как и антитело, с которым оно конкурирует. В конкретном варианте осуществления антитело, которое связывается с тем же эпитопом на ЭПО, как и антитело по настоящему изобретению, представляет собой моноклональное антитело человека. Такие моноклональные антитела человека могут быть получены и выделены согласно описанию в настоящем изобретении. Используемое в изобретении антитело "конкурирует" за связывание, если конкурирующее антитело ингибирует связывание ЭПО с антителом или с его антигенсвязывающим фрагментом по изобретению более чем на 50%, в присутствии эквимоллярной концентрации конкурирующего антитела.

В других вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты по изобретению связываются с доменом спирали D из ЭПО (аминокислоты 138-162 белка ЭПО, SEQ ID NO: 88). В других вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты по изобретению связываются с доменами спирали A (аминокислоты 4-26 белка ЭПО, SEQ ID NO: 86) и петли A-B из ЭПО (аминокислоты 27-55 белка ЭПО, SEQ ID NO: 89).

В других вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты по изобретению связываются с доменом спирали D из ЭПО (аминокислоты 138-162 ЭПО человека, SEQ ID NO: 88). В других вариантах осуществления выделенные антитела или антигенсвязывающие фрагменты связываются с доменом петли A-B (аминокислоты 27-55 ЭПО человека, SEQ ID NO: 89). В других вариантах осуществления выделенные антитела или антигенсвязывающие фрагменты связываются с доменами петли A-B (аминокислоты 27-55 ЭПО человека, SEQ ID NO: 89) и спирали A (аминокислоты 4-26 ЭПО человека; SEQ ID NO: 86). В других вариантах осуществления выделенные антитела или антигенсвязывающие фрагменты связываются с доменом спирали D из ЭПО (аминокислоты 138-162 ЭПО человека, SEQ ID NO: 88) и доменом петли A-B (аминокислоты 27-55 ЭПО человека, SEQ ID NO: 89) и спирали A (аминокислоты 4-26 ЭПО человека, SEQ ID NO: 86).

В других аспектах изобретения выделенные антитела или антигенсвязывающие фрагменты связываются с эпитопом, содержащим аминокислоты в положениях 44-50, 52, 53, 147, 150, 151, 154, 155, 159 и 162 ЭПО человека (SEQ ID NO: 81). В других аспектах изобретения выделенные антитела или антигенсвязывающие фрагменты связываются с эпитопом, содержащим аминокислоты в положениях 9, 13, 44-53, 147, 150, 151, 154, 155, 158, 159 и 162 ЭПО человека (SEQ ID NO: 81). В других аспектах изобретения выделенные антитела или антигенсвязывающие фрагменты связываются с эпитопом, содержащим аминокислоты в положениях 23, 43-50, 52, 53, 131, 143, 147, 150, 151, 154, 155, 159 и 162 ЭПО человека (SEQ

ID NO: 81). В конкретных аспектах настоящего изобретения выделенные антитела или антигенсвязывающие фрагменты связываются с эпитопом, содержащим аминокислоты Thr-Lys-Val-Asn-Phe-Tyr-Ala (в положениях 44-50), Lys-Arg (в положениях 52-53), Asn (в положении 147), Arg-Gly (в положениях 150-151), Lys-Leu (в положениях 154-155), Glu (в положении 159) и Arg (в положении 162) ЭПО человека (SEQ ID NO: 81). В других конкретных аспектах изобретения выделенные антитела или антигенсвязывающие фрагменты связываются с эпитопом, содержащим аминокислоты Ser (в положении 9), Glu (в положении 13), Thr-Lys-Val-Asn-Phe-Tyr-Ala (в положениях 44-50), Lys-Arg (в положениях 52-53), Asn (в положении 147), Arg-Gly (в положениях 150-151), Lys-Leu (в положениях 154-155), Gly (в положении 158), Glu (в положении 159) и Arg (в положении 162) из ЭПО человека (SEQ ID NO: 81). В других аспектах изобретения выделенные антитела или антигенсвязывающие фрагменты связываются с эпитопом, содержащим аминокислоты Glu (в положениях 23), Asp-Thr-Lys-Val-Asn-Phe-Tyr-Ala (в положениях 43-50), Lys-Arg (в положениях 52-53), Arg (в положении 131), Arg (в положении 143), Asn (в положении 147), Arg-Gly (в положениях 150-151), Lys-Leu (в позиции 154-155), Glu (в положении 159) и Arg (в положении 162) из ЭПО человека (SEQ ID NO: 81).

Изобретение также включает конформационный эпитоп на ЭПО человека, и указанный эпитоп содержит аминокислотные остатки Thr44, Lys45, Val46, Asn47, Phe48, Tyr49, Ala50, Lys52, Arg53, Asn147, Arg150, Gly151, Lys154, Leu155, Glu159 и Arg162, при этом антитело, связывающееся с эпитопом, будет ингибировать связывание ЭПО с ЭПО-рецептором. Также предполагается, что связывание антитела с эпитопом по изобретению будет дополнительно ингибировать ЭПО-зависимую клеточную пролиферацию.

Настоящее изобретение дополнительно включает конформационный эпитоп на ЭПО человека, и указанный эпитоп содержит аминокислотные остатки Ser9, Glu13, Thr44, Lys45, Val46, Asn47, Phe48, Tyr49, Ala50, Lys52, Arg53, Asn147, Arg150, Gly151, Lys154, Leu155, Gly158, Glu159 и Arg162, при этом связывание антитела с эпитопом будет ингибировать связывание ЭПО с ЭПО-рецептором. Также предполагается, что связывание антитела с эпитопом по изобретению будет дополнительно ингибировать ЭПО-зависимую клеточную пролиферацию.

Настоящее изобретение дополнительно включает конформационный эпитоп на ЭПО человека, и указанный эпитоп содержит аминокислотные остатки Glu23, Asp43, Thr44, Lys45, Val46, Asn47, Phe48, Tyr49, Ala50, Lys52, Arg53, Arg131, Arg143, Asn147, Arg150, Gly151, Lys154, Leu155, Glu159 и Arg162, при этом антитело, связывающееся с эпитопом, будет ингибировать связывание ЭПО с ЭПО-рецептором. Также предполагается, что связывание антитела с эпитопом по изобретению будет дополнительно ингибировать ЭПО-зависимую клеточную пролиферацию.

Генно-инженерные и модифицированные антитела

Антитело по изобретению также можно получать с использованием антитела, имеющего одну или несколько последовательностей из областей VH и/или VL, указанных в настоящем описании в качестве исходного материала, для конструирования модифицированного антитела, и упомянутое модифицированное антитело может иметь измененные свойства по сравнению с исходным антителом. Антитело можно конструировать путем модификации одного или нескольких остатков в одной или обеих переменных областях (т.е. VH и/или VL), например, в одной или нескольких областях CDR и/или в пределах одной или нескольких каркасных областей. Дополнительно или альтернативно, антитело можно конструировать путем модификации остатков в константной области (областях), например, для изменения эффекторной функции (функций) антитела.

Одним типом генно-инженерной технологии, которую можно выполнять с переменной областью, является имплантация CDR. Антитела взаимодействуют с антигенами-мишенями преимущественно посредством аминокислотных остатков, которые расположены в шести областях, определяющих комплементарность (CDR) в тяжелой и легкой цепи. По этой причине аминокислотные последовательности в CDR имеют более выраженное разнообразие между отдельными антителами, чем последовательности вне областей CDR. Поскольку последовательности CDR отвечают за большинство взаимодействий антиген-антитело, можно экспрессировать рекомбинантные антитела, которые имитируют свойства конкретных природных антител, путем конструирования векторов экспрессии, которые включают последовательности CDR из конкретного природного антитела, трансплантированного на каркасные последовательности из другого антитела с другими свойствами (см., например, Riechmann, L. et al., 1998, Nature 332:323-327; Jones, P. et al., 1986 Nature 321:522-525; Queen, C. et al., 1989 Proc. Natl. Acad., U.S.A. 86:10029-10033; патент США № 5225539 автора Winter, и патенты №№ 5530101; 5585089; 5693762 и 6180370 авторов Queen et al.).

Соответственно, другой вариант осуществления изобретения относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему переменную область тяжелой цепи, которая содержит последовательности CDR1, имеющие аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 21, 41 и 61; последовательности CDR2, имеющие аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 22, 42 и 62; последовательности CDR3, имеющие аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, 23, 43 и 63 соответственно; и переменную область легкой цепи, которая содержит последовательно-

сти CDR1, имеющие аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 24, 44 и 64; последовательности CDR2, имеющие аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 25, 45 и 65; и последовательности CDR3, имеющие аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 26, 46 и 66 соответственно. Таким образом, упомянутые антитела содержат последовательности CDR областей VH и VL из моноклональных антител, вместе с тем, они могут содержать разные каркасные последовательности из этих антител.

Альтернативно, другой вариант осуществления изобретения относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит последовательности CDR1, имеющие аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, 27, 47 и 67; последовательности CDR2, имеющие аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 28, 48 и 68; последовательности CDR3, имеющие аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9, 29, 49 и 6, соответственно; и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательности CDR1, имеющие аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 30, 50 и 70; последовательности CDR2, имеющие аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11, 31, 51 и 71; и последовательности CDR3, состоящие из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 32, 52 и 72 соответственно. Таким образом, упомянутые антитела содержат последовательности CDR областей VH и VL из моноклональных антител, вместе с тем, они могут содержать разные каркасные последовательности из этих антител.

Такие каркасные последовательности могут быть получены из общедоступных баз данных ДНК или из опубликованных данных, которые включают последовательности зародышевой линии гена антитела. Например, зародышевые последовательности ДНК для генов вариабельной области тяжелой и легкой цепи человека можно найти в базе данных последовательностей человека зародышевой линии "VBase" (доступной в интернете: mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase), а также как в публикациях Kabat, E.A., et al., 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, пятое издание, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Tomlinson, I.M., et al., 1992 J. Mol. Biol. 227:776-798; и Cox, J.P.L. et al., 1994 Eur. J. Immunol., 24: 827-836; содержание каждой из которых включено в изобретение в качестве ссылки.

Примерами каркасных последовательностей для использования в антителах по изобретению являются последовательности, которые структурно подобны каркасным последовательностям, которые используются в выбранных антителах по изобретению, например консенсусные последовательности и/или каркасные последовательности, используемые в моноклональных антителах по изобретению. Последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из областей VH и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 из VL-области могут быть трансплантированы на каркасные области, которые имеют последовательность, идентичную той, которую выявили в гене иммуноглобулина зародышевой линии, из которой происходит каркасная последовательность, или последовательности CDR могут быть трансплантированы на каркасные области, которые содержат одну или несколько мутаций по сравнению с последовательностями зародышевой линии. Например, было обнаружено, что в некоторых случаях имеет преимущество мутация остатков в каркасных областях для сохранения или улучшения способности антитела к связыванию антигена (см., например, патенты США №№ 5530101, 5585089, 5693762 и 6180370 авторов Queen et al.). Каркасы, которые можно использовать в качестве матриц, на которых конструируются антитела и антигенсвязывающие фрагменты по изобретению, включают без ограничения VH1A, VH1B, VH3, Vk1, VI2 и Vk2. Дополнительные каркасы известны в данной области и могут быть найдены, например, в базе данных Vbase в интернете: vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/index.php?&MMN_position=1:1.

Соответственно, вариант осуществления настоящего изобретения относится к выделенным антителам, связывающимся с ЭПО, или к их антигенсвязывающим фрагментам, которые содержат вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, 33, 53 и 73, или аминокислотную последовательность, имеющую одну, две, три, четыре или пять аминокислотных замен, делеций или дополнений в каркасной области таких последовательностей, и дополнительно содержащим вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 34, 54 и 74, или аминокислотную последовательность, имеющую одну, две, три, четыре или пять аминокислотных замен, делеций или дополнений в каркасной области таких последовательностей.

Другим типом модификации вариабельной области является мутация аминокислотных остатков в пределах областей CDR1, CDR2 и/или CDR3 из областей VH и/или VL для улучшения в представляющем интерес антителе одного или нескольких свойств связывания (например, аффинности), что называется "созреванием аффинности". Можно проводить сайт-направленный мутагенез или ПЦР-опосредованный мутагенез для введения мутации (мутаций), и воздействие на связывание антитела или на другое функциональное свойство, представляющее интерес, можно оценивать в анализах *in vitro* или *in vivo*, которые описаны в изобретении и приведены в разделе примеров. Можно вводить консервативные модификации (как описано выше). Мутации могут представлять собой замены, добавления или де-

лации аминокислот. Кроме того, изменения обычно выполняют не более чем в одном, двух, трех, четырех или пяти остатках в области CDR.

Соответственно, в другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к выделенным антителам, связывающимся с ЭПО, или к их антигенсвязывающим фрагментам, состоящим из варибельной области тяжелой цепи, имеющей область CDR1 из VH, которая состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, имеющей SEQ ID NO: 1, 21, 41 и 61, или из аминокислотной последовательности, имеющей одну, две, три, четыре или пять аминокислотных замен, делеций или добавлений, по сравнению с SEQ ID NO: 1, 21, 41 или 61; область CDR2 из VH, имеющей аминокислотную последовательность, выбранную из группы, которая состоит из SEQ ID NO: 2, 22, 42 и 62, или аминокислотную последовательность, имеющую одну, две, три, четыре или пять аминокислотных замен, делеций или добавлений, по сравнению с SEQ ID NO: 2, 22, 42 или 62; область CDR3 из VH, имеющей аминокислотную последовательность, выбранную из группы, которая состоит из SEQ ID NO: 3, 23, 43 и 63 или аминокислотную последовательность, имеющую одну, две, три, четыре или пять аминокислотных замен, делеций или добавлений, по сравнению с SEQ ID NO: 3, 23, 43 или 63; область CDR1 из VL, имеющей аминокислотную последовательность, выбранную из группы, которая состоит из SEQ ID NO: 4, 24, 44 и 64, или аминокислотную последовательность, имеющую одну, две, три, четыре или пять аминокислотных замен, делеций или добавлений, по сравнению с SEQ ID NO: 4, 24, 44 или 64; область CDR2 из VL, имеющей аминокислотную последовательность, выбранную из группы, которая состоит из SEQ ID NO: 5, 25, 45 и 65, или аминокислотную последовательность, имеющую одну, две, три, четыре или пять аминокислотных замен, делеций или добавлений, по сравнению с SEQ ID NO: 5, 25, 45 или 65; и область CDR3 из VL, имеющей аминокислотную последовательность, выбранную из группы, которая состоит из SEQ ID NO: 6, 26, 46 и 66, или аминокислотную последовательность, имеющую одну, две, три, четыре или пять аминокислотных замен, делеций или добавлений, по сравнению с SEQ ID NO: 6, 26, 46 или 66.

Соответственно, в другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к выделенным антителам, связывающимся с ЭПО, или к их антигенсвязывающим фрагментам, состоящим из варибельной области тяжелой цепи, которые имеют область CDR1 из VH, состоящую из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, имеющей SEQ ID NO: 7, 27, 47 и 67, или из аминокислотной последовательности, имеющей одну, две, три, четыре или пять аминокислотных замен, делеций или добавлений, по сравнению с SEQ ID NO: 7, 27, 47 или 67; область CDR2 из VH, имеющей аминокислотную последовательность, выбранную из группы, которая состоит из SEQ ID NO: 8, 28, 48 и 68, или аминокислотную последовательность, имеющую одну, две, три, четыре или пять аминокислотных замен, делеций или добавлений, по сравнению с SEQ ID NO: 8, 28, 48 или 68; область CDR3 из VH, имеющей аминокислотную последовательность, выбранную из группы, которая состоит из SEQ ID NO: 9, 29, 49 и 69, или аминокислотную последовательность, имеющую одну, две, три, четыре или пять аминокислотных замен, делеций или добавлений, по сравнению с SEQ ID NO: 9, 29, 49 или 69; область CDR1 из VL, имеющей аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 30, 50 и 70, или аминокислотную последовательность, имеющую одну, две, три, четыре или пять аминокислотных замен, делеций или добавлений по сравнению с SEQ ID NO: 10, 30, 50 или 70; область CDR2 из VL, имеющей аминокислотную последовательность, выбранную из группы, которая состоит из SEQ ID NO: 11, 31, 51 и 71, или аминокислотную последовательность, имеющую одну, две, три, четыре или пять аминокислотных замен, делеций или добавлений по сравнению с SEQ ID NO: 11, 31, 51 или 71; и область CDR3 из VL, имеющей аминокислотную последовательность, выбранную из группы, которая состоит из SEQ ID NO: 12, 32, 52 и 72, или аминокислотную последовательность, имеющую одну, две, три, четыре или пять аминокислотных замен, делеций или добавлений по сравнению с SEQ ID NO: 12, 32, 52 или 72.

Имплантация антигенсвязывающих доменов в альтернативные каркасы или матрицы

Широкое разнообразие каркасов или матриц для антител/иммуноглобулинов можно использовать при условии, что полученный полипептид включает по меньшей мере один связывающий участок, который специфично связывается с ЭПО. Такие каркасы или матрицы включают пять основных идиотипов иммуноглобулинов человека или их фрагментов и включают иммуноглобулины других видов животных, предпочтительно имеющие гуманизированные элементы. В этой связи особый интерес представляют антитела с единственной тяжелой цепью, такие как выявленные у верблюдов антитела. Специалисты в данной области продолжают открытие и разработку новых каркасов, матриц и фрагментов.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к созданию антител на неиммуноглобулиновой основе с использованием неиммуноглобулиновых матриц, на которые могут быть трансплантированы области CDR по изобретению. Могут использоваться известные или разработанные в будущем неиммуноглобулиновые каркасы и матрицы, при условии, что они содержат связывающую область, специфичную для целевого белка ЭПО. Известные неиммуноглобулиновые каркасы или матрицы включают без ограничения фибронектин (Compound Therapeutics, Inc., Waltham, MA), ангикирин (Molecular Partners AG, Цюрих, Швейцария), доменные антитела (Domantis, Ltd., Cambridge, MA, и Ablynx nv, Zwijnaarde, Бельгия), липокалин (Pieris Proteolab AG, Freising, Германия), малые модульные иммунофармацевтические препараты (Trubion Pharmaceuticals Inc., Сиэтл, Вашингтон), макситела (Avidia, Inc., Mountain View, CA), протеин А (Affibody AG, Швеция), аффилин (γ -кристаллин или убикитин) (SCIL

Proteins GmbH, Halle, Германия).

Фибронектиновые каркасы основаны на домене фибронектина типа III (например, десятый модуль типа фибронектина III (10 Fn3 домен)). Домен фибронектина типа III имеет 7 или 8 β -цепей, которые распределяются между двумя β -листами, которые сами по себе упакованы друг против друга с образованием ядра белка и дополнительно содержат петли (аналогично CDR), которые соединяют β -цепи друг с другом и подвергаются воздействию растворителя. Существуют по меньшей мере три таких петли на каждом краю сэндвича из β -листов, при этом край является границей белка, перпендикулярной к направлению β -цепей (см. патент США 6818418). Эти матрицы на основе фибронектина не являются иммуноглобулиновыми, хотя общая упаковка тесно связана с упаковкой наименьшего функционального фрагмента антитела, варибельной области тяжелой цепи, которая полностью содержит блок распознавания антигена в IgG верблюда и ламы. Благодаря этой структуре неиммуноглобулиновое антитело имитирует свойства связывания антигена, которые подобны по своей природе и аффинности со свойствами антител. Эти матрицы можно использовать в стратегии рандомизации и перестановки петли *in vitro*, которая сходна с феноменом созревания аффинности антител *in vivo*. Эти молекулы на основе фибронектина можно использовать в качестве матриц, в которых петлевые участки молекулы можно заменять на области CDR по изобретению с использованием стандартных способов клонирования.

Анкириновые технологии основаны на использовании белков с модулями повторов анкиринового происхождения в качестве матриц, несущих варибельные области, которые могут быть использованы для связывания с различными мишенями. Модуль анкиринового повтора представляет собой полипептид из 33 аминокислот, состоящий из двух антипараллельных α -спиралей и β -петли. Связывание варибельных областей в основном оптимизировано с помощью рибосомного дисплея.

Авимеры получают из встречающегося в природе белка, содержащего A-домен, такого как LRP-1. Эти домены используются в естественных условиях для взаимодействий типа белок-белок, и у человека A-домены являются структурной основой более чем 250 белков. Авимеры состоят из нескольких разных мономеров "A-домена" (2-10), сцепленных посредством аминокислотных линкеров. Можно создавать авимеры, которые могут связываться с антигеном-мишенью, с использованием методологии, описанной, например, в опубликованных патентных заявках США №№ 20040175756, 20050053973, 20050048512 и 20060008844.

Аффинные лиганды аффител представляют собой небольшие простые белки, состоящие из трех-спирального пучка, основой которого является матрица одного из IgG-связывающих доменов протеина A. Протеин A представляет собой поверхностный белок из бактерии *Staphylococcus aureus*. Этот каркасный домен состоит из 58 аминокислот, 13 из которых рандомизированно использовали для создания библиотек аффител с большим количеством вариантов лигандов (см., например, патент US 5831012). Молекулы аффител имитируют антитела, их молекулярная масса составляет 6 кДа в сравнении с молекулярной массой антител, которая составляет 150 кДа. Несмотря на небольшой размер, сайт связывания молекул аффител подобен сайту связывания антитела.

Антикалины представляют собой продукты, разработанные компанией Pieris ProteoLab AG. Их получают из липокалинов, широко распространенной группы небольших и эффективных белков, которые обычно задействованы в физиологическом транспорте или используются при хранении чувствительных к химическим агентам или нерастворимых соединений. Несколько встречающихся в природе липокалинов обнаружено в тканях или жидкостях организма человека. Архитектура белка напоминает иммуноглобулины с гиперварибельными петлями на верхней части жесткого каркаса. Вместе с тем, в отличие от антител или их рекомбинантных фрагментов липокаины состоят из одиночной полипептидной цепи с аминокислотными остатками в количестве от 160 до 180, что лишь незначительно больше, чем одиночный домен иммуноглобулина. Набор из четырех петель, которые образуют связывающий карман, обладает выраженной структурной пластичностью и допускает широкое разнообразие боковых цепей. Таким образом, с помощью подходящего способа, сайту связывания можно придавать новую форму, предназначенную для распознавания с высокой аффинностью и специфичностью заранее определенных молекул-мишеней различной формы. Один из белков семейства липокалинов, связывающий билин белок (BBP) из *Pieris brassicae* (капустная белянка), использовали для создания антикалинов путем мутагенеза, затрагивающего четыре петли. Примером патентной заявки, в которой описаны антикалины, является PCT WO 1999/16873.

