

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **037797**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.05.21

(21) Номер заявки
201490850

(22) Дата подачи заявки
2012.10.25

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

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

(31) **61/551,406**

(32) **2011.10.25**

(33) **US**

(43) **2015.03.31**

(86) **PCT/US2012/061950**

(87) **WO 2013/063284 2013.05.02**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ПРОТЕНА БАЙОСАЙЕНСИЗ
ЛИМИТЕД (IE)**

(72) Изобретатель:
**Гаридель Патрик (DE), Хендерсон
Исаак Крейг, Клейн Памела (US)**

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

(56) US-A1-20090202432
US-A1-20110070225
US-A1-20110038790
US-A1-20090252724

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

037797

B1

037797
B1

Родственные заявки

Приоритет испрашивается по предварительной заявке США № 61/551406, поданной 25 октября 2011 г., которая в полном объеме включена в настоящий документ путем ссылки.

Область техники

Изобретение относится к области иммунологии и медицины.

Предпосылки создания изобретения

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

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

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

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

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

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

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

Краткое изложение сущности изобретения

Настоящее изобретение относится к составам антител, пригодным для профилактики и лечения амилоидных заболеваний. В одном аспекте изобретения фармацевтический состав содержит (а) химерную или гуманизированную версию антитела 2A4 (АТСС РТА-9662) или антитела 7D8 (АТСС РТА-

9468) или ее фрагмент, которые специфично конкурируют с 2A4 или 7D8 за связывание с антигеном и/или мишенью которых является эпитоп, содержащий AEDS (SEQ ID NO: 18), причем антитело присутствует в концентрации в диапазоне от примерно 1 до примерно 100 мг/мл; (b) гистидиновый буфер, присутствующий в концентрации в диапазоне от примерно 20 до примерно 30 мМ; (c) трегалозу, присутствующую в концентрации в диапазоне от примерно 210 до примерно 250 мМ; и (d) полисорбат 20, присутствующий в концентрации в диапазоне от примерно 0,005 до примерно 0,05 мас.%; причем композиция характеризуется рН в диапазоне от примерно 6 до примерно 7. Например, типичные составы по изобретению содержат антитело, имеющее вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4, и/или вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5. Более конкретно такая композиция может содержать антитело, имеющее легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в любой одной из SEQ ID NO: 14-16, например антитело, имеющее легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 15.

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

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

В других типичных составах по настоящему изобретению гистидиновый буфер присутствует в концентрации примерно 25 мМ. Гистидиновый буфер может содержать L-гистидин и L-гистидин-HCl моногидрат. Например, L-гистидин может использоваться в концентрации в диапазоне от примерно 16 до примерно 22 мМ, а L-гистидин-HCl моногидрат может использоваться в концентрации в диапазоне от примерно 4 до примерно 8 мМ.

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

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

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

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

В другом аспекте настоящего изобретения составы антител являются лиофилизированными. Например, типичный лиофилизированный состав может содержать (a) гуманизованную версию антитела 2A4 (АТСС РТА-9662) или антитела 7D8 (АТСС РТА-9468) или ее антигенсвязывающий фрагмент; (b) гистидин; (c) трегалозу и (d) полисорбат 20. Лيوфилизированные составы могут иметь рН от примерно 6 до примерно 7 при восстановлении, например рН 6,5 при восстановлении. Лيوфилизированные составы, как правило, содержат от примерно 100 до примерно 1000 мг антитела. Лيوфилизированные составы, как правило, содержат полисорбат 20 в концентрации в диапазоне от примерно 0,005 до примерно 0,05 мас.%. После восстановления лиофилизированные составы дают водный раствор, например водный раствор, содержащий (a) антитело, содержащее легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в любой одной из SEQ ID NO: 14-16, и которое присутствует в концентрации при-

мерно 10 мг/мл; (b) гистидиновый буфер, присутствующий в концентрации примерно 25 мМ; (c) трегалозу, присутствующую в концентрации примерно 230 мМ; (d) полисорбат 20, присутствующий в концентрации примерно 0,2 г/л, и (e) имеющий pH примерно 6,5. Типичный лиофилизированный состав содержит примерно 100 мг антитела после восстановления стерильной водой.