Молекулы аффилина представляют собой небольшие неиммуноглобулиновые белки, которые разработаны для достижения свойств специфичной аффинности к белкам и небольшим молекулам. Новые молекулы аффилина можно очень быстро отбирать из двух библиотек, каждая из которых основана на разных белках-матрицах человеческого происхождения. Молекулы аффилина не обладают какой-либо структурной гомологией с белками иммуноглобулинов. В настоящее время применяют две аффилиновых матрицы, одной из которых является γ -кристаллин, структурный белок хрусталика глаза человека, и другая представляет собой белки суперсемейства убиквитина. Обе матрицы человеческого происхождения имеют очень малый размер, показывают высокую устойчивость к температуре и практически устойчивы к изменениям значений pH и действию денатурирующих агентов. Такая высокая стабильность главным

образом обусловлена обширной β -складчатой структурой белков. Примеры белков, происходящих из γ -кристаллина, описаны в патенте WO 2001/04144, и примеры "убиквитиноподобных" белков описаны в патенте WO 2004/106368.

Белки - эпитопные миметики (РЕМ) имеют средний размер, циклические, пептидоподобные молекулы (с молекулярной массой 1-2 кДа) и имитируют β -шпильчатые вторичные структуры белков, представляющие собой главную вторичную структуру, вовлеченную во взаимодействия белок-белок.

Настоящее изобретение относится к полностью антителам человека, которые специфично связываются с белком ЭПО. По сравнению с химерными или гуманизированными антителами, связывающиеся с ЭПО антитела человека по изобретению имеют дополнительно уменьшенную антигенность при введении человеку.

Антитела верблюда.

Белки антител, полученные из представителей семейства двугорбых и одногорбых верблюдов (*Camelus bactrianus* и *Camelus dromaderius*), включающих представителей животных Нового Света, таких как разные виды лам (*Lama pacos*, *Lama glama* и *Lama vicugna*), были изучены в отношении их размера, сложности структуры и антигенности относительно человека. Было выявлено, что некоторые антитела типа IgG из этого семейства млекопитающих в естественных условиях не имеют легких цепей и поэтому отличаются по структуре от типичной четвертичной структуры, которая состоит из четырех цепей, с двумя тяжелыми и двумя легкими цепями, что характерно для антител из других животных. См. PCT/EP 93/02214 (WO 94/04678, опубликовано 3 марта 1994 г.).

Участок антитела верблюда, представляющий собой небольшой одиночный переменный домен, обозначаемый VHH, можно получать генно-инженерным способом с получением небольшого белка, обладающего высокой аффинностью к мишени, что приводит к созданию низкомолекулярного выведенного из антитела белка, называемого "нанотелом верблюда" (см. патент США 5759808, выданный 2 июня 1998 г.; см. также публикации Stijlemans, B. et al., 2004 J. Biol. Chem. 279: 1256-1261; Dumoulin, M. et al., 2003 Nature 424: 783-788; Pleschberger, M. et al. 2003 Bioconjugate Chem. 14: 440-448; Cortez-Retamozo, V. et al. 2002, Int. J. Cancer 89: 456-62; и Lauwereys, M. et al. 1998 EMBO J. 17: 3512-3520). Сконструированные библиотеки антител верблюда и фрагментов антител доступны на коммерческой основе, например, от фирмы Ablunx, Гент, Бельгия. Аналогично другим антителам нечеловеческого происхождения, аминокислотную последовательность антитела верблюда можно изменять рекомбинантным способом с получением последовательности, которая в большей степени близка к последовательности человека, т.е. это нанотело можно "гуманизировать". Таким образом, можно дополнительно понижать естественную низкую антигенность антител верблюда для людей.

Нанотело верблюда имеет молекулярную массу, составляющую примерно одну десятую от молекулярной массы IgG человека, и физический диаметр этого белка составляет лишь несколько нанометров. С таким небольшим размером связана способность антител верблюда связываться с антигенными сайтами, которые являются функционально невидимыми для более крупных белковых антител, т.е. нанотела верблюда являются полезными в качестве реагентов детекции антигенов, которые в ином случае остаются скрытыми при использовании классических иммунологических методик, и возможно, полезными в качестве терапевтических агентов. Таким образом, другим связанным с малым размером свойством нанотела верблюда является способность ингибировать связывание со специфическим сайтом в бороздке или узкой расщелине белка-мишени, и, следовательно, нанотело верблюда может действовать в качестве субстанции, более напоминающей по своей функции классическое низкомолекулярное лекарственное средство, чем классическое антитело.

Низкая молекулярная масса и компактный размер нанотел верблюда также обуславливают очень высокую термостабильность, стабильность при экстремальных значениях pH, стабильность к протеолитическому расщеплению и низкую антигенность. Еще одно свойство нанотел верблюда приводит к тому, что они легко проникают из циркуляторного русла в ткани и даже проникают через гематоэнцефалический барьер, т.е. их можно применять для лечения заболеваний с поражением нервной ткани. Также нанотела могут облегчать транспорт лекарственных средств через гематоэнцефалический барьер (см. патентную заявку США 20040161738, опубликованную 19 августа 2004 г.). Указанные признаки в сочетании с низкой антигенностью для людей свидетельствуют об их большом терапевтическом потенциале. Кроме того, эти молекулы могут полностью экспрессироваться в прокариотических клетках, таких как *E.coli*, и экспрессироваться в виде белков, слитых с бактериофагом, и они являются функционально активными.

Таким образом, признаком настоящего изобретения является антитело или нанотело верблюда, имеющее высокую аффинность к ЭПО. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело или нанотело верблюда естественным образом продуцируется в животном - верблюде, т.е. его вырабатывает верблюд после иммунизации с ЭПО или его пептидным фрагментом, с использованием способов, описанных в изобретении в отношении других антител. Альтернативно, связывающееся с ЭПО нанотело верблюда конструируют, т.е. получают путем селекции, например, из фаговой библиотеки с дисплеем мутагенизированных подходящим образом белков нанотела верблюда с использованием методик пенинга с ЭПО в качестве мишени, как описано в разделе примеров настоящего изобретения. Скон-

струированные нанотела можно дополнительно адаптировать с помощью генной инженерии, чтобы они имели период полувыведения у получающего их индивида от 45 мин до двух недель. В конкретном варианте осуществления антители или нанотела верблюда получают путем имплантации последовательностей из областей CDR из тяжелой или легкой цепи антител человека по изобретению в последовательности нанотела или каркасные последовательности однодоменного антитела, согласно описанию, например, в патенте WO 1994/004678.

Биспецифичные молекулы и поливалентные антители

В другом аспекте настоящее изобретение относится к биспецифичным или мультиспецифичным молекулам, содержащим ЭПО-связывающее антители или его фрагмент по изобретению. Антители по изобретению или его антигенсвязывающие участки могут быть дериватизированы или сцеплены с другой функциональной молекулой, например с другим пептидом или белком (например, с другим антителом или лигандом для рецептора), для создания биспецифичной молекулы, которые связываются по меньшей мере с двумя разными сайтами связывания или молекулами-мишенями. Антители по изобретению можно фактически дериватизировать или присоединять более чем к одной другой функциональной молекуле для создания мультиспецифичных молекул, которые связываются более чем с двумя разными сайтами связывания и/или молекулами-мишенями; такие мультиспецифичные молекулы также охватываются термином "биспецифичные молекулы", который используется в настоящем изобретении. Для создания биспецифичной молекулы по изобретению антители по изобретению может быть функционально связано (например, путем химического связывания, генетического слияния, нековалентной ассоциации или иным образом) с одной или несколькими другими связывающими молекулами, такими как другое антители, фрагмент антитела, пептид или связывающий миметик, таким образом, чтобы в результате получить биспецифичную молекулу.

Таким образом, настоящее изобретение включает биспецифичные молекулы, содержащие по меньшей мере одну первую специфичность связывания для ЭПО и вторую специфичность связывания для второго целевого эпитопа. Например, второй целевой эпитоп представляет собой другой эпитоп ЭПО, отличающийся от первого целевого эпитопа.

Дополнительно для изобретения, в котором упомянутая биспецифичная молекула является мультиспецифичной, эта молекула может дополнительно включать третью специфичность связывания, в дополнение к первому и второму целевому эпитопу.

В одном варианте осуществления биспецифичные молекулы по изобретению содержат в качестве специфичности связывания по меньшей мере одно антители или фрагмент этого антитела, в том числе, например, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv или одноцепочечный Fv. Антители также может представлять собой димер легкой цепи или тяжелой цепи или любое их минимальный фрагмент, такой как Fv, или одноцепочечную конструкцию, как описано авторами Ladner et al. в патенте США № 4946778.

Диатела представляют собой двухвалентные биспецифичные молекулы, в которых домены VH и VL экспрессируются на одной полипептидной цепи и соединены посредством линкера, который является слишком коротким, чтобы позволить спаривание между двумя доменами на одной и той же цепи. Домены VH и VL спариваются с комплементарными доменами другой цепи, создавая тем самым два антигенсвязывающих участка (см., например, публикации Holliger et al., 1993 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak et al., 1994 Structure 2:1121-1123). Диатела могут быть получены путем экспрессии двух полипептидных цепей или со структурами VHA-VLB и VHB-VLA (конфигурация VH-VL), или VLA-VHB и VLB-VHA (конфигурация VL-VH) в той же самой клетке. Большинство из них может экспрессироваться в бактерии в растворимой форме. Одноцепочечные диатела (scDb) получают путем соединения двух полипептидных цепей, образующих диатело, с линкером приблизительно в 15 аминокислотных остатков (см. Holliger and Winter, 1997 Cancer Immunol. Immunother., 45(3-4): 128-30; Wu et al., 1996 Immunotechnology, 2(1):21-36). Можно экспрессировать scDb в бактериях в растворимой, активной мономерной форме (см. Holliger and Winter, 1997 Cancer Immunol. Immunother., 45 (34):128-30; Wu et al., 1996 Immunotechnology, 2(1):21-36; Pluckthun and Pack, 1997 Immunotechnology, 3(2):83-105; Ridgway et al., 1996 Protein Eng., 9(7):617-21). Диатело может быть слито с Fc для создания "дидиатела" (см. Lu et al., 2004, J. Biol. Chem., 279(4):2856-65).

Другие антители, которые можно использовать в биспецифичных молекулах по изобретению, представляют собой мышинные, химерные и гуманизированные моноклональные антители.

Биспецифичные молекулы можно получать путем конъюгации элементов, составляющих специфичности связывания, с помощью известных в данной области способов. Например, каждую специфичность связывания биспецифичной молекулы можно создавать по отдельности и затем конъюгировать друг с другом. Если специфичностью связывания являются белки или пептиды, можно использовать множество связывающих или сшивающих агентов для ковалентной конъюгации. Примеры сшивающих агентов включают протеин А, карбодиимид, N-сукцинимидил-S-ацетил-тиоацетат (SATA), 5,5'-дителибис-(2-нитробензойную кислоту) (DTNB), o-фенилендималеимид (OPDM), N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP) и сульфосукцинимидил 4-(N-малеимидометил)циклогексан-L-карбоксилат (сульфо-SMCC) (см., например, Karpovsky et al., 1984 J. Exp. Med. 160:1686; Liu, M.A. et al., 1985 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 8648). Другие способы включают агенты, описанные в публикациях

Paulus, 1985 Behring Ins. Mitt. No. 78, 118-132; Brennan et al., 1985 Science 229:81-83 и Glennie et al., 1987 J. Immunol. 139:2367-2375. Конъюгирующие агенты SATA и сульфо-SMCC доступны в компании Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

Если специфичностью связывания являются антитела, их можно конъюгировать посредством сульфгидрильной связи из С-конца шарнирных областей двух тяжелых цепей. В конкретном варианте осуществления шарнирную область перед конъюгированием подвергают модификации, чтобы она содержала нечетное число сульфгидрильных остатков, например один остаток.

Альтернативно, обе связывающие специфичности могут кодироваться в одном векторе и экспрессироваться и собираться в одной и той же клетке-хозяине. Этот способ особенно полезен, если биспецифичная молекула представляет собой слитый белок mAb × mAb, mAb × Fab, Fab × F(ab')₂ или лиганд × Fab. Биспецифичная молекула по изобретению может представлять собой одноцепочечную молекулу, содержащую одноцепочечное антитело и детерминанту связывания, или одноцепочечную молекулу, содержащую две детерминанты связывания. Биспецифичные молекулы могут содержать по меньшей мере две одноцепочечные молекулы. Способы получения биспецифичных молекул описаны, например, в патентах США №№ 5260203, 5455030, 4881175, 5132405, 5091513, 5476786, 5013653, 5258498 и 5482858.

Связывание биспецифичных молекул с их специфичными мишенями можно верифицировать, например, с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), радиоиммуноанализа (РЭА), анализа диаграммы рассеяния возбужденной флуоресценции сортированных клеток (FACS), биоанализа (например, по ингибированию роста) или Вестерн-блот анализа. Каждый из этих анализов обычно представляет собой детекцию присутствия комплекса белок-антитело, представляющего конкретный интерес, с помощью меченого реагента (например, антитела), специфичного для рассматриваемого комплекса.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к поливалентным соединениям, содержащим по меньшей мере два идентичных или разных антигенсвязывающих участка антител по изобретению, которые связываются с ЭПО. Антигенсвязывающие участки могут быть связаны друг с другом посредством гибридного белка или ковалентной или нековалентной связи. Альтернативно, описаны способы связи для биспецифичных молекул.

Четырехвалентные соединения можно получать, например, путем сшивания антител по изобретению с антителом, которое связывается с константными областями антител по изобретению, например с Fc или шарнирной областью.

Тримеризующий домен описан, например, в патенте Borean EP 1012280 B1. Пентамеризующие модули описаны, например, в патенте WO 1998/018943.

Антитела с увеличенным периодом полувыведения

Настоящее изобретение относится к антителам, специфично связывающимся с белком ЭПО, который имеет увеличенный период полувыведения *in vivo*.

Многие факторы могут повлиять на период полувыведения белка *in vivo*, например почечная фильтрация, метаболизм в печени, расщепление протеолитическими ферментами (протеазами) и иммуногенные реакции (например, нейтрализация белка антителами и захват макрофагами и дендритными клетками). Для продления периода полувыведения антител по настоящему изобретению можно использовать разнообразные стратегии. Например, такое продление осуществляют с помощью химического присоединения к полиэтиленгликолю (ПЭГ), технологии реконструирующего химически ортогонального направленного конструирования геCODE ПЭГ, матрицы антитела, полисиаловой кислоты (ПСК), гидроксипроцера (ГЭК), альбуминсвязывающих лигандов и углеводных щитов; путем генетического слияния связывающих белков с сывороточными белками, такими как альбумин, IgG, FcRn, и их переноса; путем сцепления (генетического или химического) с другими связывающими функциональными группами, которые связываются с белками сыворотки крови, такими как нанотела, Fab, белки DARP, авимеры, аффитела и антикарины; с помощью генного слияния с гПЭГ, альбумином, доменом альбумина, альбуминсвязывающими белками и Fc; или путем включения в наноносители, препараты с замедленным высвобождением или медицинские устройства.

Для продления циркуляции антител в сыворотке *in vivo* можно присоединять к антителам или их фрагменту инертные полимерные молекулы, такие как высокомолекулярный полиэтиленгликоль (ПЭГ), с помощью многофункционального линкера или без линкера, или посредством сайт-специфичной конъюгации с ПЭГ к N-концу или к С-концу антител, или с помощью эписилон-аминогрупп, присутствующих на лизиновых остатках. Для пегилирования антитела это антитело или его фрагмент обычно подвергают взаимодействию с ПЭГ, например с активным эфирным или альдегидным производным ПЭГ, в условиях, когда одна или несколько групп ПЭГ присоединяется к антителу или к фрагменту антитела. Пегилирование можно осуществлять с помощью реакции ацилирования или реакции алкилирования с реакционноспособной молекулой ПЭГ (или с аналогичным реакционноспособным водорастворимым полимером). Используемые в изобретении термины "полиэтиленгликоль" и "ПЭГ" предназначены охватывать любую из форм ПЭГ, которая использовалась для дериватизации других белков, таких как моно-(C₁-C₁₀) алкокси- или арилоксиполиэтиленгликоль или полиэтиленгликоль-малеимид. В некоторых вариантах осуществления антитела, предназначенные для пегилирования, представляют собой агликозилированные антитела. Используется дериватизация линейных или разветвленных полимеров, что приводит к минималь-

ной потере биологической активности. Степень конъюгации можно тщательно контролировать с помощью SDS-PAGE и масс-спектрометрии, чтобы обеспечить надлежащую конъюгацию молекул ПЭГ с антителами.

Непрореагировавший ПЭГ может быть отделен от конъюгатов антитело-ПЭГ с помощью гель- или ионно-обменной хроматографии. ПЭГ-производные антитела можно тестировать на активность связывания, а также на эффективность *in vivo* с помощью способов, хорошо известных специалистам в данной области, например с помощью иммунологических анализов, описанных в изобретении. Способы пегилирования белков известны в данной области и могут быть применены к антителам настоящего изобретения. См., например, патент EP 0154316 авторов Nishimura et al. и EP 0401384 Ishikawa et al.

Другие модифицированные технологии пегилирования включают технологии реконструирующего химически ортогонального направленного конструирования (reCODE ПЭГ), с помощью которой химически определенные боковые цепи вставляются в биосинтетические белки посредством системы реконструирования, которая включает тРНК синтетазу и тРНК. Эта технология позволяет вставлять более чем 30 новых аминокислот в биосинтетические белки в *E.coli*, клетки дрожжей и млекопитающих. В тРНК вставляют ненативные аминокислоты в любое место расположения амбер-кодона, превращая амбер-кодон из стоп-кодона в кодон, который сигнализирует о включении химически определенной аминокислоты.

Для увеличения периода полувыведения из сыворотки также можно применять технологии рекомбинантного пегилирования (гПЭГ). Эта технология охватывает генетическое слияние неструктурированного белкового хвоста из 300-600 аминокислот в существующий фармацевтический белок. Поскольку очевидная молекулярная масса такой неструктурированной белковой цепи приблизительно в 15 раз больше, чем ее фактическая молекулярная масса, период полужизни белка в сыворотке значительно возрастает. В отличие от общепринятых ПЭГ, для которых необходима химическая конъюгация и повторная очистка, значительно упрощается способ производства, процесс и продукт является однородным.

Полисиалирование представляет собой другую технологию, в которой используется природный полимер полисиаловой кислоты (ПСК) для продления активной жизни и повышения стабильности терапевтических пептидов и белков. ПСК представляет собой полимер сиаловой кислоты (сахар). При использовании для доставки лекарственного средства, а именно, терапевтического белка и пептида, при конъюгировании полисиаловая кислота создает защитную микросреду. Это увеличивает срок активной жизни терапевтического белка в кровеносном русле и предотвращает его распознавание иммунной системой. Полимер ПСК естественным образом присутствует в организме человека. Он был воспринят некоторыми бактериями, развитие которых на протяжении миллионов лет привело к покрытию стенок бактерий полимером ПСК. Эти полисиалированные природным образом бактерии получили возможность, в силу молекулярной мимикрии нарушать защитную систему организма. ПСК, как основную природную технологию снижения заметности ("технология стелс"), можно легко получать из таких бактерий в больших количествах и с заданными физическими характеристиками. Бактериальная ПСК полностью неиммуногенна даже при сцеплении с белками, поскольку она химически идентична ПСК из организма человека.

Другая технология включает использование производных гидроксиэтилкрахмала (ГЭК), связанных с антителами. ГЭК представляет собой модифицированный природный полимер, полученный из воскового кукурузного крахмала, и может метаболизироваться ферментами организма. Растворы ГЭК обычно вводят для замещения дефицита объема крови и улучшения реологических свойств крови. Присоединение ГЭК (ГЭК-илирование) к антителу позволяет продлить период полувыведения из циркуляторного русла путем повышения стабильности молекулы, а также путем снижения почечного клиренса, что приводит к увеличению биологической активности. Путем изменения различных параметров, таких как молекулярная масса ГЭК, можно адаптировать широкий диапазон конъюгатов ГЭК-антитело.

Антитела, имеющие увеличенный период полувыведения *in vivo*, также могут быть получены путем вставки одной или нескольких аминокислотных модификаций (например, замен, вставок или делеций) в константный домен IgG или в его связывающий фрагмент FcRn (предпочтительно во фрагмент домена Fc или шарнирный Fc). См., например, международную опубликованную заявку WO 98/23289, международную опубликованную заявку № WO 97/34631 и патент США № 6277375.

Дополнительно антитела можно конъюгировать с альбумином (например, сывороточным альбумином человека, HSA) для придания более высокой стабильности антителу или фрагменту антитела *in vivo* или для достижения более длительного периода полувыведения *in vivo*. Эти способы хорошо известны в данной области, см., например, международные опубликованные заявки №№ WO 93/15199, 93/15200 и 01/77137 и европейский патент № EP 0413622. Дополнительно в контексте биспецифичного антитела, как описано выше, специфичности антитела могут быть сконструированы таким образом, чтобы один связывающий домен антитела связывался с ЭПО, тогда как второй связывающий домен антитела связывался с сывороточным альбумином, предпочтительно с HSA.

Эти стратегии для увеличения периода полувыведения особенно полезны для нанотел, связывающих агентов на фибронектиновой основе и других антител или белков, для которых желателен увеличение периода полувыведения *in vivo*.

Конъюгаты антител

Настоящее изобретение относится к антителам или их фрагментам, которые специфично связываются с белком ЭПО и рекомбинантно слиты или химически конъюгированы (в том числе посредством и ковалентной и нековалентной связи) с гетерологичным белком или полипептидом (или его фрагментом, предпочтительно с полипептидом с размером по меньшей мере 10 аминокислот, по меньшей мере 20, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 60, по меньшей мере 70, по меньшей мере 80, по меньшей мере 90 или по меньшей мере 100 аминокислот) для создания слитых белков. В частности, изобретение относится к слитым белкам, содержащим антигенсвязывающий фрагмент антитела, описанного в настоящем изобретении (например, Fab-фрагмент, фрагмент Fd, Fv-фрагмент, F(ab)₂-фрагмент, домен VH, CDR из VH, домен VL или CDR из VL) и гетерологичный белок, полипептид или пептид. Способы слияния или конъюгации белков, полипептидов или пептидов с антителом или с фрагментом антитела, известны в данной области. См., например, патенты США №№ 5336603, 5622929, 5359046, 5349053, 5447851 и 5112946, Европейские патенты №№ EP 0307434 и EP 0367166, международные опубликованные заявки №№ WO 96/04388 и WO 91/06570, публикации Ashkenazi et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 10535-10539; Zheng et al., 1995, J. Immunol. 154:5590-5600; и Vil et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:11337-11341.

Дополнительные слитые белки можно создавать с помощью технологий перестановки генов, перестановки мотивов, перестановки экзонов и/или перестановки кодонов (именуемых в совокупности "перестановкой ДНК"). Перестановку ДНК можно применять для изменения активности антител по изобретению или их фрагментов (например, антител или их фрагментов с более высокой аффинностью и более низким уровнем диссоциации). См. общую информацию в патентах США №№ 5605793, 5811238, 5830721, 5834252 и 5837458, в публикациях Patten et al., 1997, Curr. Opin. Biotechnol. 8:724-33; Narayama, 1998, Trends Biotechnol. 16(2):76-82; Hansson, et al., 1999, J. Mol. Biol. 287:265-76; и Lorenzo and Blasco, 1998, Biotechniques 24(2):308-313 (каждый из указанных патентов и публикаций включен в настоящее изобретение в качестве ссылки во всей полноте). Антитела или их фрагменты или кодируемые антитела или их фрагменты перед рекомбинацией могут быть изменены путем воздействия на них случайного мутагенеза с помощью допускающей ошибки ПЦР, случайной вставки нуклеотидов или другими способами. Полинуклеотид, кодирующий антитело или его фрагмент, которое специфично связывается с белком ЭПО, можно подвергать рекомбинации с одним или несколькими компонентами, мотивами, участками, частями, доменами, фрагментами и т.д. из одной или нескольких гетерологичных молекул.

Кроме того, антитела или их фрагменты могут быть слиты с маркерными последовательностями, такими как пептиды, для облегчения очистки. В предпочтительных вариантах осуществления маркерная аминокислотная последовательность представляет собой пептид гексагистидин, например метку, которую несет вектор Pqc (Qiagen, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311), среди прочих маркеров, многие из которых являются коммерчески доступными. Согласно публикации, например, Gentz et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 821-824, гексагистидин обеспечивает удобную очистку слитого белка. Другие пригодные для очистки пептидные метки включают без ограничения гемагглютининовую метку (НА), которая соответствует эпитопу, полученному из белка гемагглютинина вируса гриппа (Wilson et al., 1984, Cell, 37:767), и метку "flag".

В других вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению или их фрагменты конъюгируются с диагностическим или детектируемым агентом. Такие антитела могут быть полезны для мониторинга или прогнозирования возникновения, развития, прогрессирования и/или отягощения заболевания или расстройства, как часть процедуры клинического тестирования, например, для определения эффективности конкретной терапии. Такую диагностику и обнаружение можно проводить путем связывания антитела с детектируемыми веществами, включающими без ограничения различные ферменты, например и без ограничения пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, β-галактозидазу или ацетилхолинэстеразу; простетические группы, включающие без ограничения, стрептавидин/биотин и авидин/биотин; флуоресцентные материалы, включающие без ограничения, умбеллиферон, флуоресцеин, флуоресцеина изотионат, родамин, флуоресцеина дихлортриазиниламин, дансилхлорид или фикоэритрин; люминесцентные материалы, включающие без ограничения люциферазу, люциферин и акворин; радиоактивные материалы, включающие без ограничения, йод (¹³¹I, ¹²⁵I, ¹²³I и ¹²¹I), углерод (¹⁴C), серу (³⁵S), тритий (³H), индий (¹¹⁵In, ¹¹³In, ¹¹²In и ¹¹¹In), технеций (⁹⁹Tc), таллий (²⁰¹Tl), галлий (⁶⁸Ga, ⁶⁷Ga), палладий (¹⁰³Pd), молибден (⁹⁹Mo), ксенон (¹³³Xe), фтор (¹⁸F), ¹⁵³Sm, ¹⁷⁷Lu, ¹⁵⁹Gd, ¹⁴⁹Pm, ¹⁴⁰La, ¹⁷⁵Yb, ¹⁶⁶Ho, ⁹⁰Y, ⁴⁷Sc, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁴²Pr, ¹⁰⁵Rh, ⁹⁷Ru, ⁶⁸Ge, ⁵⁷Co, ⁶⁵Zn, ⁸⁵Sr, ³²P, ¹⁵³Gd, ¹⁶⁹Yb, ⁵¹Cr, ⁵⁴Mn, ⁷⁵Se, ¹¹³Sn и ¹¹⁷Tm; и позитронизлучающие металлы с использованием различных методик позитронно-эмиссионной томографии, и ионы нерадиоактивных парамагнитных металлов.

Настоящее изобретение дополнительно охватывает использование антител или их фрагментов, конъюгированных с терапевтической функциональной группой. Антитело или его фрагмент может быть конъюгирован с терапевтической функциональной группой, такой как цитотоксин, например с цитостатическим или цитотоксичным агентом, терапевтическим агентом или ионом радиоактивного металла, на-

пример, с α -излучающим агентом. Цитотоксин или цитотоксический агент включает любой агент, который является губительным для клеток.

Дополнительно антитело или его фрагмент может быть конъюгировано с терапевтической функциональной группой или с лекарственной функциональной группой, которая изменяет заданную биологическую реакцию. Терапевтические функциональные группы или лекарственные функциональные группы не следует толковать как ограничение классических химических терапевтических агентов. Например, лекарственная функциональная группа может представлять собой белок, пептид или полипептид, обладающий желаемой биологической активностью. Такие белки могут включать, например, токсин, такой как абрин, рицин А, экзотоксин, синегнойный токсин, холерный токсин или дифтерийный токсин; белок, такой как фактор некроза опухоли, α -интерферон, β -интерферон, фактор роста нервов, тромбоцитарный фактор роста, тканевый активатор плазминогена, апоптозный агент, антиангиогенный агент; или модификатор биологического ответа, такой как, например, лимфокин.

Кроме того, антитело может быть конъюгировано с терапевтическими группами, такими как ионы радиоактивного металла, например α -излучающие агенты, такие как ^{213}Bi или макроциклические хелатообразующие агенты, полезные для конъюгации с полипептидами ионов радиоактивного металла, включающих без ограничения, ^{131}In , ^{131}Lu , ^{131}Y , ^{131}Ho , ^{131}Sm . В некоторых вариантах осуществления макроциклический хелатообразующий агент представляет собой 1,4,7,10-тетраазациклододекан-N,N',N'',N'''-тетрауксусную кислоту (DOTA), которую можно присоединять к антителу с помощью линкерной молекулы. Такие линкерные молекулы обычно известны в данной области и описаны в публикациях Denardo et al., 1998, Clin. Cancer Res. 4(10):2483-90; Peterson et al., 1999, Bioconjug. Chem. 10(4):553-7 и Zimmerman et al., 1999, Nucl. Med. Biol. 26(8):943-50, каждая из которых включена в изобретение путем ссылки во всей своей полноте.

Методики конъюгации терапевтических групп с антителами хорошо известны, см., например, публикации Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", в издании Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), с. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", в издании Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), с. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", в издании Monoclonal Antibodies 84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), с. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", в издании Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), с. 303-16 (Academic Press 1985) и Thorpe et al., 1982, Immunol. Rev. 62:119-58.

Антитела могут быть также присоединены к твердым матрицам, которые особенно полезны для иммунологического анализа или очистки антигена-мишени. Такие твердые носители включают без ограничения стекло, целлюлозу, полиакриламид, нейлон, полистирол, поливинилхлорид или полипропилен.

Способы получения антител по изобретению

Нуклеиновые кислоты, кодирующие упомянутые антитела.

Изобретение относится, по существу, к очищенным молекулам нуклеиновых кислот, которые кодируют полипептиды, содержащие сегменты или домены цепей описанных выше антител, связывающихся с ЭПО. Некоторые из нуклеиновых кислот по изобретению содержат нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи, показанную в SEQ ID NO: 13, 33, 53 или 73, и/или нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельную область легкой цепи, которая показана в SEQ ID NO: 14, 34, 54 или 74. В конкретном варианте осуществления молекулы нуклеиновых кислот представляют собой молекулы, которые указаны в табл. 1. Некоторые другие молекулы нуклеиновых кислот по изобретению содержат нуклеотидные последовательности, которые, по существу, идентичны (например, по меньшей мере на 65, 80, 95 или 99%) нуклеотидным последовательностям, указанным в табл. 1. При экспрессии в соответствующих векторах экспрессии кодируемые этими полинуклеотидами полипептиды способны проявлять потенциал связывания антигена с ЭПО.

Также в изобретении рассмотрены полинуклеотиды, которые кодируют по меньшей мере одну область CDR и обычно все три области CDR из тяжелой или легкой цепи указанного выше антитела, связывающегося с ЭПО. Некоторые другие полинуклеотиды кодируют все или, по существу, все последовательности из вариабельной области тяжелой цепи и/или легкой цепи указанного выше антитела, связывающегося с ЭПО. По причине вырожденности кода, множество последовательностей нуклеиновых кислот кодирует каждую из аминокислотных последовательностей иммуноглобулина.

Молекулы нуклеиновой кислоты по изобретению могут кодировать и вариабельную область, и константную область антитела. Некоторые из последовательностей нуклеиновых кислот по изобретению содержат нуклеотиды, кодирующие зрелую последовательность тяжелой цепи, которая, по существу, идентична (например, по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99%) зрелой последовательности тяжелой цепи, показанной в SEQ ID NO: 15, 35, 55 или 75. Некоторые другие последовательности нуклеиновых кислот содержат нуклеотид, кодирующий зрелую последовательность легкой цепи, которая, по существу, идентична (например, по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99%) зрелой последовательности легкой цепи, показанной в SEQ ID NO: 16, 36, 56 или 76.

Полинуклеотидные последовательности можно получать *de novo* путем твердофазного синтеза ДНК или с помощью ПЦР-мутагенеза существующей последовательности (например, последовательностей, описанных в приведенных ниже примерах), которая кодирует связывающееся с ЭПО антитело или его связывающий фрагмент. Прямой химический синтез нуклеиновых кислот можно осуществлять способами, известными в данной области, такими как фосфотриэфирный способ Narang et al., 1979, *Meth. Enzymol.* 68:90; фосфодиэфирный способ Brown et al., *Meth. Enzymol.* 68:109, 1979; диэтилфосфорамидитный способ Beaucage et al., *Tetra. Lett.* 22: 1859, 1981; и способ твердой матрицы, патент США № 4458066. Вставку мутации в полинуклеотидную последовательность способом ПЦР можно выполнять, например, согласно описанию в следующих публикациях: *PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification*, H.A. Erlich (Ed.), Freeman Press, NY, NY, 1992; *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Innis et al. (Ed.), Academic Press, San Diego, CA, 1990; Mattila et al., *Nucleic Acids Res.* 19:967, 1991 и Eckert et al., *PCR Methods and Applications* 1:17, 1991.

Настоящее изобретение также рассматривает векторы экспрессии и клетки-хозяева для получения описанных выше связывающихся с ЭПО антител. Различные векторы экспрессии могут быть использованы для экспрессии полинуклеотидов, кодирующих цепи связывающихся с ЭПО антител или связывающих фрагментов. Для получения антител в клетках-хозяевах млекопитающих можно использовать векторы экспрессии как на основе вирусов, так и невирусные векторы. Невирусные векторы и системы включают плазмиды, эписомные векторы, обычно с кассетой экспрессии для экспрессии белка или РНК, и искусственные хромосомы человека (см., например, Harrington et al., *Nat Genet* 15:345, 1997). Например, невирусные векторы, подходящие для экспрессии ЭПО-связывающих полинуклеотидов и полипептидов в клетках млекопитающих (например, в клетках человека), включают векторы pThioHis A, B и C, pCDNA3.1/HIS, pEBVHis A, B и C, (Invitrogen, San-Diego, CA), вектор MPSV и многочисленные другие векторы, известные в данной области для экспрессии других белков. Полезные вирусные векторы включают векторы на основе ретровирусов, аденовирусов, аденоассоциированных вирусов, вирусов герпеса, векторов на основе SV40, вируса папилломы, вируса НВР Эпштейна-Барра, векторов вируса коровьей оспы и вируса леса Семлики (SFV). См. публикации Brent et al., выше; Smith, *Annu. Rev. Microbiol.* 49:807, 1995 и Rosenfeld et al., *Cell* 68:143, 1992.

Выбор вектора экспрессии зависит от клеток-хозяев, в которых предполагается осуществлять экспрессию этого вектора.

Обычно векторы экспрессии содержат промотор и другие регуляторные последовательности (например, энхансеры), которые функционально связаны с полинуклеотидами, кодирующими цепь антитела или фрагмента, связывающегося с ЭПО. В некоторых вариантах осуществления используют индуцируемый промотор, чтобы предотвратить экспрессию вставленных последовательностей, за исключением индуцирующих условий. Индуцируемые промоторы включают, например, арабинозу, LacZ, металлотионеиновый промотор или промотор теплового шока. Можно выращивать культуры трансформированных организмов в неиндуцирующих условиях без искажения популяции для кодирования последовательностей, чьи продукты экспрессии лучше подходят для клеток-хозяев. В дополнение к промоторам другие регуляторные элементы могут также быть необходимыми или желательными для эффективной экспрессии цепи антитела или его фрагмента, связывающегося с ЭПО. Обычно эти элементы включают иницирующий кодон ATG и смежный сайт связывания рибосом или другие последовательности. Дополнительно эффективность экспрессии можно повышать за счет включения энхансеров, подходящих к используемой клеточной системе (см., например, Scharf et al., *Results Probl. Cell Differ.* 20:125, 1994 и Bittner et al., *Meth. Enzymol.*, 153:516, 1987). Например, можно использовать энхансер SV40 или энхансер CMV для увеличения экспрессии в клетках-хозяевах млекопитающих.

Векторы экспрессии могут также обеспечивать положение сигнальной последовательности секрети, чтобы сформировать слитый белок с полипептидами, кодируемыми вставленными последовательностями антитела, связывающегося с ЭПО. Чаще всего, вставленные последовательности связывающихся с ЭПО антител сцеплены с сигнальными последовательностями перед их вставкой в вектор. Векторы, предназначенные к использованию для получения последовательностей, кодирующих переменные домены легкой и тяжелой цепи антитела, связывающегося с ЭПО, иногда также кодируют константные области или их части. Такие векторы позволяют осуществлять экспрессию переменных областей, как белков, слитых с константными областями, что таким образом приводит к продукции интактных антител или их фрагментов. Обычно такие константные области являются константными областями человека.

Клетки-хозяева, несущие и экспрессирующие цепи антител, связывающихся с ЭПО, могут быть как прокариотическими, так и эукариотическими. Одной из прокариотических клеток-хозяев, полезных для клонирования и экспрессии полинуклеотидов настоящего изобретения, является *E.coli*. Другие подходящие для использования микробные клетки-хозяева включают бациллы, такие как *Bacillus subtilis*, и другие энтеробактерии, такие как *Salmonella*, *Serratia*, и различные виды *Pseudomonas*. В этих прокариотических клетках-хозяевах можно также экспрессировать векторы, которые обычно содержат последовательности контроля экспрессии, совместимые с клеткой-хозяином (например, начало репликации). Дополнительно будет присутствовать любое количество различных известных промоторов, например, лактозная промоторная система, триптофановая (*trp*) промоторная система, β -лактамазная промоторная система

или промоторная система из λ -фага. Промоторы обычно контролируют экспрессию, необязательно, посредством операторной последовательности и имеют последовательности сайта связывания рибосом и т.п. для инициации и терминции транскрипции и трансляции. Также можно использовать другие микроорганизмы, такие как дрожжи, для экспрессии связывающихся с ЭПО полипептидов по изобретению. Также можно использовать клетки насекомых в комбинации с бакуловирусными векторами.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления используются клетки-хозяева млекопитающих для экспрессии и получения связывающихся с ЭПО полипептидов согласно настоящему изобретению. Например, они могут представлять собой или линию клеток гибридомы, экспрессирующих гены эндогенного иммуноглобулина (например, клон гибридомы миеломы 1D6.C9, описанный в разделе примеров) или линии клеток млекопитающих, несущих экзогенный вектор экспрессии (например, клетки миеломы SP2/0, примеры которых приведены ниже). Они включают любые нормальные смертные или нормальные или аномальные бессмертные клетки животного или человеческого происхождения. Например, был разработан ряд подходящих линий клеток-хозяев, способных секретировать интактные иммуноглобулины, в том числе клеточные линии CHO, различные клеточные линии Cos, клеточные линии HeLa, клеточные линии миеломы, трансформированные В-клетки и гибридомы. Использование клеточных культур млекопитающих, экспрессирующих полипептиды, рассмотрено в целом, например, в издании Winnacker, FROM GENES TO CLONES, VCH Publishers, N.Y., N.Y., 1987. Экспрессирующие векторы для клеток-хозяев млекопитающих могут включать последовательности контроля экспрессии, такие как начало репликации, промотор и энхансер (см., например, Queen, et al. Rev. 89 Immunol: 49-68, 1986), и необходимые информационные сайты процессинга, такие как сайты связывания рибосом, сплайсинга РНК, сайты полиаденилирования и последовательности терминции транскрипции. Эти экспрессирующие векторы обычно содержат промоторы, полученные из генов млекопитающих или из вирусов млекопитающих. Подходящие промоторы могут быть конститутивным, специфичными по типу клеток, специфичными для определенной стадии и/или модулируемыми или регулируемыми. Полезные промоторы включают без ограничения металлотионеиновый промотор, конститутивный основной поздний промотор аденовируса, дексаметазон-индуцируемый промотор MMTV, промотор SV40, промотор MRP polIII, конститутивный промотор MPSV, тетрациклин-индуцируемый промотор цитомегаловируса (например, медленно-ранний промотор CMV человека), конститутивный промотор CMV и комбинации промотор-энхансер, известные в данной области.

Способы введения экспрессирующих векторов, содержащих представляющие интерес полинуклеотидные последовательности, варьируются в зависимости от типа клетки-хозяина. Например, обычно используют трансфекцию с хлоридом кальция для прокариотических клеток, тогда как для других клеток-хозяев можно использовать обработку фосфатом кальция или электропорацию (см. в общем Sambrook et al., выше). Другие способы включают, например, электропорацию, обработку фосфатом кальция, опосредованную липосомами трансформацию, инъекции и микроинъекции, способы генной пушки, вирусомы, иммунолипосомы, конъюгаты поликатион:нуклеиновая кислота, голые ДНК, искусственные вирионы, слияние структурного белка VP22 с вирусом герпеса (Elliot and O'Hare, Cell 88: 223, 1997), захват ДНК с агентом-энхансером и ex vivo трансдукция. Для долгосрочного, высокопроизводительного получения рекомбинантных белков часто требуется стабильная экспрессия. Например, клеточные линии, которые стабильно экспрессируют связывающееся с ЭПО цепи антитела или связывающие фрагменты, могут быть получены с использованием векторов экспрессии по изобретению, которые содержат вирусные сайты инициации репликации или эндогенные элементы экспрессии и селективируемый маркерный ген. После введения вектора клеткам дают возможность расти в течение 1-2 дней в обогащенной среде, перед их переключением на селективную среду. Цель селективируемого маркера состоит в том, чтобы придать устойчивость к селекции, и его присутствие позволяет расти клеткам, которые успешно экспрессируют введенные последовательности в селективной среде. Устойчивые, стабильно трансфицированные клетки можно подвергать пролиферации с помощью технологий культивирования ткани, подходящих для данного типа клеток.

Создание моноклональных антител по изобретению.

Моноклональные антитела (mAb) можно получать с помощью различных способов, включающих использование общепринятых методик для моноклональных антител, например, стандартный способ гибридизации соматических клеток, описанный Kohler and Milstein, Nature 1975, 256: 495. Можно применять множество способов получения моноклональных антител, например вирусную или онкогенную трансформацию В-лимфоцитов.

Животные системы для создания гибридом включают мышинные, крысиные и кроличьи системы. Гибридомы получают в мышах согласно общепринятой методике. Протоколы иммунизации и способы выделения иммунизированных спленоцитов для слияния хорошо известны в данной области. Также известны партнеры слияния (например, клетки мышинной миеломы) и технологии слияния.

Химерные или гуманизированные антитела по настоящему изобретению могут быть получены на основе последовательности моноклонального антитела мыши, которые создают, как описано выше. ДНК, кодирующие тяжелые и легкие цепи иммуноглобулинов, можно получать из представляющей интерес гибридомы мыши и генно-инженерным способом вводить в них последовательности немыши (например,

человека) иммуноглобулина, с использованием стандартных способов молекулярной биологии. Например, для создания химерного антитела вариабельные области мыши могут быть сцеплены с константными областями человека с использованием способов, известных в данной области (см., например, патент США № 4816567 авт. Cabilly et al.). Для создания гуманизированного антитела можно вставлять области CDR мыши в каркас человека с использованием способов, известных в данной области. См., например, патент США № 5225539 Winter и патенты США №№ 5530101, 5585089, 5693762 и 6180370 авторов Queen et al.

В конкретном варианте осуществления антитела по изобретению представляют собой моноклональные антитела человека. Такие моноклональные антитела человека, направленные против ЭПО, можно создавать с использованием трансгенных или трансхромосомных мышей, несущих части иммунной системы человека, а не мышинной системы. Эти трансгенные и трансхромосомные мыши включают мышей, называемых в изобретении мышами HuMAb и мышами KM, соответственно, и в совокупности называются в изобретении "мышами с Ig человека".