Также изобретение относится к нуклеиновым кислотам, кодирующим антитела, используемые для получения описанных составов. Например, такие нуклеиновые кислоты включают нуклеиновые кислоты, содержащие нуклеотидные последовательности, кодирующие легкую цепь антитела SEQ ID NO: 13, и нуклеиновые кислоты, содержащие нуклеотидные последовательности, кодирующие тяжелую цепь антитела любой одной из SEQ ID NO: 14-16. Например, нуклеотидные последовательности, приведенные в SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 20 (которая идентична последовательности SEQ ID NO: 19 и дополнительно включает последовательность, кодирующую сигнальный пептид), каждая, кодируют легкую цепь SEQ ID NO: 13 гуманизированного 2A4. В качестве другого примера нуклеотидные последовательности, приведенные в SEQ ID NO: 22 и SEQ ID NO: 23 (которая идентична SEQ ID NO: 22 и дополнительно включает последовательность, кодирующую сигнальный пептид), каждая, кодируют тяжелую цепь SEQ ID NO: 15 гуманизированного 2A4.

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

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

Настоящее изобретение также относится к способам получения фармацевтических составов. В одном аспекте настоящего изобретения такой способ включает (a) культивирование клеток млекопитающих, имеющих стабильно встроенные в геном нуклеиновые кислоты, кодирующие легкие и тяжелые цепи мышинового, химерного или гуманизированного антитела 2A4 или мышинового, химерного или гуманизированного антитела 7D8, таким образом, что клетки секретируют антитела в клеточную культуральную среду, и очистку антител из клеточной культуральной среды; (b) и получение состава, содержащего (i) химерную или гуманизированную версию антитела 2A4 (ATCC PTA-9662) или антитела 7D8 (ATCC PTA-9468) или ее фрагмент, которые специфично конкурируют с 2A4 или 7D8 за связывание с антигеном, причем антитело присутствует в концентрации в диапазоне от примерно 1 до примерно 100 мг/мл; (ii) гистидиновый буфер, присутствующий в концентрации в диапазоне от примерно 20 до примерно 30 мМ; (iii) трегалозу, присутствующую в концентрации в диапазоне от примерно 210 до примерно 250 мМ; и (iv) полисорбат 20, присутствующий в концентрации в диапазоне от примерно 0,005 до примерно 0,05 мас.%; причем композиция характеризуется pH в диапазоне от примерно 6 до примерно 7. Например, в одном аспекте настоящего изобретения культивируют клетки млекопитающих, имеющие стабильно встроенные в свой геном нуклеиновые кислоты, кодирующие легкую и тяжелую цепи гуманизированного антитела 2A4. Клетки млекопитающих, пригодные для этой цели, включают (a) клетки-хозяева, имеющие стабильно встроенную в свой геном последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую легкую цепь гуманизированного 2A4, приведенную в SEQ ID NO: 13 или 21, и тяжелую цепь гуманизированного 2A4, приведенную в SEQ ID NO: 15 или 24; (b) клетки-хозяева, имеющие стабильно встроенную в свой геном нуклеиновую кислоту, имеющую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 19, и нуклеиновую кислоту, имеющую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 22; и (c) клетки-хозяева,

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

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

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

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

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

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

Краткое описание чертежей

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

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

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

На фиг. 4A-4B показаны нуклеотидные последовательности, кодирующие последовательности тя-

желой цепи (фиг. 4a) и легкой цепи (фиг. 4b) версии 3 гуманизованного антитела 2A4. Лидерная последовательность подчеркнута одной чертой, переменная область не подчеркнута, константная область подчеркнута двойной чертой.

Подробное описание изобретения

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

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

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

I. Фармацевтические составы и продукты.

IA. Характеристики.

Настоящее изобретение относится к фармацевтическим составам, содержащим химерную или гуманизованную версию антитела 2A4 (АТСС РТА-9662) или антитела 7D8 (АТСС РТА-9468) или ее фрагмент, которые специфично конкурируют соответственно с 2A4 или 7D8 за связывание с антигеном (то есть белком AA или AL человека) и/или мишенью которых является эпитоп AEDS (SEQ ID NO: 18). Также изобретение относится к фармацевтическим составам, содержащим мышинное антитело 2A4 или мышинное антитело 7D8 или их фрагменты. Антитело присутствует в концентрации в диапазоне от примерно 1 до примерно 100 мг/мл. Состав характеризуется рН в диапазоне от примерно 6 до примерно 7 и содержит гистидиновый буфер в концентрации в диапазоне от примерно 20 до примерно 30 мМ, трегалозу в концентрации в диапазоне от примерно 210 до примерно 250 мМ и полисорбат 20 в концентрации в диапазоне от примерно 0,005 до примерно 0,05 мас. %.