Мыши HuMAb® (Medarex, Inc.) содержат минилокусы гена иммуноглобулина человека, которые кодируют неперестроенные последовательности тяжелой (μ и γ) и легкой (κ) цепей иммуноглобулина человека, совместно с целевыми мутациями, которые инактивируют эндогенные локусы μ и κ цепей (см., например, Lonberg et al., 1994 Nature 368 (6474): 856-859). Соответственно, у мышей выявляют снижение экспрессии IgM мыши или κ -цепей мыши, и в ответ на иммунизацию введенные трансгены тяжелой и легкой цепи человека претерпевают переключение изотипа и соматическую мутацию и, таким образом, получают высокоаффинные моноклональные IgG- κ человека (Lonberg, N. et al., 1994, выше; см. обзор в руководстве и публикациях Lonberg, N., 1994 Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101; Lonberg, N. and Huszar, D., 1995 Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93 и Harding, F. and Lonberg, N., 1995 Ann. N.Y. Acad. Sci. 764: 536-546). Подготовка и использование мышей HuMAb и проведенные с помощью указанных мышей геномные модификации дополнительно описаны авторами Taylor, L. et al., 1992 Nucleic Acids Research 20:6287-6295; Chen, J. et al., 1993 International Immunology 5:647-656; Tuailon et al., 1993 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:3720-3724; Choi et al., 1993 Nature Genetics 4:1 17-123; Chen, J. et al., 1993 EMBO J. 12: 821-830; Tuailon et al., 1994 J. Immunol. 152:2912-2920; Taylor, L. et al., 1994 International Immunology 579-591 и Fishwild, D. et al., 1996 Nature Biotechnology 14: 845-851, и содержание всех из перечисленных публикаций приведены в изобретении конкретно путем ссылки во всей их полноте. Дополнительную информацию см. в патентах США №№ 5545806, 5569825, 5625126, 5633425, 5789650, 5877397, 5661016, 5814318, 5874299 и 5770429, все из которых принадлежат авторам Lonberg and Kay, в патенте США № 5545807 Surani et al., в публикациях PCT №№ WO 92103918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97113852, WO 98/24884 и WO 99/45962, все из которых принадлежат авторам Lonberg and Kay, и в публикации PCT № WO 01/14424 авторов Korman et al.

В другом варианте осуществления антитела человека по изобретению можно индуцировать с помощью мышей, несущих последовательности иммуноглобулина человека на трансгенах и трансхромосомах, например, мышей, несущих трансген тяжелой цепи человека и трансхромосому легкой цепи человека. Такие мыши называются в изобретении "KM-мышами" и подробно описаны в публикации PCT WO 02/43478 авторов Ishida et al.

Более того, в данной области имеются альтернативные трансгенные системы животных, экспрессирующие гены иммуноглобулина человека, и их можно использовать для индукции связывающихся с ЭПО антител по изобретению. Например, можно использовать альтернативную трансгенную систему, называемую Xenomouse (Abgenix Inc.). Такие мыши описаны, например, в патентах США №№ 5939598, 6075181, 6114598, 6150584 и 6162963 авторов Kucherlapati et al.

Кроме того, в данной области имеются альтернативные системы трансхромосомных животных, экспрессирующие гены иммуноглобулина человека, и их можно использовать для индукции связывающихся с ЭПО антител по изобретению. Например, можно использовать мышей, называемых "мышами ТС", несущих и трансхромосому тяжелой цепи человека и трансхромосому легкой цепи человека, такие мыши описаны авторами Tomizuka et al., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 722-727. Кроме того, в данной области описаны коровы, несущие трансхромосомы тяжелой и легкой цепи человека (Kuroiwa et al., 2002 Nature Biotechnology 20:889-894), которые могут быть использованы для индукции связывающихся с ЭПО антител по изобретению.

Моноклональные антитела человека по изобретению также можно получать с использованием способов фагового дисплея для скрининга библиотек генов иммуноглобулина человека. Такие способы фагового дисплея для выделения антител человека приняты в данной области или описаны в приведенных ниже примерах. См., например: патенты США №№ 5223409, 5403484 и 5571698 Ladner et al., патенты США №№ 5427908 и 5580717 Dower et al., патенты США №№ 5969108 и 6172197 McCafferty et al. и патенты США №№ 5885793, 6521404, 6544731, 6555313, 6582915 и 6593081 Griffiths et al.

Моноклональные антитела человека по изобретению также можно подготовить с использованием мышей SCID, в которых были восстановлены иммунные клетки человека, таким образом, что при иммунизации можно генерировать ответ антител человека. Такие мыши описаны, например, в патентах США

№№ 5476996 и 5698767 авторов Wilson et al.

Конструирование каркаса или Fc.

Сконструированные антитела по изобретению включают антитела, в которых были сделаны модификации в каркасных остатках в пределах областей VH и/или VL, например, для улучшения свойств антитела. Обычно такие каркасные модификации проводят для уменьшения иммуногенности антитела. Например, один подход заключается в "обратной мутации" одного или нескольких каркасных остатков в соответствующей последовательности зародышевой линии. Более конкретно, антитело, которое претерпело соматическую мутацию, может содержать каркасные остатки, которые отличаются от последовательности зародышевой линии, из которой происходит антитело. Такие остатки можно идентифицировать путем сравнения каркасных последовательностей антитела с последовательностями зародышевой линии, из которой происходит антитело. Чтобы вернуть последовательности каркасной области в их конфигурацию зародышевой линии, соматические мутации могут претерпевать "обратную мутацию" в последовательности зародышевой линии, например, путем сайт-направленного мутагенеза. Такие "обратно мутировавшие" антитела также входят в объем настоящего изобретения.

Другой тип модификации каркаса охватывает мутации одного или нескольких остатков в области каркаса или даже в пределах одной или нескольких областей CDR для удаления T-клеточных эпитопов, чтобы тем самым уменьшить потенциальную иммуногенность антител. Этот подход также называют "деиммунизацией" и более подробное его описание приведено в патентной публикации US 20030153043, Carr et al.

Дополнительно или альтернативно, к модификациям, сделанным в пределах каркасных областей или CDR-областей, можно конструировать антитела по изобретению, чтобы они включали модификации в пределах области Fc, обычно для изменения одного или нескольких функциональных свойств антитела, таких как период полужизни в сыворотке, фиксация комплемента, связывание Fc-рецептора и/или его антигензависимая клеточная цитотоксичность. Кроме того, антитело по изобретению можно модифицировать химически (например, одну или несколько химических групп можно присоединять к антителу), или модифицировать с целью изменения его гликозилирования, также для изменения одного или нескольких функциональных свойств антитела. Каждый из этих вариантов осуществления описан более подробно ниже. Нумерация остатков в Fc-области соответствует индексу ЕС по Kabat.

В одном варианте осуществления шарнирная область СН1 модифицирована таким образом, что изменяется количество остатков цистеина в шарнирной области, например увеличивается или уменьшается. Этот подход дополнительно описан в патенте США № 5677425, Bodmer et al. Число остатков цистеина в шарнирной области СН1 изменяют, например, для облегчения сборки легкой и тяжелой цепей или для увеличения или уменьшения стабильности антитела.

В другом варианте осуществления шарнирная область Fc антитела подвергается мутации для уменьшения срока биологической полужизни антитела. В частности, одну или несколько аминокислотных мутаций вводят в домен СН2-СН3 области интерфейса Fc-шарнирного фрагмента таким образом, что в этом антителе возникает нарушение связывания белка A Staphylococcal (SPA) по сравнению со связыванием с нативным Fc-шарнирным SpA доменом. Этот подход описан более подробно в патенте США № 6165745, Ward et al.

В другом варианте осуществления антитело модифицируется для увеличения срока его биологической полужизни. Возможны различные подходы. Например, можно вставлять одну или несколько из следующих мутаций: T252L, T254S, T256F, как описано в патенте США № 6277375, Ward. Альтернативно, для увеличения срока биологической полужизни можно изменять антитело в пределах области СН1 или СL, чтобы они содержали эпитоп связывания спасательного рецептора, взятый из двух петель домена СН2 в Fc-области IgG, как описано в патентах США №№ 5869046 и 6121022 авторов Presta et al.

В других вариантах осуществления область Fc изменяется путем замены по меньшей мере одного аминокислотного остатка на другой аминокислотный остаток с целью изменения эффекторных функций антитела. Например, одну или несколько аминокислот можно заменять на другой аминокислотный остаток таким образом, чтобы изменилась аффинность антитела к эффекторному лиганду, но сохранилась антигенсвязывающая способность родительского антитела. Эффекторный лиганд, к которому изменяется аффинность, может представлять собой, например, Fc-рецептор или С1 компонент комплемента. Этот подход описан более подробно в патентах США №№ 5624821 и 5648260, оба принадлежат авторам Winter et al.

В другом варианте осуществления одна или несколько аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков, может быть заменена другим аминокислотным остатком таким образом, чтобы антитело имело измененное связывание с С1q и/или уменьшенную или отсутствующую комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC). Этот подход описан более подробно в патенте США № 6194551, Idusogie et al.

В другом варианте осуществления изменяют один или несколько аминокислотных остатков, чтобы таким образом изменить способность антитела фиксировать комплемент. Этот подход также описан в публикации PCT WO 94/29351, Bodmer et al.

Еще в одном варианте осуществления модифицируют область Fc для увеличения способности антитела опосредовать антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) и/или для увеличения аф-

финности антитела к рецептору Fc γ путем модификации одной или нескольких аминокислот. Этот подход также описан в публикации PCT WO 00/42072, Presta. Кроме того, были картированы сайты связывания на IgG1 человека для Fc γ RI, Fc γ RII, Fc γ RIII и FcRn и описаны варианты с улучшенным связыванием (см. Shields, R.L. et al., 2001 J. Biol. Chem. 276: 6591-6604).

Еще в одном варианте осуществления модифицируется гликозилирование антитела. Например, можно делать агликозилированные антитела (например, антитело без гликозилирования). Гликозилирование может быть изменено, например, для увеличения аффинности антитела для антигена. Такие углеводные модификации можно осуществлять, например, путем изменения одного или нескольких сайтов гликозилирования в последовательности антитела. Например, можно делать одну или несколько аминокислотных замен, которые приводят к удалению одного или нескольких сайтов гликозилирования каркасной вариабельной области, чтобы тем самым исключить гликозилирование в этом сайте. Такое агликозилирование может повышать аффинность антитела к антигену. Этот подход описан более подробно в патентах США №№ 5714350 и 6350861 авторами Co et al.

Дополнительно или альтернативно, можно делать антитело, которое имеет измененный тип гликозилирования, например гипофукозилированное антитело, имеющее уменьшенное количество фукозильных остатков, или антитело, имеющее повышенное содержание биссекторных структур GlcNAc. Было показано, что такие измененные структуры гликозилирования увеличивают ADCC-активность антител. Такие углеводные модификации можно осуществлять, например, путем экспрессии антитела в клетке-хозяине с измененным механизмом гликозилирования. Клетки с измененным механизмом гликозилирования были описаны в данной области и могут быть использованы в качестве клеток-хозяев, в которых экспрессируются рекомбинантные антитела по изобретению таким образом, чтобы получать антитела с измененным гликозилированием. Например, в патенте EP 1176195 авторов Hang et al. описана клеточная линия с функционально нарушенным геном FUT8, который кодирует фукозилтрансферазу, таким образом, что экспрессируемые в этой клеточной линии антитела проявляют гипофукозилирование. В опубликованной заявке PCT WO 03/035835, автор Presta, описывается вариант клеточной линии CHO, клетки Lec13, с пониженной способностью к присоединению фукозы к углеводам, связанным с Asn(297), что также приводит к гипофукозилированию антител, экспрессируемых в этой клетке-хозяине (см. также Shields, R.L. et al., 2002 J. Biol. Chem. 277:26733-26740). В опубликованной заявке PCT WO 99/54342, авторы Umana et al., описаны клеточные линии, сконструированные для экспрессии гликопротеин-модифицирующих гликозилтрансфераз (например, β -(1,4)-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III (GnTIII)), таким образом, что антитела, экспрессируемые в этих генно-инженерных клеточных линиях, обладают повышенным содержанием биссекторных структур GlcNAc, что приводит к увеличению ADCC-активности антитела (см. также Umana et al., 1999 Nat. Biotech. 17:176-180).

Способы конструирования измененных антител.

Как рассмотрено выше, связывающиеся с ЭПО антитела, имеющие VH и VL последовательности или последовательности полноразмерной тяжелой и легкой цепи, показанные в изобретении, можно использовать для создания новых связывающихся с ЭПО антител путем изменения последовательностей полноразмерной тяжелой цепи и/или легкой цепи, последовательностей VH и/или VL или присоединенной к ним константной области (областей). Таким образом, в другом аспекте изобретения используются структурные признаки связывающегося с ЭПО антитела по изобретению для создания структурно родственных связывающихся с ЭПО антител, которые сохраняют по меньшей мере одно функциональное свойство антител по изобретению, например связывание с ЭПО человека, а также ингибирование одного или нескольких функциональных свойств ЭПО (например, ингибирование связывания ЭПО с рецептором ЭПО, ингибирование ЭПО-зависимой клеточной пролиферации).

Например, одна или несколько CDR-областей антител по настоящему изобретению или их мутации можно рекомбинантно комбинировать с известными каркасными участками и/или другими областями CDR для создания дополнительных, рекомбинантно-конструированных связывающихся с ЭПО антител по изобретению, как рассмотрено выше. Другие типы модификаций включают модификации, которые описаны в предыдущем разделе. Исходным материалом для генно-инженерного способа является одна или несколько из VH и/или VL последовательностей по изобретению или одна или несколько CDR-областей из этих последовательностей. Чтобы создать сконструированное антитело, нет необходимости, чтобы фактически приготовить (т.е. экспрессировать в виде белка) антитело, содержащее одну или несколько из последовательностей VH и/или VL по изобретению или одну или несколько CDR-областей из этих последовательностей. Скорее в качестве исходного материала используется информация, содержащаяся в последовательности (последовательностях), для создания последовательности (последовательностей) "второго поколения", полученной из исходной последовательности (последовательностей), а затем получают последовательность (последовательности) "второго поколения" и экспрессируют ее в виде белка.

Соответственно, в другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу получения модифицированного антитела, связывающегося с ЭПО, и указанный способ содержит следующие этапы: а) получение связывающегося с ЭПО антитела, содержащего последовательность вариабель-

ной области тяжелой цепи антитела, которая имеет последовательность CDR1, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 21, 41 и 61, последовательность CDR2, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 22, 42 и 62, и/или последовательность CDR3, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, 23, 43 и 63; и последовательность вариабельной области легкой цепи антитела, которая имеет последовательность CDR1, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 24, 44 и 64, последовательность CDR2, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 25, 45 и 65, и/или последовательность CDR3, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 26, 46 и 66; b) изменение по меньшей мере одного аминокислотного остатка в пределах последовательности вариабельной области тяжелой цепи антитела и/или последовательности вариабельной области легкой цепи антитела для создания по меньшей мере одной измененной последовательности антитела и c) экспрессия измененной последовательности антитела в виде белка.

Соответственно, в другом варианте осуществления изобретение относится к способу получения связывающегося с ЭПО антитела, который состоит в получении последовательности вариабельной области тяжелой цепи антитела, имеющей последовательность CDR1, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, 27, 47 и 67, последовательность CDR2, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 28, 48 и 68, и/или последовательность CDR3, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9, 29, 49 и 69; и последовательности вариабельной области легкой цепи антитела, имеющей последовательность CDR1, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 30, 50 и 70, последовательность CDR2, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11, 31, 51 и 71, и/или последовательность CDR3, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 32, 52 и 72; изменении по меньшей мере одного аминокислотного остатка в последовательности вариабельной области тяжелой цепи антитела, и/или в последовательности вариабельной области легкой цепи антитела для создания по меньшей мере одной измененной последовательности антитела; и экспрессии измененной последовательности антитела в виде белка.

Соответственно, в другом варианте осуществления изобретение относится к способу получения связывающегося с ЭПО антитела, которое оптимизировано для экспрессии в клетке млекопитающего и состоит из последовательности полноразмерной тяжелой цепи антитела, имеющей последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 15, 35, 55 и 75; и последовательности полноразмерной легкой цепи антитела, имеющей последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 16, 36, 56 и 76; изменения по меньшей мере одного аминокислотного остатка в последовательности полноразмерной тяжелой цепи антитела и/или последовательности полноразмерной легкой цепи антитела для создания по меньшей мере одной измененной последовательности антитела; и экспрессии измененной последовательности антитела в виде белка. В одном варианте осуществления изменение тяжелой или легкой цепи осуществляют в каркасной области тяжелой или легкой цепи.

Измененную последовательность антитела также можно получать путем скрининга библиотек антител, имеющих фиксированные последовательности CDR3 или минимальные необходимые детерминанты связывания согласно описанию в заявке US 20050255552 и различия на последовательностях CDR1 и CDR2. Скрининг можно проводить в соответствии с любой подходящей технологией скрининга для скрининга антител из библиотек антител, например, по технологии фагового дисплея.

Для получения и экспрессии измененной последовательности антитела можно использовать стандартные способы молекулярной биологии. Антитело, кодируемое измененной последовательностью (последовательностями) антитела, представляет собой антитело, которое сохраняет одно, некоторые или все из функциональных свойств связывающихся с ЭПО антител, описанных в изобретении, и эти функциональные свойства включают без ограничения специфичное связывание с ЭПО обезьян циномоглус, ЭПО человека, крысы и/или мыши и ингибирование ЭПО-зависимой клеточной пролиферации в анализе пролиферации F36E и/или Va/F3-EpoR клеток.

В некоторых вариантах осуществления способов конструирования антител по изобретению можно вставлять мутации случайным образом или селективно на всем протяжении или в части последовательности, кодирующей антитело, которое связывается с ЭПО, и полученные модифицированные связывающиеся с ЭПО антитела можно подвергать скринингу на связывающую активность и/или другие функциональные свойства, как описано в изобретении. Мутационные способы описаны в данной области. Например, в опубликованной заявке PCT WO 02/092780, автор Short, описаны способы создания и скрининга мутантных антител с помощью мутагенеза насыщения, сборки синтетического лигирования или их комбинация. Альтернативно, в публикации PCT WO 03/074679 Lazar et al. описаны способы использования вычислительных методик скрининга для оптимизации физико-химических свойств антител.

В некоторых вариантах осуществления изобретения были сконструированы антитела с удаленными участками дезамидирования. Известно, что дезамидирование вызывает структурные и функциональные изменения в пептиде или белке. Дезамидирование может приводить к снижению биологической активности, а также к изменениям в фармакокинетики и антигенности белкового фармацевтического препарата (Anal. Chem. 2005 1 Mar.; 77(5):1432-9).

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения были сконструированы антитела с целью увеличения индекса pI и улучшения их свойств подобия лекарству. Индекс pI белка является клю-

чевым фактором, определяющим общие биофизические свойства молекулы. Известно, что антитела, которые имеют низкие показатели pI, обладают меньшей растворимостью, меньшей стабильностью и имеют склонность к агрегации. Дополнительно очистка антител с низким pI является сложной задачей и может быть проблематичной особенно при масштабном клиническом применении. Увеличение pI анти-ЭПО антител или Fab по изобретению повышает их растворимость, что позволяет получать более высокие концентрации антител в композициях (>100 мг/мл). Создание рецептуры антител с высокими концентрациями (например, >100 мг/мл) имеет то преимущество, что можно вводить более высокие дозы антител в глаза пациентов путем интравитреальных инъекций, что, в свою очередь, может позволить снизить частоту введения, и это является значительным преимуществом для лечения хронических заболеваний, включающих сосудистые заболевания сетчатки. Более высокие значения pI также могут увеличивать FcRn-опосредованную утилизацию IgG-версии антитела, что позволяет препарату сохраняться в организме в течение более длительного периода времени, соответственно требуется меньше инъекций. И, наконец, при более высоком значении pI значительно улучшается общая стабильность антител, что увеличивает срок годности и повышает биологическую активность *in vivo*. Предпочтительно значение pI больше или равно 8,2.

Функциональные свойства измененных антител можно оценить с помощью стандартных анализов, доступных в данной области и/или описанных в настоящем изобретении, например анализов, упомянутых в разделе примеров (например, анализы ELISA).

Профилактические и терапевтические применения.

Антитела, которые связываются с ЭПО по изобретению, можно применять в терапевтически полезной концентрации для лечения заболевания или расстройства, связанного с повышенным содержанием и/или с повышенной активностью ЭПО, путем введения нуждающемуся в этом индивиду эффективного количества антитела или антигенсвязывающих фрагментов по изобретению. Настоящее изобретение относится к способу лечения состояний или расстройств, связанных с сосудистым заболеванием сетчатки, путем введения нуждающемуся в этом индивиду эффективного количества антитела по изобретению. Настоящее изобретение относится к способу лечения состояний или расстройств, связанных с диабетической ретинопатией (ДР), путем введения нуждающемуся в этом индивиду эффективного количества антитела по изобретению. Настоящее изобретение относится к способу лечения состояний или расстройств, связанных с макулярным отеком, путем введения нуждающемуся в этом индивиду эффективного количества антитела по изобретению. Настоящее изобретение также относится к способу лечения диабетического макулярного отека (ДМО) путем введения нуждающемуся в этом индивиду эффективного количества антитела по изобретению. Настоящее изобретение также относится к способу лечения пролиферативной диабетической ретинопатии (ПДР) путем введения нуждающемуся в этом индивиду эффективного количества антитела по изобретению. Дополнительно настоящее изобретение относится к способам лечения макулярного отека, связанного с возрастом (AMD/ВМД), окклюзии вен сетчатки (РВО), ангионевротического отека, мультифокального хориоидита, миопической хориоидальной неоваскуляризации и/или ретинопатии недоношенных, путем введения индивиду, нуждающемуся в этом, эффективного количества антитела по изобретению. Изобретение также относится к способам лечения β -талассемии и/или рака.