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

Фраза "по существу, из иммуноглобулина или антитела человека" или "по существу, принадлежат человеку" означает, что при выравнивании с аминокислотной последовательностью иммуноглобулина или антитела человека (с целью сравнения) область имеет по меньшей мере 80-90%, предпочтительно 90-95%, более предпочтительно 95-99% идентичности (т.е. идентичности в отдельном участке последовательности) с последовательностью каркасной или константной области иммуноглобулина человека, позволяя, например, консервативные замены, замены консенсусной последовательности, замены зародышевой линии, обратные мутации и т.п. Введение консервативных замен, замен консенсусной последовательности, замен зародышевой линии, обратных мутаций и т.п. часто называется "оптимизацией" гуманизованного антитела или цепи. Фраза "по существу, из иммуноглобулина или антитела другого био-

логического вида (кроме человека)" или "по существу, не принадлежит человеку" означает последовательность иммуноглобулина или антитела по меньшей мере на 80-95%, предпочтительно на 90-95%, более предпочтительно на 96, 97, 98 или 99% идентичную последовательности из другого биологического вида (кроме человека), например млекопитающего, кроме человека.

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

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

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

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

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

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

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

В некоторых составах антитело присутствует в концентрации в диапазоне от примерно 5 до примерно 100 мг/мл. В некоторых составах антитело присутствует в концентрации в диапазоне от примерно 5 до примерно 15 мг/мл. В некоторых составах антитело присутствует в концентрации в диапазоне от примерно 25 до примерно 75 мг/мл. Например, антитело может присутствовать в концентрации, составляющей примерно 10 мг/мл, или в концентрации, составляющей примерно 50 мг/мл. Антитело может присутствовать в стерильной жидкой лекарственной форме в количестве, составляющем от примерно 50 до примерно 500 мг/флакон, или большем количестве. Например, антитело может присутствовать в стерильной жидкой лекарственной форме в количестве примерно 100 мг/флакон.

Антитела, используемые в раскрытых составах, могут быть соединены с терапевтической молекулой, например цитотоксическим агентом, радиотерапевтическим агентом, иммуномодулятором, вторым

антителом (например, с образованием гетероконъюгантного антитела) или любым другим биологически активным агентом, который способствует или усиливает активность химерного или гуманизированного антитела 2A4 или 7D8. Типичные терапевтические молекулы включают терапевтические средства, пригодные для лечения, контроля или облегчения амилоидного заболевания или симптомов амилоидного заболевания.

Антитела, используемые в раскрытых составах, также могут быть соединены с детектируемой меткой, например, пригодной для диагностики амилоидного заболевания для мониторинга развития амилоидного заболевания и/или для оценки эффективности лечения. Антитела, введенные в фармацевтические составы, описанные в документе, особенно подходят для выполнения таких действий у субъектов, имеющих или подверженных АА-амилоидозу или AL-амилоидозу, или на соответствующих биологических образцах, полученных от таких субъектов. Типичные детектируемые метки, которые могут быть соединены или связаны с гуманизированным антителом 2A4 или гуманизированным антителом 7D8, включают различные ферменты, такие как пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза, бета-галактозидаза или ацетилхолинэстераза, простетические группы, такие как стрептавидин/биотин и авидин/биотин; флуоресцентные вещества, такие как умбеллиферон, флуоресцеин, флуоресцеина изотиоцианат, родамин, дихлортриазиниламинфлуоресцеин, дансилхлорид или фикоэритрин, люминесцентные вещества, такие как люминол; биолюминесцентные вещества, такие как люцифераза, люциферин и экворин; радиоактивные вещества, такие как, но не ограничиваясь ими, иод (^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , ^{121}I), углерод (^{14}C), сера (^{35}S), тритий (^3H), индий (^{115}In , ^{113}In , ^{112}In , ^{111}In), технеций (^{99}Tc), таллий (^{201}Tl), галлий (^{68}Ga , ^{67}Ga), палладий (^{103}Pd), молибден (^{99}Mo), ксенон (^{133}Xe), фтор (^{18}F), ^{153}Sm , ^{177}Lu , ^{159}Gd , ^{149}Pm , ^{140}La , ^{175}Yb , ^{166}Ho , ^{90}Y , ^{47}Sc , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{142}Pr , ^{105}Rh , ^{97}Ru , ^{68}Ge , ^{57}Co , ^{65}Zn , ^{85}Sr , ^{32}P , ^{153}Gd , ^{169}Yb , ^{51}Cr , ^{54}Mn , ^{75}Se и олово (^{113}Sn , ^{117}Sn), позитронно-излучающие металлы с использованием различных методов позитронно-эмиссионной томографии, ионы нерадиоактивных парамагнитных металлов и молекулы, которые являются радиоактивно мечеными или конъюгированы с определенными радиоизотопами.

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

Антитела, используемые в раскрытых составах, также включают модифицированные формы мышинных, химерных или гуманизированных антител 2A4 или мышинных, химерных или гуманизированных антител 7D8, которые имеют увеличенное время полужизни *in vivo* относительно соответствующих немодифицированных антител. Такие модифицированные формы могут быть получены, например, путем гликозилирования, ацетилирования, пэгилирования, фосфорилирования, амидирования, получения производных с известными защитными/блокирующими группами, протеолитического расщепления, соединения с клеточным лигандом или другим белком и т.д. В качестве одного примера типичные способы увеличения времени полужизни антител описаны в международной публикации РСТ № WO 02/060919.

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

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

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

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

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

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

Некоторые составы характеризуются осмоляльностью примерно 300 мОсм/кг.

Также в некоторые составы может быть включен наполнитель.

Как правило, составы являются стерильными, что, например, достигается путем стерильной фильтрации с использованием фильтра с размером пор 0,2 или 0,22 мкм. Составы по изобретению также в общем стабильны при замораживании и оттаивании.

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

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

IV. Получение фармацевтических составов.

Настоящее изобретение также относится к способам получения фармацевтических составов. В одном аспекте настоящего изобретения такой способ включает (а) культивирование клетки млекопитающего, имеющей стабильно встроенные в свой геном нуклеиновые кислоты, кодирующие легкую и тяжелую цепи мышинового антитела 2A4 (АТСС РТА-9662) или антитела 7D8 (АТСС РТА-9468), или их химерные или гуманизированные версии, так что клетки секретируют антитела в клеточную культуральную среду, и очистку антител из клеточной культуральной среды; (b) и получение состава, включающего (i) очищенное антитело, присутствующее в концентрации в диапазоне от примерно 1 до примерно 100 мг/мл; (ii) гистидиновый буфер, присутствующий в концентрации в диапазоне от примерно 20 до примерно 30 мМ; (iii) трегалозу, присутствующую в концентрации в диапазоне от примерно 210 до примерно 250 мМ; и (iv) полисорбат 20, присутствующий в концентрации в диапазоне от примерно 0,005 до примерно 0,05 мас.%; причем композиция характеризуется рН в диапазоне от примерно 6 до примерно 7.

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

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

свой геном нуклеиновую кислоту, имеющую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 20, и нуклеиновую кислоту, имеющую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 23.

Для получения антител раскрытые нуклеиновые кислоты включены в вектор. В некоторых примерах вектор содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую мышиную антитело 2A4 или 7D8, либо химерную или гуманизированную его версию, функционально связанную с соответствующей регуляторной последовательностью, способной осуществлять экспрессию ДНК в клетке-хозяине. Такие регуляторные последовательности включают промотор для осуществления транскрипции (например, конститутивный промотор или индуцируемый промотор, известные в данной области), необязательную последовательность оператора для регуляции такой транскрипции, последовательность, кодирующую подходящие участки связывания рибосомы на мРНК, энхансеры, сигналы полиаденилирования и последовательности для регуляции терминации транскрипции и трансляции. Вектор может представлять собой плазмиду, фаговую частицу (например, вирусный вектор, такой как векторы на основе аденовируса, аденоассоциированного вируса, ретровируса, вируса герпеса, вируса осповакцины, лентивируса, вируса оспы и цитомегаловируса) или просто геномную вставку. После трансформации в подходящего хозяина кодирующие антитело нуклеиновые кислоты могут встраиваться в геном хозяина или вектор может реплицироваться и функционировать независимо от генома хозяина.

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

Клетки-хозяева, пригодные для получения составов антител по изобретению, включают клетки млекопитающих, в том числе клетки человеческого происхождения, такие как клетки почки обезьяны, клетки почки эмбриона человека, клетки почки детеныша хомячка (ВНК), клетки яичника китайского хомячка (клетки CHO), клетки Сертоли мыши, клетки цервикальной карциномы человека (HeLa), клетки почки собаки, клетки легких человека, клетки печени человека, клетки опухоли молочной железы мыши и клетки NS0. Например, клетка-хозяин может содержать в своем геноме стабильно встроенную нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую любую одну из SEQ ID NO: 13-16, 21 и 24; стабильно встроенную нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность любой одной из SEQ ID NO: 19-20 и 22-23, или их комбинации. Типичные клетки-хозяева по изобретению включают (а) клетки-хозяева, содержащие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей легкую цепь гуманизированного 2A4, приведенную в SEQ ID NO: 13 или 21, и тяжелую цепь гуманизированного 2A4, приведенную в SEQ ID NO: 15 или 24; (b) клетки-хозяева, содержащие нуклеиновую кислоту, имеющую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 19, и нуклеиновую кислоту, имеющую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 22; и (c) клетки-хозяева, содержащие нуклеиновую кислоту, имеющую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 20, и нуклеиновую кислоту, имеющую нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 23.