Изобретение также относится к композиции, содержащей выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, как описано в изобретении, для применения в лечении заболевания или расстройства, связанного с повышенным содержанием и/или активностью ЭПО. Дополнительно изобретение относится к композиции, содержащей выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, как описано в изобретении, для применения в лечении состояний или расстройств, связанных с сосудистым заболеванием сетчатки. Также изобретение относится к композиции, содержащей выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, как описано в изобретении, для применения в лечении состояний или расстройств, связанных с диабетической ретинопатией (ДР). Дополнительно изобретение относится к композиции, содержащей выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, как описано в изобретении, для применения в лечении состояний или расстройств, связанных с макулярным отеком, диабетическим макулярным отеком (ДМО) и/или пролиферативной диабетической ретинопатией (PDR). Изобретение также относится к композиции, содержащей выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, как описано в изобретении, для применения при возрастной макулярной дегенерации (ВМД), окклюзии вен сетчатки (РВО), ангионевротическом отеке, мультифокальном хориоидите, миопической хориоидальной неоваскуляризации и/или ретинопатии недоношенных. Кроме того, изобретение относится к композиции, содержащей выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, как описано в изобретении, для применения в лечении β -талассемии и/или рака. Более конкретно, выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, как описано в изобретении, предназначенные для применения в лечении заболевания или расстройства, связанного с повышенным содержанием и/или активностью ЭПО, могут представлять собой любое из антител или антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем документе, в дополнение к приведенным в табл. 1. Более того, выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, как описано в изобретении, предназначенные для

применения в лечении состояний или расстройств, связанных с сосудистым заболеванием сетчатки, могут представлять собой любое из антител или антигенсвязывающих фрагментов, описанных в изобретении в дополнение к указанным в табл. 1. Антитела по изобретению можно применять, среди прочего, для предотвращения прогрессирования состояний или расстройств, связанных с сосудистым заболеванием сетчатки (например, ДР, ДМЭ, НПДР, НДР, возрастной макулярной дегенерацией (ВМД), окклюзией вен сетчатки (РВО), ангионевротическим отеком, мультифокальным хориоидитом, миопической хориоидальной неоваскуляризацией и/или ретинопатией недоношенных), для лечения или профилактики макулярного отека сетчатки, связанного с сосудистыми заболеваниями, чтобы уменьшить частоту инъекции лувентиса (Lucentis® (RTM)), а также для улучшения остроты зрения, потерянной по причине прогрессирования сосудистого заболевания сетчатки. Антитела по изобретению также можно применять в комбинации с анти-VEGF терапией для лечения пациентов с сосудистым заболеванием сетчатки.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу ингибирования ЭПО-зависимой клеточной пролиферации, при этом указанный способ предусматривает стадию приведения в контакт ЭПО (например, контактирования ЭПО в организме индивида) с эффективным количеством композиции, содержащей выделенное антитело или его антигенсвязывающие фрагменты, как описано в изобретении, в частности, композиция может содержать антитело NVS1, NVS2, NVS3 или NVS4. В одном из аспектов настоящего изобретения способ предусматривает приведение в контакт клетки (например, клетки, содержащей ЭПО) с композицией, которая содержит выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, как описано в изобретении. Изобретение также относится к композиции, содержащей выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, по изобретению, для применения в целях ингибирования ЭПО-зависимой клеточной пролиферации у индивида. Следует понимать, что клетка представляет собой клетку человека. Клетка может быть В-клеткой. Дополнительно предполагается, что клетка располагается в организме индивида. Также предполагается, что клетка находится в глазу индивида. Более того, предполагается, что индивидом является человек.

Клеточную пролиферацию можно измерить, например, с помощью биомикроскопической щелевой лампы, оптической когерентной томографии, цветной фотографии глазного дна и флуоресцентной ангиографии (Heng et al. *Diabet. Med.* 2013 Jun; 30(6):640-50). Дополнительно можно измерять способность антитела или антигенсвязывающего фрагмента, описанного в изобретении, ингибировать ЭПО-зависимую клеточную пролиферацию с помощью анализа, например описанного ниже анализа пролиферации F36E или Va/F3-EpoR клеток.

Изобретение также относится к способу ингибирования ЭПО-зависимого клеточного сигнального пути, при этом указанный способ предусматривает стадию приведения в контакт ЭПО с эффективным количеством композиции, содержащей выделенное антитело или его антигенсвязывающие фрагменты по изобретению, чтобы предотвратить взаимодействие ЭПО с рецептором на клеточной поверхности. В одном из аспектов настоящего изобретения способ предусматривает приведение в контакт клетки, содержащей ЭПО, с композицией, которая содержит выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению. Изобретение также относится к композиции, содержащей выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению, для применения в целях ингибирования ЭПО-зависимого клеточного сигнального пути у индивида. Следует понимать, что клетка представляет собой клетку человека. Дополнительно предполагается, что клетка располагается в организме индивида. Также предполагается, что клетка находится в глазу индивида. Более того, предполагается, что индивидом является человек.

Связывание ЭПО с EpoR индуцирует сигнальный путь посредством JAK2-киназы, что приводит к активации последующих сигнальных путей, которые включают фосфатидилхолин-инозит-3-киназу (PI-3K)/Akt, MAP-киназу, STAT5 и протеинкиназу C (Jelkmann, 2007; Jelkmann, 2004). Известно, что ЭПО или рецептор ЭПО (EpoR) вырабатывается эндогенно клетками разных типов, такими как эндотелиальные клетки, клетки гладких мышц и клетки ЦНС клеток (Ogunshola and Bogdanova, 2013). Активация EpoR при связывании ЭПО может запускать сигнальные пути ниже по течению, что приводит к различным типам действия, таким как транспорт кальция (Korbel et al., 2004), выживаемость клеток (Velly et al., 2010), нейропротекция (Grimm et al., 2002) и ангиогенез (Ribatti, 2010; Ribatti et al., 2003). Соответственно, ингибирование ЭПО-зависимой клеточной передачи сигналов можно определять путем измерения активности одного или нескольких из упомянутых сигнальных путей. Например, ингибирование ЭПО-зависимой клеточной передачи сигналов можно определять путем измерения JAK2 киназы, PI-3K/Akt, MAP-киназы, STAT5 или протеинкиназы C. Способы измерения этих сигнальных путей известны в данной области, и наборы для измерения активности этих путей являются коммерчески доступными. Дополнительно ингибирование ЭПО-зависимой клеточной передачи сигналов можно определять путем измерения пролиферации клеток, как описано выше. Клеточная пролиферация может наблюдаться у индивида (например, ангиогенез), или ее можно измерить с помощью анализа, например анализа пролиферации клеток F36E или Va/F3-EpoR, описанного ниже. В одном из аспектов ЭПО-зависимая клеточная передача сигналов статистически достоверно ($p < 0,05$) снижается в присутствии антитела, описанного в изобретении, по сравнению с контролем.

Настоящее изобретение также относится к способу ингибирования ЭПО-зависимой клеточной про-

лиферации или сигнального пути, при этом указанный способ предусматривает стадию приведения в контакт ЭПО с эффективным количеством композиции, содержащей выделенное антитело или его антигенсвязывающие фрагменты, как описано в изобретении, для предотвращения взаимодействия ЭПО с рецептором на поверхности клетки. Следует понимать, что клетка представляет собой В-клетку. Следует понимать, что клетка представляет собой клетку человека.

Изобретение также относится к способу ингибирования связывания ЭПО с рецептором ЭПО, при этом указанный способ предусматривает стадию приведения в контакт ЭПО (например, контактирование ЭПО в организме индивида) с эффективным количеством композиции, содержащей выделенное антитело или его антигенсвязывающие фрагменты, как описано в изобретении; в частности, композиция может содержать антитело NVS1, NVS2, NVS3 или NVS4. Изобретение также относится к композиции, содержащей выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, как описано в изобретении, для применения в целях ингибирования связывания ЭПО с рецептором ЭПО на клетке индивида, в частности, композиция может содержать антитело NVS1, NVS2, NVS3 или NVS4. Следует понимать, что клетка представляет собой клетку человека. Дополнительно предполагается, что клетка располагается в организме индивида. Также предполагается, что клетка находится в глазу индивида. Более того, предполагается, что индивидом является человек. Ингибирование связывания ЭПО с рецептором ЭПО можно измерить, согласно описанию в публикации Khankin et al. PLoS ONE, 2010 5:e9246.

Можно определять лечение и/или профилактику сосудистых заболеваний сетчатки и макулярного отека, связанного с сосудистым заболеванием сетчатки, с помощью клинически значимых измерений зрительной функции и/или анатомии сетчатки, которые проводит офтальмолог или специалист медицинской помощи. Лечение состояний или расстройств, связанных с сосудистым заболеванием сетчатки, означает любое действие (например, введение анти-ЭПО антитела, описанного в изобретении), что в результате приводит к улучшению или сохранению зрительной функции и/или анатомии сетчатки, или предположительно приведет к указанным результатам. Дополнительно профилактика, относящаяся к состояниям или расстройствам, связанным с сосудистым заболеванием сетчатки, означает любое действие (например, введение анти-ЭПО антитела, описанного в изобретении), которое предотвращает или замедляет ухудшение зрительной функции, анатомии сетчатки и/или параметра сосудистого заболевания сетчатки, как определено в изобретении, у пациента, имеющего риск возникновения упомянутого ухудшения.

Зрительная функция может включать, например, остроту зрения, остроту зрения при низкой освещенности, поля зрения, центральное поле зрения, периферическое зрение, контрастную чувствительность, темновую адаптацию, восстановление после фотостресса, цветовую дискриминацию, скорость чтения, зависимость от вспомогательных устройств (например, большой шрифт, увеличительные приборы, телескопы), распознавание лиц, пригодность к управлению транспортным средством, способность выполнять одну или несколько операций в повседневной жизни и/или сообщение об удовлетворенности пациентом по отношению к зрительной функции.

Примерные показатели зрительной функции включают остроту зрения по Снеллену (Snellen), остроту зрения по стандартной шкале оценки остроты зрения ETDRS, остроту зрения при низком уровне яркости, сетку Амслера, поле зрения по Голдманну (Goldmann), поле зрения по Хамфри (Humphrey), микропериметрию, диаграммы Пелли-Робсона (Pelli-Robson), карты SKILL, цветные пластины Исихара, цветовой тест Фарнsworthа D15 или D100, стандартную электроретинографию, мультифокальную электроретинографию, проверочные тесты на скорость считывания, распознавания лица, моделирование вождения и сообщение пациента о своей удовлетворенности. Таким образом, лечение сосудистых заболеваний и/или макулярного отека может считаться достигнутым при улучшении или отсутствии утраты зрения по шкале ETDRS в две или больше строк (или буквы 10). Дополнительно, лечение сосудистых заболеваний и/или макулярного отека можно считать достигнутым, если индивид проявляет по меньшей мере 10%-ное увеличение или отсутствие снижения на 10% скорости чтения (число слов в минуту). Дополнительно лечение сосудистых заболеваний и/или макулярного отека можно считать достигнутым, если индивид проявляет по меньшей мере 20%-ное увеличение или отсутствие снижения на 20% доли правильно указанных пластин в тесте Исихара, или правильно различных дисков в тесте Фарнsworthа. Дополнительно лечение сосудистых заболеваний и/или макулярного отека можно считать достигнутым, если индивид имеет, например, по меньшей мере 10%-ное снижение или отсутствие увеличения на 10% или больше количества времени на заранее заданную степень адаптации к темноте. Дополнительно лечение сосудистых заболеваний и/или макулярного отека можно считать достигнутым, если у индивида выявлено, например, по меньшей мере 10%-ное уменьшение или отсутствие увеличения на 10% или больше общей площади визуальной скотомы, выраженной как угол обзора, который определяется квалифицированным медицинским работником (т.е. офтальмологом).

Нежелательные аспекты анатомии сетчатки, лечение или профилактику которых можно осуществлять, включают, например, микроаневризму, макулярный отек, ватные пятна, интратретинальные микрососудистые аномалии (ИРМА), закупорку капилляров, лейкоцитарную адгезию, ишемию сетчатки, неоваскуляризацию диска зрительного нерва, неоваскуляризацию заднего полюса, неоваскуляризацию радужной оболочки, интратретинальное кровоизлияние, кровоизлияние в стекловидное тело, макулярную

звезду, субретинальный фиброз и фиброз сетчатки, расширение венозных сосудов, извитость сосудов, пропотевание жидкости через сосуды. Таким образом, результаты лечения, например, макулярного отека, можно определять по уменьшению толщины центрального ретинального суб-поля на 20% или больше, что измеряют с помощью оптической когерентной томографии.

Примеры способов оценки анатомии сетчатки включают такие способы, как офтальмоскопия, фотография глазного дна, флуоресцентная ангиография, ангиография с индоцианиновым зеленым красителем, оптическая когерентная томография (ОКТ), спектральная оптическая когерентная томография, сканирующая лазерная офтальмоскопия, конфокальная микроскопия, адаптивная оптика, аутофлуоресценция глазного дна, биопсия, аутопсия и иммуногистохимический анализ. Таким образом, сосудистые заболевания и/или макулярный отек можно считать вылеченными, если у индивида выявляют уменьшение зоны пропотевания жидкости через сосуды на 10%, что определяют с помощью флуоресцентной ангиографии.

Индивидам с назначенным лечением терапевтическими агентами согласно настоящему изобретению также можно вводить другие терапевтические агенты и применять известные способы лечения состояний, связанных с сахарным диабетом, например все формы инсулина и антигипертензивных препаратов.

Офтальмолог или специалист медицинской помощи может определять лечение и/или профилактику глазных болезней, таких как возрастная макулярная дегенерация (ВМД), окклюзия вен сетчатки (ОВС), отек Квинке, мультифокальный хориоидит, миопическая хориоидальная неоваскуляризация и/или ретинопатия недоношенных, с помощью клинически значимых измерений зрительной функции и/или анатомии сетчатки любым из описанных выше способов. Хотя способы, как описано в изобретении, не применяются при каждом заболевании глаз, упомянутых в настоящем изобретении, специалисту в данной области будет очевидно, какие именно клинически значимые способы измерения зрительной функции и/или анатомии сетчатки можно применять для лечения конкретного заболевания глаз.

Если терапевтические агенты настоящего изобретения вводятся вместе с другим агентом, эти два агента можно вводить последовательно в любом порядке или одновременно. В некоторых аспектах анти-тело по настоящему изобретению вводят индивиду, который также получает лечение вторым агентом (например, препаратом Луцентис®). В других аспектах связывающую молекулу вводят в комбинации с хирургическим лечением.

Подходящие агенты для комбинированной терапии с антителами, связывающимися с ЭПО, включают агенты, известные в данной области, которые способны модулировать активность VEGF, VEGF-рецепторов, других ингибиторов рецептора тирозинкиназы или других веществ, которые модулируют HIF-1-опосредуемый путь. Известны другие агенты, которые ингибируют эти пути, включающие ранибизумаб, бевицизумаб, пегаптаниб, афлиберцепт, пазопаниб, сорафиниб, сунитиниб и рапамицин. Препараты, комбинированные с противовоспалительными агентами, такими как кортикостероиды, неспецифические противовоспалительные средства (НПВС) и ингибиторы ФНО- α , также могут быть полезными в лечении сосудистых заболеваний сетчатки и макулярного отека, например диабетической ретинопатии и ДМО.

Схема комбинированного лечения может быть аддитивной, или она может вызывать синергетические результаты (например, снижение тяжести ретинопатии больше ожидаемого при комбинированном применении двух агентов). В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к комбинированной терапии для профилактики и/или лечения сосудистых заболеваний сетчатки и макулярного отека, в частности диабетической ретинопатии, в том числе ДМО и/или НДР, как описано выше, с помощью связывающегося с ЭПО антитела по изобретению и антиангиогенного агента, например анти-VEGF агента.

Фармацевтические композиции.

Настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим связывающиеся с ЭПО антитела (интактные или связывающие фрагменты), объединенные в композицию с фармацевтически приемлемым носителем. Композиции могут дополнительно содержать один или несколько других терапевтических агентов, подходящих для лечения или профилактики, например, диабетической ретинопатии.

Фармацевтически приемлемые носители усиливают или стабилизируют композицию или их можно использовать для облегчения изготовления композиции. Фармацевтически приемлемые носители включают растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические агенты и замедляющие абсорбцию агенты и т.п., которые являются физиологически совместимыми.

Фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно вводить различными способами, известными в данной области. Путь и/или способ введения варьируют в зависимости от желаемых результатов. Предпочтительно осуществлять введение интравитреально, внутривенно, внутримышечно, внутривнутрибрюшинно или подкожно или вводить проксимально по отношению к целевой локализации. Фармацевтически приемлемый носитель должен подходить для интравитреального, внутривенного, внутримышечного, подкожного, парентерального, спинального или эпидермального введения (например, путем

инъекции или инфузии). В зависимости от способа введения на активное соединение, т.е. на антитело, биспецифичную и мультиспецифичную молекулу можно наносить покрытие материалом, который будет защищать это соединение от действия кислот и других естественных условий, которые могут инактивировать соединение.

Композиция должна быть стерильной и жидкой. Можно поддерживать надлежащую текучесть, например, с помощью покрытия, такого как лецитин, путем сохранения необходимого размера частиц в случае дисперсии и с помощью поверхностно-активных веществ. Во многих случаях предпочтительно включать в композицию изотонические агенты, например сахара, многоатомные спирты, такие как маннит или сорбит, и хлорид натрия. Можно осуществлять замедленную абсорбцию инъекционных композиций путем включения в композицию агента, который замедляет абсорбцию, например моностеарат алюминия или желатин.

Фармацевтические композиции по изобретению могут быть получены в соответствии со способами, хорошо известными и обычно практикуемыми в данной области. См., например, руководства Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Mack Publishing Co., 20th ed., 2000; и Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978. Фармацевтические композиции предпочтительно изготавливают в условиях GMP. Обычно в фармацевтических композициях по настоящему изобретению используют терапевтически эффективную дозу или эффективную дозу связывающегося с ЭПО антитела. Рецептuru связывающихся с ЭПО антител создается в фармацевтически приемлемой лекарственной форме общепринятыми способами, известными специалистам в данной области. Схемы введения корректируются с целью обеспечения оптимального желаемого ответа (например, терапевтического ответа). Например, можно вводить однократный болюс, можно вводить несколько отдельных доз в течение продолжительного времени, или можно пропорционально уменьшать или увеличивать дозу, как этого требует терапевтическая ситуация. Особые преимущества дает рецептuru парентеральных композиций в монолитной лекарственной форме для простоты введения и равномерности дозировки. Используемая в изобретении лекарственная форма относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве единичных доз для индивидов, подлежащих лечению; при этом каждая единица содержит заданное количество активного соединения, рассчитанное на получение желаемого терапевтического эффекта, в комбинации с необходимым фармацевтическим носителем.

Фактические уровни доз активных ингредиентов в фармацевтических композициях по настоящему изобретению можно варьировать так, чтобы получить количество активного ингредиента, которое эффективно для достижения желаемого терапевтического ответа у конкретного пациента, и получить композицию и способ введения без токсичности для пациента. Выбранный уровень дозировки зависит от различных фармакокинетических факторов, включающих активность конкретных используемых композиций по настоящему изобретению, или их сложного эфира, соли или амида, путь введения, время введения, скорость экскреции конкретного используемого соединения, продолжительность лечения, другие препараты, соединения и/или материалы, используемые в комбинации с конкретными композициями, возраст, пол, вес, общее состояние здоровья и анамнез пациента, которого лечат, и подобные факторы.

Лечащий врач или ветеринар может вводить стартовые дозы антител по изобретению, используемых в фармацевтической композиции, в количестве, которое меньше, чем требуется для достижения желаемого терапевтического эффекта, и постепенно повышать дозы до момента достижения желаемого эффекта. В общем, эффективные дозы композиций по настоящему изобретению для лечения сосудистых заболеваний сетчатки, описанных в изобретении, варьируются в зависимости от множества факторов, включающих способы введения, целевую локализацию, физиологическое состояние пациента, введение других лекарств, от того, является ли пациент человеком или животным, и является ли лечение профилактическим или терапевтическим. Лечебные дозы необходимо титровать для оптимизации безопасности и эффективности. При системном введении антитела диапазоны доз составляют примерно от 0,0001 до 100 мг/кг и чаще от 0,01 до 15 мг/кг от массы тела индивида. При введении антитела в стекловидное тело доза может варьироваться от 0,1 до 10 мг/глаз. Более конкретно доза может быть в диапазоне от 1 до 9 мг/глаз, от 2 до 8 мг/глаз, от 3 до 7 мг/глаз, от 4 до 6 мг/глаз или от 4,5 до 5,5 мг/глаз. В некоторых случаях доза может составлять 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 мг/глаз. Примерная схема лечения подразумевает системное введение один раз каждые две недели, или один раз в месяц, или один раз в период от 3 до 6 месяцев. Примерная схема лечения подразумевает системное введение один раз каждые две недели, или один раз в месяц, или один раз в период от 3 до 6 месяцев, или по мере необходимости (PRN).

Антитело обычно вводят многократно. Интервалы между отдельными дозами могут представлять собой еженедельное, ежемесячное или ежегодное введение. Интервалы могут также быть нерегулярными, по показаниям посредством измерения содержания в крови связывающегося с ЭПО антитела в организме пациента. Дополнительно альтернативные интервалы введения могут определяться лечащим врачом, и в целях эффективности введения его можно осуществлять один раз в месяц или по мере необходимости. Основой эффективности является увеличение поражения, скорость восстановления Луцентисом®, толщина сетчатки, которую определяют с помощью оптической когерентной томографии (ОКТ), и острота зрения. В некоторых способах системного введения дозы регулируют для достижения концен-

трации в плазме антител от 1 до 1000 мкг/мл, и в некоторых способах доза составляет от 25 до 500 мкг/мл. Альтернативно, антитела можно вводить в композиции с пролонгированным высвобождением, и в этом случае требуется менее частое введение. Дозировка и частота варьируются в зависимости от периода полувыведения антитела в организме пациента. В общем, гуманизированные антитела имеют более длительный период полувыведения, чем химерные антитела и антитела нечеловеческого происхождения. Дозировка и частота приема могут варьироваться в зависимости от профилактической или терапевтической направленности лечения. Для профилактического применения относительно низкие дозы вводят с относительно редкими интервалами в течение длительного периода времени. Некоторые пациенты продолжают получать лечение всю оставшуюся жизнь. При терапевтическом применении иногда требуются относительно высокие дозы за относительно короткие промежутки времени, пока не уменьшится или не прекратится прогрессирование заболевания, и предпочтительно до тех пор, когда у пациента появится частичное или полное облегчение симптомов заболевания. После этого пациенту можно вводить дозы по профилактической схеме.

Примеры

Следующие примеры предназначены для дополнительной иллюстрации изобретения, но не ограничивают его объем. Для специалистов в данной области будут очевидны другие варианты осуществления изобретения, которые входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

Пример 1. Создание ЭПО антител со зрелой аффинностью.

Для создания связывающихся с ЭПО антител по изобретению были использованы полностью библиотеки фагового дисплея человека.