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

Антитела, используемые для получения раскрытых составов, как правило, являются выделенными или очищенными, т.е., по существу, свободны от клеточного материала или других загрязняющих белков из клеток, в которых их получают, или, по существу, свободны от химических предшественников или других химических веществ при получении химическим синтезом. Например, антитело, которое, по существу, свободно от клеточного материала, включает препараты антител, имеющих менее чем примерно 30, 25, 20, 15, 10, 8, 5, 2, 1, 0,5, 0,1% или менее (по сухой массе) загрязняющего белка. Когда антитело получено рекомбинантным способом, оно также, по существу, свободно от культуральной среды, так что культуральная среда составляет менее чем примерно 30, 25, 20, 15, 10, 8, 5, 2, 1, 0,5, 0,1% или менее от объема белкового препарата. Когда антитело получено путем химического синтеза, оно предпочтительно, по существу, свободно или отделено от химических предшественников или других химических веществ, участвующих в синтезе белка. Соответственно такие препараты антител имеют менее чем примерно 30, 25, 20, 15, 10, 8, 5, 2, 1, 0,5, 0,1% или меньше (по сухой массе) химических предшественников или других соединений, кроме терапевтических антител. Для очистки рекомбинантно экспрессированного антитела можно использовать любой из ряда способов, известных в данной области, таких как, например, аффинная хроматография, обработка кислотой, глубинная фильтрация, анионообменная хромато-

графия, катионообменная хроматография, нанофильтрация, ультрафильтрация, диализ и диафильтрация.

Очищенное терапевтическое антитело может быть получено в виде раствора, содержащего любой из составов, описанных в данном документе, разведено до желаемой концентрации и может храниться до использования. Необязательно состав может храниться в концентрированной форме до использования. Жидкие составы могут храниться в замороженном виде при охлаждении или при комнатной температуре в зависимости от их профиля устойчивости, который может быть определен эмпирически. В некоторых случаях применяется дополнительная стадия фильтрации. Некоторые составы, описанные в настоящем документе, могут быть лиофилизированы и могут храниться в порошковой форме. Лиофилизированные составы могут храниться в замороженном виде при охлаждении или при комнатной температуре в зависимости от их профиля устойчивости, который может быть определен эмпирически. Например, лиофилизированные составы можно хранить при температуре от примерно 2 до 8°C. В таких случаях состав будет восстановлен перед введением пациенту, давая жидкий состав, содержащий антитело и вспомогательные вещества, присутствующие в концентрациях, описанных в настоящем документе. В некоторых случаях состав восстанавливают в стерильной воде. В некоторых случаях состав восстанавливают и добавляют в инфузионный мешок для введения пациенту. До введения пациенту восстановленный состав может храниться при охлаждении или при комнатной температуре в течение времени, соответствующего профилю стабильности. Методики лиофилизации и восстановления известны в данной области и описаны в примерах.

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

II. Способы диагностики и лечения.

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

IIA. Субъекты, подходящие для диагностики и лечения.

Лекарственное вещество гуманизированное антитело 2A4 следует использовать для лечения системного амилоидоза, например амилоидоза с участием либо амилоидной легкой цепи (AL), либо амилоида А (AA). Системные амилоидозы представляют собой комплексную группу заболеваний, вызванных отложением в тканях неправильно свернутых белков, что приводит к прогрессирующему поражению органов. Наиболее распространенный тип, AL-амилоидоз или первичный амилоидоз, включает гематологическое заболевание, вызванное клональными плазматическими клетками, которые продуцируют неправильно свернутые легкие цепи иммуноглобулинов. Перепроизводство неправильно свернутых легких цепей плазматическими клетками приводит к отложению аномального AL-белка (амилоида, в тканях и органах лиц с AL-амилоидозом). Клинические признаки AL-амилоидоза включают совокупность симптомов и органную дисфункцию, которая может включать сердечную, почечную и печеночную дисфункцию, желудочно-кишечные нарушения, невропатии и макроглоссию. Другая форма системного амилоидоза, AA-амилоидоз или вторичный амилоидоз, является "вторичным" результатом другого заболевания, как, например, хронических воспалительных заболеваний (например, ревматоидного артрита и болезни Бехтерева) или хронических инфекций (например, туберкулеза или остеомиелита). При вторичном амилоидозе откладывающимся амилоидным белком является белок амилоид А, образующийся из острофазового белка - сывороточного амилоида А.