Биотинилированный и не биотинилированный ЭПО обезьян циномолгус и ЭПО человека были использованы для пеннинга в растворе и в твердой фазе. Применяли стандартный пеннинг, а также методики RapMAT (Prassler et al., (2009) Immunotherapy 1 (4):571-583). После вторичного скрининга и RapMAT пэннинга проводили селекцию клонов для анализа последовательности, и был отобран набор из 8 антител для превращения в формат FabCys, для гуманизирования, оптимизации pI и удаления сайтов дезамидирования. Создание FabCys осуществляли с помощью патентованного способа RapCLONE®. Выполнение способа RapCLONE® было двухступенчатым для удобного и эффективного преобразования большого количества Fab клонов в формат IgG и FabCys. На первом этапе клонирования эукариотическую кассету экспрессии вводили в вектор экспрессии pMORPH®×11 (для HuCAL PLATINUM®) путем расщепления посредством BsiWI/MfeI (для популяции κ) или HpaI/MfeI (для популяции λ) и последующего лигирования. Затем проводили второй этап клонирования, в котором Fab-популяции, содержащие кассеты экспрессии, подвергались расщеплению с помощью EcoRV/BspI (популяции κ и λ), а затем клонированию в акцепторный вектор pMorph®4_1gG1f или pMorph®4_h_FabCys для экспрессии в клетках млекопитающих. Для этой цели RapCLONE® применяли только на уникальном, секвенированном и идентифицированном Fab. Поэтому все клоны подвергались восстановлению после RapCLONE®.

Низкие значения pI (<8,2) обычно ассоциируются с плохими биофизическими свойствами, включающими устойчивость и агрегацию. Были отобраны 8 окончательных кандидатов (уникальные клоны HCDR3) для гуманизирования, оптимизации pI и удаления сайтов дезамидирования, что в результате дало 12 гуманизированных вариантов. Были синтезированы 12 VL-генов (два гена для 11317, 11324, 11331 и 11345) и один VH (11324). Возможно, по причине ранней деселекции кандидатов с PTM, были выявлены только 11317 (VL), 11332 (VL) и 11380 (VH), содержащие сайты дезамидирования, которые были удалены с этапа гуманизирования. Гуманизирование в целом проводили до ближайшей зародышевой линии. Для увеличения pI была выбрана зародышевая линия лямбда 3h для 6 кандидатов, вместо или в дополнение к ближайшей зародышевой линии 3R. Чтобы минимизировать риск, дополнительно были сконструированы лямбда 3j варианты для трех кандидатов (11317, 11331 и 11345).

Исходное антитело	PTM-модификации*	pI-модификации**	Конечный FabCys	Конечное значение pI в FabCys
11317	3j, S96T	NA	NVS4	9,4
11319	3h	Q105R	NVS1	8,3
11331	3h	Q1E	NVS2	8,8
11380	3h	Q105R, S33T	NVS3	8,3

NA, не применимо,

*все PTM-модификации встречаются в VL,

** pI-модификации встречаются в VH.

Как упоминалось выше, pI белка является ключевым фактором, определяющим общие биофизические свойства молекулы. Анти-ЭПО Fab-фрагменты, идентифицированные из библиотеки фагового дис-

плея, имели pI ниже чем 8,2. Для улучшения производственных свойств были специально сконструированы антитела для повышения показателя pI и улучшения их свойств в качестве лекарств. Увеличение pI у анти-ЭПО Fab улучшило их растворимость, что позволяет создавать рецептуру Fab с более высокими концентрациями (>100 мг/мл). Рецептура Fab при высоких концентрациях (например, >100 мг/мл) имеет то преимущество, что можно вводить более высокие дозы Fab в глаза пациентов путем интравитреальных инъекций, что в свою очередь может позволить снизить частоту введения, и это дает значительное преимущество для лечения хронических заболеваний глаз, включающих без ограничения влажную ВМД и диабетическую ретинопатию.

Полученные Fab указаны в табл. 1 (NVS1, NVS2, NVS3 и NVS4).

Пример 2. Характеристика оптимизированных антител.

В следующем примере описаны способы, которые можно использовать для измерения аффинности антител. Эти и другие способы измерения аффинности связывания известны в данной области.

Определение аффинности.

Аффинность антитела к ЭПО измеряется с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с использованием Biacore® T200 (Biacore) и раствора равновесного титрования (SET). Пояснения к каждой методике и соответствующие средние результаты связывания ЭПО описаны ниже. Допущение, принимаемое при моделировании, учитывает значения концентрации ЭПО в системе, кинетику биосинтеза ЭПО и период полувыведения, а также желаемую схему введения, и предполагают, что Fab со аффинностью к ЭПО менее 50 пМ является достаточным для снижения уровня содержания свободного ЭПО.

Определение Biacore.

Кинетика взаимодействия, т.е. скорость образования комплекса (K) и скорость диссоциации (K_d), может быть определена по данным сенсограммы. Если связывание происходит по мере прохождения образца через подготовленную сенсорную поверхность, увеличивается отклик сенсограммы. При достижении равновесия будет замечен постоянный сигнал. Замена образца на буфер вызывает диссоциацию связанных молекул и отклик уменьшается. Программное обеспечение для оценки Biacore генерирует значения K_A и K_D путем подбора данных для моделей взаимодействия.

Для осуществления способа использовали три проточных ячейки. Проточная ячейка 1 (fc1) служила в качестве эталона, где не было захвата ЭПО Fab, на предмет неспецифичного связывания с ЭПО антитела, нанесенного на поверхность чипа. Оба этапа, и захват и связывание, проводились на проточных ячейках 2-4.

Этап захвата. В целях достижения $R_{max}=20$ уровень захвата анти-huFab на fc2-4 составлял приблизительно 50RL. Анти-huFab в концентрации 1 мкг/мкл протекал через ячейку Fc2-4 со скоростью потока 10 мкл/мин.

Расчеты относительно R_{max} проводили следующим образом:

$$\text{Fab: } R_{\text{max}} = R_L * (MW_{\text{аналит}} / MW_{\text{лиганд}}) * \text{стехиометрия}$$

$$20 = RL * (21,4 / 50) * 1 = 50 \text{ RL}$$

MW = молекулярная масса.

Исходная концентрация аналита составляла 20 нМ и включала 8 разведений 1:2 в двух повторах при 2,5 нМ для длинной и короткой диссоциации. Аналит проходил со скоростью потока 60 мкл/мин в течение 240 с. Время диссоциации было установлено в 4000 и 600 с. Время диссоциации было установлено на уровне 4000 с для концентраций анализируемого вещества для NVS2 и NVS4, которая составляла 10, 2,5 и 0,3125 нМ. После инъекции образца выполняли этап промывки буфером для регенерации.

Регенерацию проводили в конце каждого цикла на всех проточных ячейках. Условия регенерации в этом способе представляли собой 1% фосфорную кислоту с 10%-м раствором гидроксида натрия при 60 мкл/мин в течение 100 с.

Весь остальной эксперимент проводили в условиях при 25°C в 1xHBS-EP+буфер (Biacore Cat # BR-1006-69). Полученные сигналы корректировали с помощью двойного эталона, т.е. вычитали значения показателя преломления от контрольной проточной ячейки и этапа связывания с отсутствием аналита. Данные собирали при 10 Гц и анализировали с помощью программного обеспечения Biacore® T100 Evaluation Software, версия 1.1 (GE Healthcare). Эта программа использует способ глобальной подгонки анализа для определения скорости и константы аффинности для каждого взаимодействия.

Результаты определения с помощью Biacore кинетики связывания приведены в табл. 2. Как показано в таблице, как описано в изобретении, антитела проявляют высокую аффинность связывания с ЭПО человека с K_D , значение которой обычно меньше или равно 40 пМ.

Аффинность связывания антител с ЭПО (Biacore)

ЭПО	K _D (пМ)			
	NVS2	NVS3	NVS4	NVS1*
Человека	34,2	37	27,1	11
Дарбопэтин человека	23,5	ND	18,1	ND
Циномолгус	78,7	49	76,0	31
Мыши	44,9	1	30,5	22
Крысы	56,6	38	34,4	41
Кролика	5160	674	ND	661

ND: не определено.

* Данные, показанные для NVS1, являются единичной точкой данных.

Определение SET.

В отличие от кинетических анализов посредством сенсорных поверхностей, например SPR, способ SET представляет собой определение показателей аффинности в растворе. Это является равновесным измерением, которое не предоставляет кинетических данных.

В SET постоянное количество антитела инкубируют с различными концентрациями антигена, пока не будет достигнуто равновесие. Концентрация свободного антитела в уравновешенном растворе определяется с помощью нанесения раствора на пластины MSDTM, покрытые антигеном (Meso Scale DiscoveryTM), с последующей инкубацией с ECL-меченым вторичным антителом и измерением интенсивности сигнала. При низких концентрациях антигена достигается мощный сигнал (высокая концентрация свободного антитела, которое связывается с антигеном на пластине), тогда как при высокой концентрации антигена происходит полный захват антигена антителом, в результате чего получают слабый сигнал. Если доступно достаточное количество антигена с концентрацией в соответствующем диапазоне, кривая титрования позволяет объективно определить аффинность, используя соответствующую модель подгонки. Для полного титрования должны применяться концентрации антигена по меньшей мере в 10 раз выше, чем ожидаемая K_D. Постоянная концентрация антитела, применяемая в анализе, должна быть в диапазоне K_D или ниже K_D (табл. 3).

Для определения K_D с помощью SET использовали мономерные фракции белка антитела (по меньшей мере 90% содержания мономера, что устанавливали с помощью аналитической SEC; Superdex75 (Amersham Pharmacia) для Fab, или TOSOH G3000SWXL (TOSOH BIOSCIENCE) для IgG соответственно).

Определение аффинности в растворе в основном проводили согласно описанию в литературе (Friguet et al. 305-19). Для повышения чувствительности и точности способа SET его перенесли от классической ELISA в методику на основе ECL (Haenel et al., 2005).

Антитела к ЭПО разводили до фиксированной концентрации в инкубационном буфере (фосфатно-буферный раствор (ФБР) с 2% бычьего сывороточного альбумина БСА (Sigma Cat. # A4503) и 1% Твин 20 и 1% Тритон-Х (Sigma Cat # 234729)) и добавляли к ЭПО в серийном разведении (1:5) в инкубационном буфере.

Конечная максимальная концентрация ЭПО:

человека, Ну-дарбопэтин, ЭПО обезьян циномолгус, мыши, крысы = 10 нМ;
кролика = 100 нМ.

Конечные концентрации Fab:

NVS2: 2 пМ, за исключением кролика = 30 пМ,

NVS3: 2 пМ, за исключением кролика = 5 пМ,

NVS4: 2 пМ, за исключением кролика = 10 нМ,

NVS1: 2 пМ.

Образцы оставляли для достижения равновесия путем инкубации при комнатной температуре в течение ночи.

Покрытые стрептавидином стандартные MSD планшеты (Meso-Scale Discovery, 384-луночные: MSD Cat. # USA) блокировали в 25 мкл инкубационного буфера при комнатной температуре в течение 1 ч. Планшеты промывали 3 раза в буфере TBST (25 мМ Трис-буфера с 0,05% Твин 20), затем добавляли 0,1 мкг/мл биотинилированного-ЭПО в 25 мкл инкубационного буфера и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч. Планшеты промывали 3 раза в буфере TBST. Образцы, содержащие Fab и титрованный ЭПО, добавляли в планшеты (25 мкл) и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин. Планшеты промывали 3 раза в буфере TBST. Добавляли 25 мкл антитела обнаружения (античеловеческое (козье) сульфо-TAG, 1:1000 в инкубационном буфере, MSD Cat.# № R32AJ-1), и инкубировали при комнатной температуре в течение 60 мин. Планшеты промывали 3 раза в промывочном буфере

и добавляли 50 мкл буфера 1×MSD Read (с поверхностно-активным веществом, MSD Cat. # R92TC-1). Планшеты считывали на устройстве MSD Spector Imager 6000.

Три эксперимента были проведены в отдельные дни, каждая точка данных определена в трех повторях.

Данные анализировали с использованием программного обеспечения GraphPad Prism v4, при этом исходный уровень (средние показатели лунок, не содержащие Fab) вычитали из каждого значения. Значения X-оси (концентрация ЭПО в растворе) преобразованы в логарифм $10 \times$.

Значения K_D (KD) были установлены по следующей модели:

$$Y = \left(\frac{Top - \left(\frac{Top}{2 \times Fab} \right) \times \left(\left(\left(10^x \right) + Fab \right) + KD \right)}{\left(\left(\left(\left(10^x \right) + Fab \right) + KD \right) \times \left(\left(10^x \right) + Fab \right) + KD \right)} - \left(\left(4 \times \left(10^x \right) \right) \times Fab \right)^{0,5} \right)$$

Top = сигнал при концентрации антигена = 0,

x = концентрация ЭПО в растворе,

Fab = ограничение концентрации Fab установлено на уровне 1 пМ.

Показатели аффинности Fab к ЭПО были определены с использованием анализа SET, и полученные значения концентраций K_D [пМ] приведены в табл. 3. NVS2 связывался с ЭПО человека, дарбопэтином человека и ЭПО обезьян циномоглус с K_D , значение которой меньше 10 пМ. NVS2 также связывался с ЭПО мыши с K_D меньше чем 50 пМ и с ЭПО крысы с K_D меньше чем 20 пМ. NVS3 связывался с ЭПО человека, дарбопэтином человека, ЭПО обезьян циномоглус, ЭПО мыши и крысы с K_D , значение которой меньше 5 пМ. NVS4 связывался с ЭПО человека, дарбопэтином человека, ЭПО обезьян циномоглус, ЭПО мыши и крысы с K_D , значение которой меньше 10 пМ.

Таблица 3

Аффинность связывания антител с ЭПО (SET)

ЭПО	K_D (пМ)			
	NVS2	NVS3	NVS4	NVS1*
Человека	5,4	0,9	2,5	1,2
Дарбопэтин человека	3,7	0,5	1,3	ND
Циномоглус	7,3	0,8	7,3	4,4
Мыши	37,0	2,5	7,8	16,1
Крысы	12,7	1,2	12,7	5,4
Кролика	3864,7	39,9	28670	ND

ND: не определено.

* Данные, показанные для NVS1, являются единичной точкой данных.

Пример 3: Ингибирование ЭПО-индуцированной пролиферации клеток.

Для измерения потенциала анти-ЭПО лекарственных препаратов с помощью ингибирования ЭПО-зависимой пролиферации можно использовать клетки, рост и выживание которых зависят от эритропэтина. (Chiba et al., 1991).

Пример 3а. Анализ пролиферации клеток Ва/Ф3-ЕроR.

Этот анализ демонстрирует способность ЭПО антител ингибировать ЭПО-индуцированную пролиферацию клеток мыши в клетках Ва/Ф3, экспрессирующих рецептор ЭПО (клетки Ва/Ф3-ЕроR). Клетки Ва/Ф3 представляют собой IL-3-зависимые в отношении роста и выживания клетки, и было показано, что при трансформации с различными онкогенными тирозинкиназами эти клетки растут независимо от IL-3. После стабильной трансфекции с ЕроR клетки Ва/Ф3-ЕроR становятся IL-3-независимыми. Плазмида экспрессии млекопитающих рсDNA3.1, несущая ЕроR человека, была трансфицирована в клетки Ва/Ф3 с использованием системы нуклеофекции Амаха (номер по каталогу VCA-1003, Амаха GmbH) в соответствии с инструкциями производителя, с помощью устройства Nucleofector (Амаха, Nucleofector™ II).

Материалы

Материалы	Описание	Источник	№ по каталогу
384-луночный планшет	Матрица, 384-луночный микропланшет	ThermoScientific	50823639
384-луночный планшет	uClear-Plate Black, 384-луночный TC w/Lid	Greiner Bio-One	7881091
Среда RPMI 1640		Invitrogen	11875
ФБР		Hyclone	SH30071.03
Пенициллин/стрептомицин		Invitrogen	15140
Гигромицин В		Invitrogen	10687010
ЭПО		Genway	10-663-45072
Дарбопозтин		Sandoz	CAS #: 209810-58-2
Клетки Ва/F3-EpoR		Описаны в настоящем изобретении	
Реагент Cell Titer Blue		Promega	G8081

Содержание клеток.

Среда для роста: RPMI 1640/10% ФБР/1% пенициллин/стрептомицин/100 мкг/мл гигромицина В/1 ед./мл ЭПО.

Среда для анализа: RPMI 1640/10% ФБР/1% пенициллин/стрептомицин/100 мкг/мл гигромицина В.

Клетки Ва/F3-EpoR сохраняли в ростовой среде (RPMI 1640/10% ФБР/1% пенициллин/стрептомицин/100 мкг/мл гигромицин В/1 ед./мл ЭПО). Клетки разделяли приблизительно на 1×10^6 клеток/мл (каждые 3-4 дней) до $0,4-0,6 \times 10^5$ клеток/мл.

Анализ ЭПО-индуцированной клеточной пролиферации.

1. За день до эксперимента готовили клетки Ва/F3-EpoR путем центрифугирования для удаления ростовой среды, после чего клетки ресуспендировали в среде для анализа (RPMI 1640/10% ФБР/1% пенициллин/стрептомицин/100 мкг/мл гигромицина В), которая не содержит ЭПО.

2. В день эксперимента клетки промывали 2-3 раза в среде для анализа (центрифугирование 1000 об/мин в течение 5 мин) и ресуспендировали в среде для анализа на $1,25 \times 10^5$ клеток/мл.

3. 2500 клеток добавляли в каждую лунку для анализа в 384-луночным черном планшете (с прозрачным дном (ТС-обработка)).

4. Готовили серийные разведения ЭПО в 384-луночном микропланшете со средой для анализа таким образом, чтобы конечная концентрация ЭПО была в два раза выше, чем желаемая конечная концентрация.

5. 20 мкл серийно разведенного ЭПО (в трех повторах) добавляли три раза в тестовые лунки, содержащие клетки Ва/F3-EpoR в 384-луночном черном планшете.

6. Планшет вращали в центрифуге при 1000 об/мин в течение 30-60 с и инкубировали в течение 48 ч при 37°C, 5% CO₂.

7. За четыре часа до окончания во все лунки добавляли 8 мкл Cell Titer Blue и повторно инкубировали при 37°C, 5% CO₂.

8. Через 4 ч планшет считывали на ридере Beckman Coulter Paradigm с помощью Paradigm Multi-mode SW или совместимого сканера.

9. ЭПО стимулировали пролиферацию Ва/F3-EpoR клеток в 4 раза выше по сравнению с исходными данными. ЭПО стимулировали Ва/F3-EpoR со средним значением EC₅₀=110,2 мкМ в диапазоне от 10 до 26 пМ.

10. Анти-ЭПО антитела серийно разводили в трех повторах в 384-луночном микропланшете, содержащем 4 нг/мл ЭПО в среде для анализа и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре.

11. Указанную выше смесь ЭПО/анти-ЭПО антитело в количестве 20 мкл/на лунку добавляли в 384-луночный планшет с черными стенками, с предварительно засеянными ВаF3/ЕроR клетками, 2500 клеток на лунку.

12. После инкубации планшеты обрабатывали, как описано в этапах 7-9 выше.

Результаты.

ЭПО антитела ингибируют пролиферацию клеток Ва/F3-ЕроR в присутствии 1 нг/мл ЭПО через 48 ч. Антитела ингибируют пролиферацию клеток Ва/F3-ЕроR с IC_{50} , значение которой меньше или равно 350 пМ.

Таблица 4

Анализ	IC_{50} (пМ)				
	NVS2	NVS3	NVS4	NVS1	Еро26
Анализ Ва/F3	112,0	76,3	173,1	338	590

Пример 3b. Анализ пролиферации клеток F36E.

Пролиферация клеток F36E в значительной степени зависит от ЭПО. Стимуляция с ЭПО с помощью способов, описанных выше, обычно приводит к более чем 6-кратному возрастанию сигнала по сравнению с исходным. IC_{50} этой кривой составляет 7 пМ.

Протокол нейтрализации для анализа ЭПО-индуцированной пролиферации F36E клеток.

В анализе пролиферации с использованием линии F36E клеток использовали ЭПО-зависимую лимфоцитоподобную иммортализованную клеточную линию, происходящую из родительской линии клеток костного мозга, для скрининга анти-ЭПО терапевтических антител и отбора кандидатов для разработки.

Материалы

Материалы/реагенты	Источник	№ по каталогу
384-луночные полистироловые черные микропланшеты для клеточных культур	Greiner One	Bio 781091
384-луночные полистироловые микропланшеты без крышки	Greiner One	Bio 781280
Среда RPMI 1640	Invitrogen	11875
ФБР	Hyclon	SH30071.03
Пенициллин/стрептомицин	Invitrogen	15140
Дарбопозтин	Sandoz	CAS #: 209810-58-2
Клетки F36E	Riken Bank	Cell RCD0776
Реагент Cell Titer Blue	Promega	G8081
Моноклональное антитело Еро26 анти-человеческое к ЭПО	Stem Cell Tech	01350

Содержание клеток.

Дарбопозтин, представляющий собой рекомбинантный гипергликозилированный ЭПО человека, был использован для описанных в изобретении анализов содержания и пролиферации клеток. Дарбопозтин стимулирует пролиферацию в клетках F36E со сравнимой IC_{50} рекомбинантного ЭПО человека (63,2 пг/мл для дарбопозтина и 81,25 пг/мл для эритропозтина, см LU-15432, с. 44). Клетки F36E содержали в питательной среде (RPMI 1640/5% ФБР/1% пенициллин/стрептомицин/5,2 U/мл dЕро) при минимальной плотности 0,25 еб клеток на 1 мл до максимальной плотности 1,0 еб клеток на 1 мл, до 10 пассажей.

Протокол анализа ЭПО=индуцированной пролиферации.

1. ЭПО разводили в среде для анализа (RPMI1640/5% ФБР/1% пенициллин/стрептомицин) до 4 нг/мл, в 4 раза выше желаемой конечной концентрации.

2. Анти-ЭПО антитела разводили в среде для анализа до 200 нМ с 4-кратным превышением конечной концентрации и в этой концентрации их шестикратно серийно разводили в среде для анализа. Разве-

дение повторяли для положительного референс-антитела (например, Eро26) и отрицательного референс-антитела (например, антикуриное лизоцимное моноклональное антитело).

3. Серийные разведения 7,5 мкл разведенного dEpo и 7,5 мкл анти-ЭПО антител смешивали в 384-луночном полипропиленовом микропланшете в трех повторах и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин.

4. Клетки F36E (2e6 на 384-луночный планшет) осаждали, ростовую среду отсасывали и клетки промывали однократно в среде для анализа (центрифугирование 1200 об/мин, 5 мин), затем ресуспендировали в среде для анализа до получения $3,33 \times 10^5$ клеток/мл.

5. Клетки в количестве 15 мкл/лунку (5000 клеток/лунку) добавляли во все лунки в 384-луночный полистирольный культуральный планшет.

6. 15 мкл смеси антитело-ЭПО добавляли к клеткам.

7. Инкубировали 68 ч при 37°C, 5% CO₂.

8. Добавляли 8 мкл Cell Titer Blue в каждую лунку и инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 4 ч.

9. Флуоресценцию измеряли с эмиссией 560 (20)Eх/590 (10) Em на флуорометре Fluogospin Ascent Microplate или совместимом сканере.

10. Вносили среднее значение RFU \pm стандартное отклонение по сравнению с nM антитела и определяли IC₅₀ по подгонке кривой нелинейной регрессии с помощью программного обеспечения Graph Pad Prism.

Результаты.

Анти-ЭПО антитела ингибируют пролиферацию клеток F36E с IC₅₀, значение которой меньше или равно 200 пМ.

Таблица 5

Анализ	IC ₅₀ (пМ)				
	NVS2	NVS3	NVS4	NVS1	Epo26
Анализ F36E	144,1	88,7	182,7	175	590

Пример 4. Связывание эпитопов.

Исследования синтетических пептидов и процессирование пептидов.

Были синтезированы или рекомбинантно экспрессированы синтетические пептиды, соответствующие структурным доменам ЭПО человека (чЭПО), доменных процессированных чЭПО или химерных молекул, содержащих участки чЭПО и тромбозина человека (чТРО). Положительное связывание с синтетическими пептидами показало, что остатки, содержащиеся в этом домене ЭПО, были вовлечены в связывание с анти-ЭПО антителом. Для процессированных белков потеря связывания указывает на вовлечение процессированного участка в связывание с анти-ЭПО антителом. Вместе с тем, потеря связывания не исключает возможность того, что процессирование значительно изменяет структуру оставшегося белка таким образом, чтобы воздействовать на связывание с анти-ЭПО антителами. Химерное соединения ЭПО человека с ТРО человека позволяют сохранять структуру и при этом допускают проводить картирование эпитопов. Потеря связывания к варианту, который содержал часть чТРО, показала, что гомологичные области в чЭПО имеют важное значение для связывания с анти-ЭПО антителом.

Картирование пептидных эпитопов из антиэритропоэтиновых антител.

Были синтезированы следующие шесть пептидов (табл. 6), соответствующие спиралам эритропоэтина.

Таблица 6

Пептид	Последовательность	Домен ЭПО
1	SEQ ID NO: 86 RLICDSRVLEERYLLEAKEAENITTG	Спираль А
2	SEQ ID NO: 89 ITVPDTKVNIFYAWKRM	Петля А-В
3	SEQ ID NO: 87 EVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLVNS	Спираль В
4	SEQ ID NO: 90 EPLQLHVDKAVSGLRSLTLLLRALGAQKEAISPPD	Спираль С
5	SEQ ID NO: 91 DKAVSGLRSLTLLLRAL	Спираль С
6	SEQ ID NO: 88 TFRKLFVYSNFLRGKCLKLYTGEACR	Спираль D

Методика анализа.

1. 25 мкл пептида в ФБР (5 мкг/мл) наносили на 384-луночный стандартный планшет MSD (Mesoscale Discovery, Cat. No.L21XA-4) в течение ночи.

2. Планшет блокировали 90 мкл ФБР + 5% БСА 0,1% Твин-20/0,1% Тритон X-100 в течение 4 ч.

3. В планшет добавляли 500 нМ MorphoSys Eро Fab в разбавителях ФБР + 2% БСА 0,1%/Твин-20/0,1% ТритонX-100 и инкубировали в течение 1 ч.

4. Планшет промывали и инкубировали с сульфo-tag античеловеческим IgG (Meso Scale Discovery, Cat. No. R32AJ-1) к ЭПО Fab или видам, подходящим для эталонных белков/антител (1 ч).

5. Планшет промывали и добавляли раствор MSD Read (Meso Scale Discovery, Кат. R92TC-1).

6. Считывали планшет.

Картирование эпитопов антиэритропоэтиновых антител с процессированными вариантами эритропоэтина.

ЭПО вариант 1: спираль А.

ЭПО вариант 2: спираль А, петля А-В.

ЭПО вариант 3: спираль А, петля А-В, спираль В.

ЭПО вариант 4: спираль А, петля А-В, спираль В, петля В-С, спираль С.

ЭПО вариант 5: полноразмерный эритропоэтин.

Методика анализа.

1. На планшет наносили биотинилированные НЕК293, экспрессирующие варианты ЭПО, на стандартный 384-луночный планшет со стрептавидином (Meso Scale Discovery, Cat. No.L21SA-1) в течение ночи при 4°C.

2. Планшет блокировали 90 мкл ФБР + 5% БСА 0,1% Твин-20/0,1% Тритон X-100 в течение 4 ч.

3. Планшет промывали и добавляли 500 нМ MorphoSys Eро Fab в планшет и инкубировали в течение 1 ч.

4. Планшет промывали и инкубировали с сульфo-tag античеловеческим IgG (Meso Scale Discovery, Cat. No. R32AJ-1) к Eро Fab или видам, подходящим для эталонных белков/антител (1 ч).

5. Планшет промывали и добавляли раствор MSD Read (Meso Scale Discovery, Кат. R92TC-1).

6. Считывали планшет.

Картирование эпитопов из антиэритропоэтиновых антител с химерными соединениями ЭПО/тромбопоэтин (ТПО) и ЭПО кролика/человека.

Химерные соединения ЭПО и ТПО (Eро/Тро).

Eро/Тро вариант 1: ЭПО человека со спиралью А ТПО.

Eро/Тро вариант 2: ЭПО человека с петлей А-В ТПО.

Eро/Тро вариант 3: ЭПО человека со спиралью В ТПО.

Eро/Тро вариант 4: ЭПО человека со спиралью С ТПО.

Eро/Тро вариант 5: ЭПО человека со спиралью D ТПО.

Химерные соединения ЭПО кролика/человека (Rb/Hu).

Rb/Hu Eро вариант 1: ЭПО кролика со спиралью А человека.

Rb/Hu Eро вариант 2: ЭПО кролика с петлей А-В человека.

Rb/Hu Eро вариант 3: ЭПО кролика со спиралью В человека.

Rb/Hu Eро вариант 4: ЭПО кролика с петлей В-С человека и спиралью С.

Rb/Hu Eро вариант 5: ЭПО кролика с петлей С-D человека.

Rb/Hu Epo вариант 6: ЭПО кролика со спиралью D человека.

Методика анализа.

1. 25 мкл химерных ЭПО в ФБР (2 мкг/мл) наносили на 384-луночный стандартный планшет MSD (Meso Scale Discovery, Cat. No.L21XA-4) в течение ночи при 4°C.

2. Планшет блокировали 90 мкл ФБР + 5% БСА 0,1% Твин-20/0,1% Тритон X-100 в течение 4 ч.

3. 500 нМ MorphoSys ЭПО Fab в разбавителях ФБР + 2% БСА/0,1% Твин-20/0,1% Тритон X-100 добавляли в планшет и инкубировали в течение 1 ч.

4. Планшет промывали и инкубировали с сульфо-tag античеловеческим IgG (Meso Scale Discovery, Cat. No. R32AJ-1) к Epo Fab или видам, подходящим для эталонных белков/антител (1 ч).

5. Планшет промывали и добавляли раствор MSD Read (Meso Scale Discovery, Cat.# R92TC-1).

6. Считывали планшет.

Общий протокол.

Стандартный 384-луночный планшет MSD для считывания (Meso Scale Discovery) покрывали пептидом (5 мкг/мл в ФБР, New England Peptide LLC) или химерными ЭПО (2 мкг/мл в ФБР) и инкубировали в течение ночи при 4°C. Биотинилированные процессированные варианты ЭПО (2 мкг/мл в ФБР) наносили на ночь на стандартный 384-луночный планшет со стрептавидином MSD для считывания. После промывки планшетов 1×TBST (Thermo Scientific, Cat. No 28360) планшеты блокировали в разбавителе (ФБР, 5% БСА, 0,1% Твин-20, 0,1% Тритон X-100) в течение 4 ч при комнатной температуре. Планшеты промывали 3 раза в TBST. 500 нМ антиэритропоэтиновых Fab добавляли на планшеты MSD с предварительным покрытием вариантами пептид/ЭПО в течение 1 ч. Планшеты промывали 3 раза с TBST и античеловеческим IgG-Sulfotag (1 мкг/мл, Meso Scale Discovery, Cat. No.R32AJ-1) и инкубировали в течение 60 мин. Планшеты промывали 3 раза в TBST и 1X считывающем буфере T Read Buffer T (Meso Scale Discovery, Cat.No.R92TC-1). Планшеты считывали на MSD Spector Imager 6000 и данные анализировали с использованием программного обеспечения GraphPad Prism v4.

Результаты.

Результаты показали минимальное связывание антител со следующими доменами (табл. 7). Не выявлено антител, связывающихся со спиралью С.

Таблица 7

	Спираль А	Петля А-В	Спираль D
NVS1	++		+
NVS2		++	+
NVS3	+	+	++
NVS4			++

(++) доминантный эпитоп; (+) обнаружено связывание.

Кристаллическая структура антител в комплексе с ЭПО.

Гликозилированный, рекомбинантный эритропоэтин (ЭПО) человека был получен от компании LEK Pharmaceuticals, Inc.

ЭПО подвергали дегликозилированию с использованием смеси для дегликозилирования белков (Protein De-glycosylation Mix, New England Biolabs, Cat.# P6039S). 30 мг чЭПО объединяли с 1 мл смеси для дегликозилирования белка и инкубировали при 37°C в течение 1 ч, и к этому времени дегликозилирование не было завершено, что определяли с помощью SDS-PAGE. Затем к ЭПО добавляли дополнительные 0,5 мл смеси для дегликозилирования белка и инкубировали дополнительно в течение 1 ч при 37°C. Анализ в геле показал почти полное дегликозилирование ЭПО. Этот белок затем дополнительно очищали с использованием 120 мл колонки Superdex75 (GE Healthcare, Cat. # 28-9893-33), эквивалентную с 25 mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl. Объединяли элюированные фракции, содержащие высокий уровень дегликозилированного чЭПО. Белковые комплексы были образованы путем объединения 5 мг дегликозилированного ЭПО с 7 мг NVS3, с последующей инкубацией на льду в течение 1 ч. Затем смесь белкового комплекса концентрировали и вносили в колонку 120 мл Superdex75, эквивалентную с 25 mM HEPES, pH 7,5, 150 mM NaCl. Фракции, содержащие оцененные в SDS-геле стехиометрические соотношения ЭПО: NVS3, объединяли и концентрировали до 19 мг/мл (концентрацию оценивали с помощью LCUV) (Pronova #27SN). С помощью этого концентрированного комплекса ЭПО:NVS3 делали скрининг кристаллизации. Кристаллы выращивали способом диффузии паров в сидячей капле, при этом капли содержали равные объемы белка и резервуарного раствора. Образование кристаллов проходило при 4°C при следующих условиях: 0,1M HEPes pH 7,0, 12% ПЭГ 3350, 50 mM дегидрата ацетата цинка. Кристаллы подвергали замораживанию с использованием следующего криозащитного раствора: 0,1M HEPes pH 7,0, 15% ПЭГ3350, 50 mM дегидрата ацетата цинка, 22% глицерина.

Дифракционные данные кристаллов комплекса ЭПО:NVS3 собирали в пучке 17-ID на устройстве Advanced Photon Source (Argonne National Laboratory, США). Данные были обработаны и масштабированы.

ны при 2,6 Å с помощью autoPROC (Global Phasing, Ltd) в пространственной группе C2 с размерами ячейки $a=125,57$ Å, $b=150,15$ Å, $c=163,84$ Å, $\alpha=90^\circ$, $\beta=110,81^\circ$, $\gamma=90^\circ$.

Структуру ЭПО:NVS3 определяли путем молекулярной замены с помощью Phaser (McCoy et al. (2007) *J. Appl. Cryst.* 40: 658-674). Разделяли на переменные и постоянные домены Fab из структуры 3HOT в базе данных PDB (Berman 2000) и структуры эритропоэтина человека (Syed et al., *Nature*. 1998 Oct 1:395 (6701):511-6, код PDB 1 EER) были использованы в качестве моделей поиска.

Окончательная модель, которая содержит 3 молекулы комплекса ЭПО:NVS3 в асимметричном блоке, была сконструирована в COOT (Emsley and Cowtan (2004) *Acta Cryst.* 60:2126-2132) и очищена до значений R и $R_{\text{свободный}}$ 23,0% и 26,7% соответственно, со среднеквадратичным отклонением СКО 0,010 Å и $1,34^\circ$ для значений длины связей и валентных углов соответственно, с использованием PHENIX (Adams et al., *Acta Cryst.* D66, 213-221 (2010)).

Кристаллическую структуру ЭПО:NVS3 определяли и очищали до 2,6 Å. Был выявлен асимметричный блок, состоящий из трех белковых комплексов ЭПО:NVS2, каждый из которых состоял из одного Fab, связанного с одним белком ЭПО. Два из этих комплексов образуют цинк-опосредуемый димер, и в третьем комплексе обнаружены более высокие b-факторы и более низкая плотность. Взаимодействия от Fab до ЭПО были опосредованы петлями из областей, определяющих комплементарность (CDR) из обеих цепей, тяжелой и легкой, из NVS3. Конформационные изменения ЭПО по сравнению с 1EER были ограничены петлями, расположенными дистальнее от эпитопа Fab, при СКО 0,5 Å для всех 144 выровненных аминокислот. Тяжелые и легкие цепи Fab NVS3 показывали типичные иммуноглобулиновые складки для этих доменов.

Кристаллическую структуру ЭПО:NVS3 использовали для определения эпитопа ЭПО из антиген-связывающего фрагмента NVS3. Поверхность взаимодействия на ЭПО была образована в основном остатками, содержащими остаток Ser⁹, Glu¹³, остатки от Thr⁴⁴ до Arg⁵³ и остатки от Asn¹⁴⁷ до Arg¹⁶². Они соответствуют элементам вторичной структуры ЭПО, обозначаемым как α -спираль A, петля β A- α B и α -спираль D. Эти остатки создавали трехмерную поверхность, которая распознавалась NVS3. Взаимодействия включали взаимодействия в каркасе, опосредуемые растворителями взаимодействия, а также прямые взаимодействия боковых цепей.

Таблица 8

Остатки, взаимодействующие с ЭПО, на NVS3

Аминокислота	Количество остатков	Зона контакта (Å ²)	Зона воздействия (Å ²)	Процент заглубленных остатков (%)
Ser	9	11,79	93,23	13
Glu	13	14,89	103,00	14
Thr	44	22,47	61,60	36
Lys	45	39,98	172,59	23
Val	46	34,38	55,22	62
Asn	47	48,17	81,92	59
Phe	48	83,76	129,76	65
Tyr	49	96,12	137,70	70
Ala	50	12,68	57,03	22
Trp	51	0,63	43,74	1
Lys	52	23,97	135,25	18
Arg	53	49,96	181,86	27
Asn	147	34,39	48,65	71
Arg	150	73,32	140,37	52
Gly	151	18,97	24,63	77
Lys	154	73,59	127,20	58
Leu	155	34,85	75,06	46
Gly	158	18,59	43,31	43
Glu	159	32,95	122,17	27
Arg	162	36,72	185,91	20

Остатки ЭПО, которые содержат атомы в контакте с NVS3, приведены в табл. 9. Расположение контакта определено в пределах 5 Å в NVS3 с учетом потенциальных взаимодействий, опосредуемых водой.

Таблица 9

Белок	Аминокислота	Положение последовательности*	Домен ЭПО
ЭПО	S	9	Спираль A
ЭПО	E	13	Спираль A
ЭПО	T	44	Петля A-B
ЭПО	K	45	Петля A-B
ЭПО	V	46	Петля A-B
ЭПО	N	47	Петля A-B
ЭПО	F	48	Петля A-B
ЭПО	Y	49	Петля A-B
ЭПО	A	50	Петля A-B
ЭПО	W	51	Петля A-B
ЭПО	K	52	Петля A-B
ЭПО	R	53	Петля A-B
ЭПО	N	147	Спираль D
ЭПО	R	150	Спираль D
ЭПО	G	151	Спираль D
ЭПО	K	154	Спираль D
ЭПО	L	155	Спираль D
ЭПО	G	158	Спираль D
ЭПО	E	159	Спираль D
ЭПО	R	162	Спираль D

*Положение последовательности по отношению к SEQ ID NO: 81.

Перечислены ЭПО-остатки, которые содержат атомы, контактирующие с NVS2. Расположение контакта определено в пределах 5 Å в белке-партнере с учетом потенциальных взаимодействий, опосредуемых водой.

Таблица 10

Белок	Аминокислота	Положение последовательности*	Домен ЭПО
ЭПО	E	23	Спираль A
ЭПО	D	43	Петля A-B
ЭПО	T	44	Петля A-B

ЭПО	K	45	Петля А-В
ЭПО	V	46	Петля А-В
ЭПО	N	47	Петля А-В
ЭПО	F	48	Петля А-В
ЭПО	Y	49	Петля А-В
ЭПО	A	50	Петля А-В
ЭПО	K	52	Петля А-В
ЭПО	R	53	Петля А-В
ЭПО	R	131	Спираль D
ЭПО	R	143	Спираль D
ЭПО	N	147	Спираль D
ЭПО	R	150	Спираль D
ЭПО	G	151	Спираль D
ЭПО	K	154	Спираль D
ЭПО	L	155	Спираль D
ЭПО	E	159	Спираль D
ЭПО	R	162	Спираль D

* Положение последовательности по отношению к SEQ ID NO: 81.

Пример 5. Модель in vivo.

Пример 5а. Мышиная модель глазного отека.

Мышам C57/Bl6 (Taconic) субретинально вводили ssAAV2-EPO-eGFP (DR005) и ssAAV2-eGFP (TM003) (контроль). Мышей умерщвляли через три недели (21 дней) после инъекции. Делали плоские срезы сетчатки и измеряли калибра сосудов.

Методики.

Субретинальные инъекции ssAAV2-EPO-eGFP и ssAAV2-eGFP.

Мыши C57/Bl6 в возрасте 8 недель были разделены на две группы (по 10 мышей в каждой, 20 глаз на группу) и этим мышам субретинально вводили 1 мкл ssAAV2 на 2×10^9 DRP/мкл. Первая группа (контрольная) получала субретинальное введение ssAAV2-EPO (TM003), и второй группе (экспериментальной) вводили ssAAV2-eGFP (DR005). Эффект ЭПО мыши на изменение сосудов сетчатки был изучен на плоских срезах сетчатки через 21 день после инъекции.

Тестировали следующие AAV (аденоассоциированные вирусы): ssAAV2-EPO-eGFP [(AAV2-CMV-mEPO-IRES-eGFP), полученный из Центра генной терапии Университета Северной Каролины (Gene Therapy Center Virus Vector Core Facility, The University of North Carolina at Chapel Hill, Lot# AV3782)] и ssAAV2-GFP [(AAV2-eGFP), полученный из Центра генной терапии Университета Северной Каролины (Gene Therapy Center Virus Vector Core Facility, The University of North Carolina at Chapel Hill: Lot# AV3725)].

Методика.

Векторы AAV доставлялись путем субретинальной инъекции в оба глаза тестовых мышей. Все описанные процедуры проводили в асептических условиях с использованием стерильных реагентов, шприцев и соответствующих средств индивидуальной защиты.

1. Мышей иммобилизовали и их зрачки расширяли одной каплей циклопентолата (1%), с последующим закапыванием одной капли 2,5% фенилэфрина.

2. Затем животных интраперитонеально анестезировали Авертином (250 мг/кг). Роговицы местно анестезировали одной каплей 0,5% пропаракаина.

3. Животных помещали под операционный микроскоп и использовали микроскальпель, чтобы сделать назальный разрез 0,5 мм, кзади от лимба.

4. Тупую иглу со шприцем Гамильтона 10 мкл по касательной вставляли через разрез склеры к височной сетчатке. Иглу продвигали до появления ощущения сопротивления.

5. 1 мкл вектора ssAAV2 (или ssAAV2-EPO-eGFP или ssAAV2-GFP, оба содержат флуоресцеин, разведенный 1:50, для визуализации доставки) медленно вводили в субретинальное пространство.

6. Глаз исследовали под операционным микроскопом. Успешную субретинальную инъекцию подтверждали по визуализации флуоресцеина, который содержался в отделах сетчатки.

7. Число инъекций зависело от степени повреждения сетчатки (визуализируемого по размеру кровоизлияний) и повреждению хрусталика.

8. Животное переворачивали на другой бок, и процедуру повторяли.

9. После инъекции на оба глаза наносили мазь с антибиотиком.

Иссечение сетчатки, визуализация и количественное определение на плоских срезах сетчатки.

1. 0,1 мл конкавалина-А (Con-A) вводили (внутривенно, в хвостовую вену) за время от 1 до 5 мин до эвтаназии (CO₂).

2. Проводили энуклеацию глаз и фиксировали их в параформальдегиде (4% в ФБР) в течение 2 ч. Затем их выдерживали при 4°C в ФБР буфере в течение 1-3 дней до вскрытия.

3. Роговицу и хрусталик удаляли и сетчатку препарировали от задней раковины глаза (пигментный эпителий сетчатки/хориоид).

4. В сетчатке делали четыре радиальных разреза и снимали плоские срезы, монтируя препараты в среде Vectashield, при этом слой фоторецепторов располагали лицевой стороной вниз.

5. После приготовления препаратов плоских срезов их располагали на центре сетчатки (с помощью зрительного нерва в качестве эталона) и Con-меченые сосуды сетчатки изучали при 20-кратном увеличении с помощью Zeiss Imaging System (AxioVision).

6. Программное обеспечение AxioVision использовали для измерения диаметра центральных сосудов сетчатки, которые располагались в 200 мкм от головки зрительного нерва.

7. Полученные данные анализировали в программе GraphPad Prism.

Результаты и выводы.