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

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

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

Настоящие способы особенно подходят для людей, которые имеют известный риск АА- или АL-амилоидоза, предположительно имеют АА- или АL-амилоидоз или которым поставлен диагноз АА- или АL-амилоидоз. Такие лица включают, но не ограничиваются ими, тех, кто имеет хронические воспалительные заболевания, наследственные воспалительные заболевания и хронические микробные инфекции, такие как ревматоидный артрит, ювенильный хронический артрит, анкилозирующий спондилит, псориаз, псориатическая артропатия, синдром Рейтера, синдром Стилла у взрослых, синдром Бехчета, болезнь Крона, семейная средиземноморская лихорадка, проказа, туберкулез, бронхоэктаз, пролежни, хронический пиелонефрит, остеомиелит, болезнь Уиппла, миелома, макроглобулинемия, дискразия иммуноцитов, моноклональная гаммапатия, оккультная дискразия. Хронические воспалительные и инфекционные заболевания являются предпосылкой к развитию АА-амилоидоза, а АL-амилоидоз, проявляющийся местным узловым амилоидозом, может быть связан с хроническими воспалительными заболеваниями. Лица, которые имеют известный риск АА-амилоидоза, также включают, но не ограничиваются ими, тех, кто имеет злокачественные новообразования, такие как лимфома Ходжкина, рак почек, рак кишки, легких и мочеполовых путей, базальноклеточная карцинома и волосато-клеточная лейкемия. Кроме того, люди с известным риском АА-амилоидоза также включают, но не ограничиваются ими, тех, кто имеет лимфо-пролиферативные заболевания, такие как болезнь Кастельмана. Некоторые из таких пациентов имеют АА-амилоидоз, характеризующийся наличием фибрилл амилоидного белка. Некоторые из таких пациентов имеют АL-амилоидоз, характеризующийся наличием белковых фибрилл амилоидных легких цепей. Некоторые пациенты имеют системную дисфункцию органов, приписываемую АL-амилоидозу, включая нарушение функции сердца, почек, печени, периферической нервной системы, желудочно-кишечного тракта, вегетативной нервной системы, легких и/или мягких тканей или лимфатической системы.

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

IIВ. Схемы лечения.

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

Желаемые результаты методов лечения, раскрытых в данном документе, варьируют в зависимости от амилоидного заболевания и данных пациента и легко определяются специалистом в данной области. В общем, желаемые результаты включают поддающиеся измерению показатели, такие как уменьшение или исчезновение патологических амилоидных фибрилл, снижение или ингибирование агрегации амилоида и/или отложения амилоидных фибрилл и усиление иммунного ответа на патологические и/или агрегированные амилоидные фибриллы. Желаемые результаты также включают ослабление симптомов, специфичных для амилоидного заболевания. Например, желаемые результаты при лечении АL-амилоидоза включают уменьшение частоты появления и тяжести известных симптомов, включая органную дисфункцию, периферическую и автономную нейропатию, карпальный туннельный синдром, макроглоссию, рестриктивную кардиомиопатию, артропатию крупных суставов, иммунные дискразии, миеломы, а также оккультные дискразии. В качестве другого примера желаемые результаты при лечении АА-амилоидоза включают уменьшение ассоциированного воспаления, артрита, псориаза, микробной инфекции, злокачественной опухоли или симптомы другого присутствующего ранее или одновременно заболевания, относительно которого АА-амилоидоз является вторичным.

Ожидаемые результаты раскрытых методов лечения, как правило, являются поддающейся измерению величиной относительно контроля или базовой величины. В контексте настоящего изобретения относительные термины, такие как "улучшить", "увеличить" или "уменьшить", указывают значения относительно контрольного измерения, такого как измерение у того же человека до начала лечения, описанного в данном документе, или измерения у контрольного человека или контрольной группы. Контрольным индивидуумом является физическое лицо, страдающее таким же амилоидным заболеванием, как

индивидуум, который получает лечение, который имеет примерно такой же возраст, как индивидуум, который получает лечение (для гарантии того, что стадии заболевания у индивидуума, получающего лечение, и контрольного индивидуума были сопоставимы), но которое не получало лечение с применением описанных составов антител. В этом случае эффективность раскрытых составов антител оценивают по сдвигу или тенденции в сторону удаления от измеряемых показателей у контроля, не получавшего лечение. В альтернативном варианте контрольным индивидуумом является здоровый человек примерно того же возраста, что и человек, который получает лечение. В этом случае эффективность раскрытых составов антитела оценивают по сдвигу или тенденции в направлении сближения с измеряемыми показателями у здорового контроля. Изменения или улучшения в ответ на терапию, как правило, являются статистически значимыми и описываются р-значением, величину которого, меньшую или равную 0,1, меньшую 0,05, меньшую 0,01, меньшую 0,005 или меньшую 0,001, можно рассматривать как достоверную.