Количественная оценка диаметра сосудов показали, что ssAAV2-EPO в значительной степени (*p<0,001) индуцирует расширение сосудов в центральной сетчатке по сравнению с SSAAV2-GFP и интактными глазами (6 глаз) (фиг. 1). Не было выявлено каких-либо существенных различий по сравнению ssAAV2-GFP с интактной группой. Образцы были проанализированы с помощью однофакторного ANOVA с post-тестом Данетта (C) репрезентативных препаратов срезов для каждой группы.

Продолжительная доставка ЭПО посредством AAV2-EPO-eGFP привела к статистически значимому увеличению калибра венозных сосудов (фиг. 1), что является ключевой пробой на диабетический макулярный отек у людей. Соответственно, в одном из аспектов изобретение относится к способу уменьшения калибра венозных сосудов в глазах путем введения индивиду описанного в изобретении анти-ЭПО антитела в терапевтически эффективном количестве.

Пример 5b. Эффективность *in vivo* анти-ЭПО антител.

Активность *in vivo* и терапевтическую эффективность анти-ЭПО антител, описанных в изобретении, можно оценивать в мышинной модели глазного отека, описанной выше.

Опыты *in vivo* на мышинной модели.

Мышам C57B6 в возрасте 8 недель вводили субретинально одно из следующих соединений.

Группы:

группа 1: AAV2-eGFP @ титр 2×10⁹ DRP @ титр, 1 мкл/глаз, n=20 глаз у мышей,

группа 2: AAV2-EPO-eGFP @ титр 2×10⁹ DRP, 1 мкл/глаз, n=20 глаз у 10 мышей,

группа 3: AAV2-EPO-eGFP @ титр 2×10⁹, 1 мкл/глаз, + анти-Еро Fab, 100 мкг/глаз, 1 раз в неделю, n=20 глаз у 10 мышей.

Эффективность вводимых анти-ЭПО антител рассматривается соответствующим образом на модели мыши путем измерения диаметра сосудов через 2 недели после инъекции.

AAV-GFP (AAV2-eGFP) и AAV2-EPO-eGFP (AAV2-CMV-mEpo-IRES-eGFP) получали из Центра генной терапии Университета Северной Каролины (Gene Therapy Center Virus Vector Core Facility, The University of North Carolina at Chapel Hill).

Внутриглазные инъекции анти-ЭПО антител ингибируют расширение сосудов сетчатки. Анти-ЭПО антитела смягчают действие ЭПО, представляющее собой уменьшение потока крови и гипоксию сетчатки. Таким образом, предполагается, что анти-ЭПО антитела будут уменьшать патологию сетчатки, что также проявляется у пациентов с сосудистыми заболеваниями сетчатки, такими как влажная ВМД и диабетическая ретинопатия.

Пример 6. Нейтрализация свободного ЭПО *in vivo*.

Пример 6a. Нейтрализации свободного ЭПО *in vivo* с помощью анти-ЭПО Fab.

Активность *in vivo* и терапевтическую эффективность анти-ЭПО антител оценивали в глазах кролика следующим образом. Кроликам интравитреально вводили анти-ЭПО Fab, NVS2 (1 мг/глаз) и делали провокацию путем интравитреального введения дозы ЭПО (3 мкг/глаз) через четыре дня. Животных умерщвляли и извлекали глазные ткани, в том числе стекловидное тело. Содержание свободного ЭПО и общего ЭПО в стекловидном теле определяли, как описано ниже.

Группа	[Анти-ЭПО Fab] мг/глаз	ЭПО мкг/глаз
1	1	-
2	1	3

Содержание общего/свободного ЭПО.

Анализы проводили с использованием стандартных планшетов связывания MSD (Meso Scale Discovery, 384-луночные: MSD Cat. # L21XA), используя буферное покрытие (ФБР) и инкубационный буфер (ФБР с 2% БСА (Sigma Cat# A4503) и 0,1% Твин 20 и 0,1% Тритон-X).

Захваченные антитела покрывали ФБР, 1 мкг/мл (25 мкл) и инкубировали в течение ночи при 4°C. Планшеты промывали 3 раза в промывочном буфере (ФБР с 0,05% Твин 20) и блокировали 25 мкл инкубационного буфера при комнатной температуре в течение 2 ч. Планшеты промывали 3 раза в промывочном буфере. Разведенные стекловидные тела в инкубационном буфере добавляли в планшет (25 мкл) и инкубировали в течение 60 мин при комнатной температуре. Рекомбинантный Дарбопозтин человека был использован в качестве стандарта (A000123, начиная с 2 мкг/мл). Планшеты промывали 3 раза в промывочном буфере. Добавляли 25 мкл первичного антитела (мкг/мл в инкубационном буфере) и инкубировали при комнатной температуре в течение 60 мин.

Планшеты промывали 3 раза в промывочном буфере. Затем добавляли 25 мкл антивидовых вторичных сульф-ТАГ антител (1:1000 в инкубационном буфере), и инкубировали при комнатной температуре в течение 60 мин. Планшеты промывали 3 раза в промывочном буфере и добавляли 25 мкл 1×MSD буфера T Read (с поверхностно-активным веществом, MSD Cat# R92TC-1). Планшеты считывали на ридере MSD Spector Imager 6000.

Общее содержание ЭПО	Покрытое антитело	ЭПО26, клон 26G9C10
	Первичное антитело	Анти-ЭПО Fab
	Вторичное антитело	Анти-человеческое R32AJ-1
	Разведенное стекловидное тело	1:20-1:25
	Чувствительность	0,03 нг/мл
Свободный ЭПО	Покрытое антитело	Анти-ЭПО Fab
	Первичное антитело	ЭПО26, клон 26G9C10
	Вторичное антитело	Анти-мышинное R32AC-1
	Разведенное стекловидное тело	1:75-1:500
	Чувствительность	1,6 нг/мл

Результаты и выводы.

Как и ожидалось, суммарные уровни ЭПО, измеренные в стекловидном теле животных, которым вводили анти-ЭПО или носитель, были сходными (фиг. 2). В отличие от этого не было выявлено свободного ЭПО в стекловидном теле кроликов, которым вводили анти-ЭПО Fab, но в среднем обнаружено приблизительно 100 нг/мл свободного ЭПО в стекловидном теле кроликов, которым вводили носитель. Как и предполагалось, при введении в стекловидное тело анти-ЭПО Fab полностью нейтрализуется содержание свободного ЭПО.

Пример 6b. Нейтрализация свободного ЭПО *in vivo* с использованием анти-ЭПО Fab.

Активность *in vivo* и терапевтическую эффективность анти-ЭПО антител оценивали на глазах кролика следующим образом.

Кроликам вводили в стекловидное тело предварительно смешанный раствор анти-ЭПО Fab, NVS2 (1 мг/глаз) и ЭПО (3 мкг/глаз). Животных умерщвляли и извлекали глазные ткани, в том числе стекловидное тело было. Количество свободного ЭПО и общего ЭПО в стекловидном теле определяли, как описано ниже. Примечание: в некоторые глаза вводили предварительно смешанный раствор анти-ЭПО Fab, ЭПО и VEGF.

Группа	[Анти-ЭПО Fab] мг/глаз	ЭПО мкг/глаз	VEGF нг/глаз
1	-	-	200
2	-	3	200
3	1	3	200
4	1	3	-

Всего/уровней свободного ЭПО.

Анализы проводили с использованием стандартных планшетов связывания MSD (Meso Scale Discovery, 384-луночные: MSD Cat. # L21XA), используя буферное покрытие (ФБР) и инкубационный буфер (ФБР с 2% БСА (Sigma Cat# A4503) и 0,1% Твин 20 и 0,1% Тритон-Х).

Захваченные антитела покрывали ФБР, 1 мкг/мл (25 мкл) и инкубировали в течение ночи при 4°C. Планшеты промывали 3 раза в промывочном буфере (ФБР с 0,05% Твин 20) и блокировали 25 мкл инкубационного буфера при комнатной температуре в течение 2 ч. Планшеты промывали 3 раза в промывочном буфере. Разведенные в инкубационном буфере стекловидные тела добавляли в планшет (25 мкл) и инкубировали в течение 60 мин при комнатной температуре. Рекомбинантный Дарбопозтин человека был использован в качестве стандарта (A000123, начиная с 2 мкг/мл). Планшеты промывали 3 раза в промывочном буфере. Добавляли 25 мкл первичного антитела (мкг/мл в инкубационном буфере) и инкубировали при комнатной температуре в течение 60 мин. Планшеты промывали 3 раза в промывочном буфере. Затем добавляли 25 мкл антивидовых вторичных сульфо-ТАГ антител (1:1000 в инкубационном буфере) и инкубировали при комнатной температуре в течение 60 мин. Планшеты промывали 3 раза в промывочном буфере и добавляли 25 мкл 1×MSD буфера T Read (с поверхностно-активным веществом, MSD Cat# R92TC-1). Планшеты считывали на ридере MSD Spector Imager 6000.

Общее содержание ЭПО	Покрытое антителом	ЭПО26, клон 26G9C10
	Первичное антителом	Анти-ЭПО Fab
	Вторичное антителом	анти-человеческое R32AJ-1
	Разведенное стекловидное тело	1:20-1:25
	Чувствительность	0,03 нг/мл
Свободный ЭПО	Покрытое антителом	Анти-ЭПО Fab
	Первичное антителом	ЭПО26, клон 26G9C10
	Вторичное антителом	анти-мышинное R32AC-1
	Разведенное стекловидное тело	1:75-1:500
	Чувствительность	1,6 нг/мл

Результаты и выводы.

Как и ожидалось, суммарные уровни ЭПО, измеренные в стекловидном теле животных, которым вводили анти-ЭПО или носитель, были сходными (фиг. 3). В отличие от этого, не было выявлено свободного ЭПО в стекловидном теле кроликов, которым вводили анти-ЭПО Fab, но в среднем обнаружено приблизительно 200 нг/мл свободного ЭПО в стекловидном теле кроликов, которым вводили носитель (фиг. 3). Наличие VEGF, по-видимому, не оказывает никакого эффекта на измеряемый уровень содержания свободного или общего ЭПО. Как и предполагалось, при введении в стекловидное тело анти-ЭПО Fab полностью нейтрализуется содержание свободного ЭПО.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с эритропозтином (ЭПО) и содержат HCDR1, HCDR2 и HCDR3 варибельного участка тяжелой цепи, имеющие SEQ ID NO: 1, 2 и 3 соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 варибельного участка легкой цепи,

имеющие SEQ ID NO: 4, 5 и 6 соответственно.

2. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с ЭПО и содержат HCDR1, HCDR2 и HCDR3 варибельного участка тяжелой цепи, имеющие SEQ ID NO: 21, 22 и 23 соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 варибельного участка легкой цепи, имеющие SEQ ID NO: 24, 25 и 26 соответственно.

3. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с ЭПО и содержат HCDR1, HCDR2 и HCDR3 варибельного участка тяжелой цепи, имеющие SEQ ID NO: 41, 42 и 43 соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 варибельного участка легкой цепи, имеющие SEQ ID NO: 44, 45 и 46 соответственно.

4. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с ЭПО и содержат HCDR1, HCDR2 и HCDR3 варибельного участка тяжелой цепи, имеющие SEQ ID NO: 61, 62 и 63 соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 варибельного участка легкой цепи, имеющие SEQ ID NO: 64, 65 и 66 соответственно.

5. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.2, где варибельный участок тяжелой цепи и варибельный участок легкой цепи имеют аминокислотные последовательности, которые по меньшей мере на 90% идентичны SEQ ID NO: 33 и 34 соответственно.

6. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.5, где варибельный участок тяжелой цепи и варибельный участок легкой цепи имеют аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 33 и 34 соответственно.

7. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.5, где антитело содержит тяжелую и легкую цепи с аминокислотными последовательностями, которые по меньшей мере на 90% идентичны SEQ ID NO: 35 и 36 соответственно.

8. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.7, где антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 35 и 36 соответственно.

9. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, содержащие варибельные участки тяжелой и легкой цепей, имеющие аминокислотные последовательности, которые по меньшей мере на 90% идентичны SEQ ID NO: 13 и 14 соответственно.

10. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.3, содержащие варибельные участки тяжелой и легкой цепей, имеющие аминокислотные последовательности, которые по меньшей мере на 90% идентичны SEQ ID NO: 53 и 54 соответственно.

11. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.4, содержащие варибельные участки тяжелой и легкой цепей с аминокислотными последовательностями, которые по меньшей мере на 90% идентичны SEQ ID NO: 73 и 74 соответственно.

12. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где антитело содержит тяжелую и легкую цепи с аминокислотными последовательностями, которые по меньшей мере на 90% идентичны SEQ ID NO: 15 и 16 соответственно.

13. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, причем антитело содержит тяжелую и легкую цепи с аминокислотными последовательностями, которые по меньшей мере на 90% идентичны SEQ ID NO: 35 и 36 соответственно.

14. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, причем антитело содержит тяжелую и легкую цепи с аминокислотными последовательностями, которые по меньшей мере на 90% идентичны SEQ ID NO: 55 и 56 соответственно.

15. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, причем антитело содержит тяжелую и легкую цепи с аминокислотными последовательностями, которые по меньшей мере на 90% идентичны SEQ ID NO: 75 и 76 соответственно.

16. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-4, которые представляют собой антитело человека, химерное антитело, моноклональное антитело, одноцепочечное антитело, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv или ScFv.

17. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1, относящиеся к изотипу IgG.

18. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, которая кодирует антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1.

19. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, которая кодирует антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.2.

20. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, которая кодирует антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.3.

21. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, которая кодирует антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.4.

22. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп.18-21, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую варибельный домен тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 17, 37, 57 и 77.

23. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп.18-21, содержащая нуклеотидную последова-

тельность, кодирующую вариабельный домен легкой цепи, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 18, 38, 58 и 78.

24. Вектор экспрессии, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп.18-23.

25. Выделенная клетка-хозяин для экспрессии антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-17, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп.18-23 или вектор по п.24.

26. Композиция для лечения сосудистых заболеваний сетчатки, содержащая антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-4 и фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель.

27. Композиция для лечения макулярного отека, содержащая антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-4 и фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель.

28. Композиция для лечения диабетической ретинопатии, содержащая антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-4 и фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель.

29. Композиция для лечения диабетического макулярного отека, содержащая антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-4 и фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель.

30. Композиция для лечения пролиферативной диабетической ретинопатии, содержащая антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-4 и фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель.

31. Композиция для ингибирования ЭПО-зависимой клеточной пролиферации, содержащая антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-4 и фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель.

32. Композиция для ингибирования связывания ЭПО с ЭПО-рецептором, содержащая антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-4 и фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель.

33. Композиция по любому из пп.26-32 в форме для интравитреального введения.

34. Композиция по п.26, где сосудистое заболевание сетчатки связано с заболеванием или состоянием, выбранным из диабетической ретинопатии, диабетического макулярного отека, пролиферативной диабетической ретинопатии, непролиферативной диабетической ретинопатии, возрастной макулярной дегенерации, окклюзии вен сетчатки, мультифокального хориоидита, миопической хориоидальной неоваскуляризации и ретинопатии недоношенных.

35. Способ лечения сосудистого заболевания сетчатки у индивида, включающий введение указанному индивиду терапевтически эффективного количества композиции, содержащей антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с ЭПО и содержат:

а) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельного участка тяжелой цепи, имеющие SEQ ID NO: 1, 2 и 3 соответственно, и

LCDR1, LCDR2 и LCDR3 вариабельного участка легкой цепи, имеющие SEQ ID NO: 4, 5 и 6 соответственно; или

б) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельного участка тяжелой цепи, имеющие SEQ ID NO: 21, 22 и 23 соответственно, и

LCDR1, LCDR2 и LCDR3 вариабельного участка легкой цепи, имеющие SEQ ID NO: 24, 25 и 26 соответственно; или

в) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельного участка тяжелой цепи, имеющие SEQ ID NO: 41, 42 и 43 соответственно, и

LCDR1, LCDR2 и LCDR3 вариабельного участка легкой цепи, имеющие SEQ ID NO: 44, 45 и 46 соответственно; или

г) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельного участка тяжелой цепи, имеющие SEQ ID NO: 61, 62 и 63 соответственно, и

LCDR1, LCDR2 и LCDR3 вариабельного участка легкой цепи, имеющие SEQ ID NO: 64, 65 и 66 соответственно.

36. Способ по п.35, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельные области тяжелой и легкой цепи, имеющие аминокислотные последовательности, которые по меньшей мере на 90% идентичны SEQ ID NO: 13 и 14; SEQ ID NO: 33 и 34; SEQ ID NO: 53 и 54 или SEQ ID NO: 73 и 74 соответственно.

37. Способ по п.35, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат тяжелую и легкую цепи с аминокислотными последовательностями, которые по меньшей мере на 90% идентичны SEQ ID NO: 15 и 16; SEQ ID NO: 35 и 36; SEQ ID NO: 55 и 56 или SEQ ID NO: 75 и 76 соответственно.

38. Способ по п.35, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой антитело человека, химерное антитело, моноклональное антитело, одноцепочечное антитело, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv или ScFv.

39. Способ по п.35, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент относятся к изотипу IgG.

40. Способ по п.35, где сосудистое заболевание сетчатки связано с заболеванием или состоянием, выбранным из диабетической ретинопатии, диабетического макулярного отека, пролиферативной диабетической ретинопатии, непролиферативной диабетической ретинопатии, возрастной макулярной дегене-

рации, окклюзии вен сетчатки, мультифокального хориоидита, миопической хориоидальной неоваскуляризации и ретинопатии недоношенных.

41. Способ по п.40, где сосудистое заболевание сетчатки представляет собой диабетическую ретинопатию.

42. Способ по п.40, где сосудистое заболевание сетчатки представляет собой макулярный отек.

43. Способ по п.40, где сосудистое заболевание сетчатки представляет собой диабетический макулярный отек.

44. Способ по п.40, где сосудистое заболевание сетчатки представляет собой пролиферативную диабетическую ретинопатию.

45. Способ по п.35, где способ дополнительно включает применение анти-VEGF терапии.

46. Способ по п.35, где анти-VEGF терапия представляет собой введение антитела против VEGF или VEGF-рецептора.

47. Способ по п.35, дополнительно включающий введение второй композиции, содержащей средство, выбранное из ранибизумаба, бевицизумаба, пегалтаниба, афлиберцепта, пазопаниба, сорафиниба, сунитиниба и рапамицина.

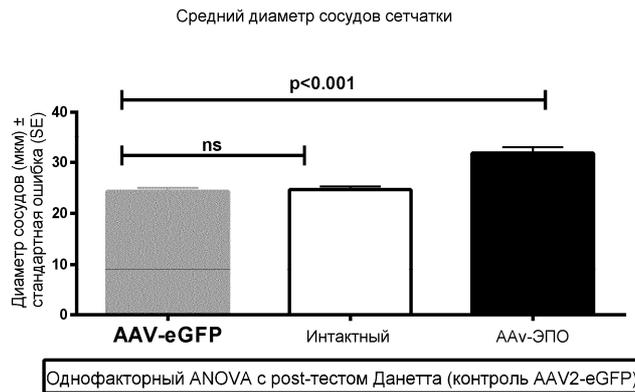
48. Способ по п.47, где вторая композиция содержит ранибизумаб.

49. Способ по п.43, где способ дополнительно включает применение анти-VEGF терапии.

50. Способ по п.49, где терапия, направленная на VEGF, представляет собой введение антитела против VEGF или VEGF-рецептора.

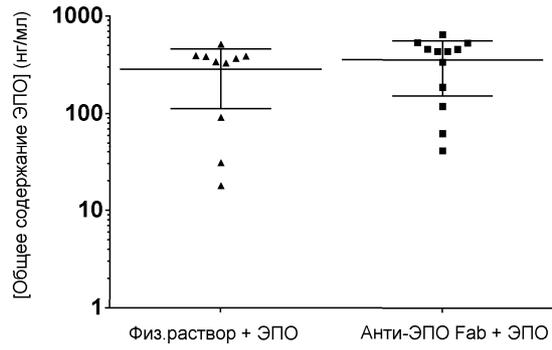
51. Способ по п.43, дополнительно включающий введение второй композиции, содержащей средство, выбранное из ранибизумаба, бевицизумаба, пегалтаниба, афлиберцепта, пазопаниба, сорафиниба, сунитиниба и рапамицина.

52. Способ по п.51, где вторая композиция содержит ранибизумаб.

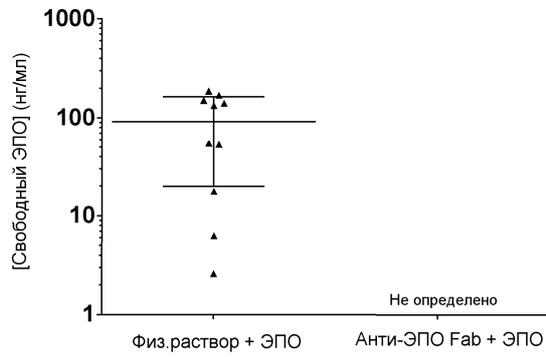


Фиг. 1

Общие уровни ЭПО

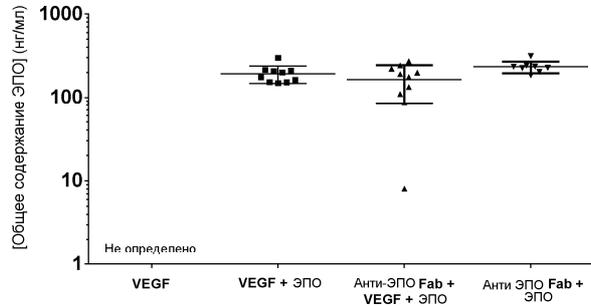


Уровни свободного ЭПО

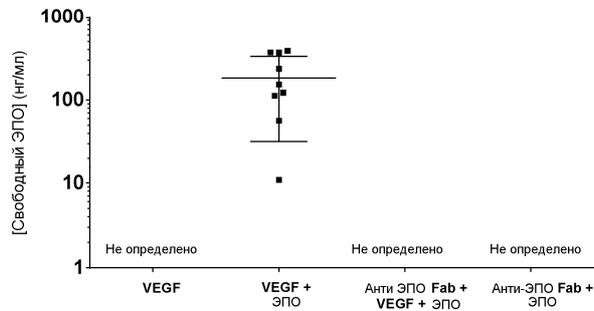


Фиг. 2

Общие уровни ЭПО



Уровни свободного ЭПО



Фиг. 3