У пациентов как с симптомами, так и без симптомов заболевания лечение в соответствии с описанными способами можно начинать в любое время до или после постановки диагноза основного АА- или AL-амилоидного заболевания. Лечение, как правило, включает введение нескольких доз в течение определенного периода времени. Лечение через определенный период времени можно контролировать, проводя анализ антитела или используя SAP-сцинтиграфию с радиоактивной меткой. При падении ответа у пациента может быть показано использование дополнительной дозы. Реакцию пациентов с AL-амилоидозом на лечение можно контролировать, проводя оценку сердечных маркеров, таких как NT-proBNP и/или тропонин, сывороточного креатина и/или щелочной фосфатазы; выполняя анализы на свободную легкую цепь (SFLC), количественные анализы на иммуноглобулины, биопсию, электрофорез белков крови (SPEP), электрофорез белков мочи (UPEP), анализ сыворотки, электрофорез мочи с иммунофиксацией (IFE); и/или методами визуализации органов. Типичный полный ответ (CR) может быть определен по критериям ответа, включающим отрицательный IFE сыворотки и мочи, нормальное соотношение цепей κ и λ , и/или по содержанию плазматических клеток в костном мозге меньше 5%. Типичный очень хороший частичный ответ (VGPR) может быть определен по dFLC менее 40 мг/л. Типичный частичный ответ (PR) может быть определен по снижению dFLC на 50% или более. В почках ответ на лечение может быть определен, например, по снижению 50% или более (например, >0,5 г/24 часа) в суточном выделении белка с мочой при отсутствии: либо снижения eGFR на 25% или более, либо повышения сывороточного креатина на 0,5 мг/дл или более. В печени ответ на лечение может быть определен, например, по уменьшению на 50% или более исходно повышенной щелочной фосфатазы или по уменьшению печени в диаметре на 2 см или более на КТ или МРТ. В сердце ответ на лечение может быть определен, например, по снижению NT-proBNP на 30% или более и на 300 нг/л или более у пациентов с исходной концентрацией NT-proBNP >650 нг/л.

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

Антитела обычно вводят несколько раз. Типичная схема лечения включает однократное введение каждые две недели, раз в месяц или раз в 3-6 месяцев. Например, пациенты могут получать состав антител циклически по одному введению каждые четыре недели, например каждые 28 дней. Частоту дозирования можно регулировать в зависимости от фармакокинетического профиля состава антитела у пациента. Например, период полувыведения антитела может служить основанием для двухнедельной частоты дозирования. В некоторых способах одновременно вводят два или несколько моноклональных антитела с различной специфичностью связывания, в этом случае доза каждого вводимого антитела находится в пределах указанных диапазонов. Интервалы между разовыми дозами могут быть недельными, месячными или годовыми. Интервалы также могут быть нерегулярными в зависимости от измерения содержания в крови антитела к амилоидному белку (например, АА) у пациента. В некоторых способах дозу доводят до достижения концентрации антитела в плазме, составляющей примерно 1-1000 или примерно 25-300 мкг/мл. В альтернативном варианте антитело можно вводить в виде состава с пролонгированным высвобождением, в этом случае требуется менее частое введение.

Дозировку и частоту введения варьируют в зависимости от периода полувыведения антител у паци-

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

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

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

II. Комбинированные схемы лечения.

Настоящее изобретение также охватывает комбинированные методы лечения или профилактики амилоидного заболевания, в частности AA- и AL-амилоидозов. В зависимости от обстоятельств такие комбинированные методы лечения проводят путем введения состава антитела по изобретению в сочетании с одним или несколькими вторыми терапевтическими агентами, таким как другие методы лечения или профилактики AA- или AL-амилоидозов. Комбинированную терапию по изобретению также можно проводить в сочетании со вторым методом, используемым для лечения или профилактики заболевания или состояния, связанного с амилоидным заболеванием, таким как воспалительное заболевание, хроническая микробная инфекция, новообразования (включая злокачественные новообразования), наследственное воспалительное заболевание и/или лимфопролиферативное заболевание. Множество вариантов лечения доступны в продаже, проходят клинические испытания и доклиническую разработку и любой из них может быть выбран для применения в комбинации с раскрытыми составами антител. Такие варианты лечения могут представлять собой одно или несколько из соединений или методов лечения, выбранных из нескольких основных категорий, но не ограниченных ими, а именно (i) нестероидных противовоспалительных средств (NSAID), например детопрофена, диклофенака, дифлунизала, этодолака, фенопрофена, флурбипрофена, ибупрофена, индометацина, кетопрофена, меклофенамата, мефенамовой кислоты, мелоксикама, набуметона, напроксена натрия, оксaproзина, пироксикама, сулиндака, толметина, целекоксиба, рофекоксиба, аспирина, холинсалицилата, салсалата и салицилата натрия и магния; (ii) стероидов (например, кортизона, дексаметазона, гидрокортизона, метилпреднизолона, преднизолона, преднизона, триамцинолона); (iii) DMARD, т.е. болезнь-модифицирующих противоревматических лекарственных средств (например, циклоспорина, азатиоприна, метотрексата, лефлуномида, циклофосфамида, гидроксихлорохина, сульфасалазина, D-пеницилламина, миноциклина и золота); (iv) рекомбинантных белков (например, ENBREL® (этанерцепта, растворимого рецептора TNF) и REMICADE® (инфликсимаба), химерного моноклонального анти-TNF антитела); (v) трансплантации стволовых клеток и/или (vi) химиотерапии. Пациенты с AL-амилоидозом также могут получать схемы лечения, которые включают лекарственные средства или комбинации лекарственных средств, часто используемые для лечения онкогематологических больных, такие как мелфалан, преднизолон, дексаметазон, леналидомид (REVLIMID®), и ингибиторы протеосомы, такие как бортезомиб (VELCADE®) и карфилзомиб (KYPROLIS™), в дозировках в диапазоне, соответствующих стандартному лечению.

Продолжительность комбинированной терапии зависит от типа амилоидного заболевания, в отно-

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

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

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

Предпочтительно, чтобы раскрытые комбинированные методы лечения вызвали синергетический терапевтический эффект, т.е. эффект больший, чем сумма их отдельных эффектов или терапевтических результатов. Измеримые терапевтические результаты описаны в настоящем документе. Например, синергетический терапевтический эффект может представлять собой эффект по меньшей мере примерно в два раза выше, чем сумма терапевтических эффектов, вызываемых отдельными агентами в данной комбинации, или по меньшей мере примерно в пять раз выше, или по меньшей мере примерно в 10 раз выше, или по меньшей мере примерно в 20 раз выше, или по меньшей мере примерно в 50 раз выше, или по меньшей мере примерно в 100 раз выше. Синергетический терапевтический эффект также можно наблюдать как увеличение терапевтического эффекта по меньшей мере на 10% по сравнению с суммой терапевтических эффектов, вызываемых отдельными агентами в данной комбинации, или по меньшей мере на 20%, или по меньшей мере на 30%, или по меньшей мере на 40%, или по меньшей мере на 50%, или по меньшей мере на 60%, или по меньшей мере на 70%, или по меньшей мере на 80%, или по меньшей мере на 90%, или по меньшей мере на 100%, или как большее увеличение. Синергетическим эффектом также является эффект, который позволяет снизить дозировки терапевтических агентов, когда они применяются в комбинации.

Примеры

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

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

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

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

на модели ксенотрансплантатов в мышах. Последовательности легкой и тяжелой цепей мышинового антитела 2A4 показаны на фиг. 2.

Пример 2. Определение дозы для гуманизированного антитела 2A4.

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

Пример 3. Получение экспрессирующего вектора.

Для создания конечного вектора h2A4 IgG1 HC варибельная область тяжелой цепи была получена с помощью ПЦР с использованием плазмиды CET1019AS-hygro-h2A4VH3-Sce 4.23.07 в качестве матрицы. Для субклонирования в используемых для амплификации праймерах на 5'-конце фрагмента был введен сайт рестрикции MfeI, а на 3'-конце - сайт рестрикции BspI. Варибельную область клонировали в расщепленный MfeI и BamHI эукариотический экспрессирующий вектор pBI-61, который содержит геномные константные области G1m(3)-аллотипа IgG1 человека. Полученный рекомбинантный экспрессирующий вектор pBI-61/2A4 IgG1-REM имеет размер 9015 пар оснований и несет селективируемый маркер дигидрофолатредуктазу (DHFR) хомячка под контролем DHFR-промотора и сигнала полиаденилирования. Этот вектор также содержит ген бета-лактамазы для отбора в E.coli, а также точки инициации репликации для E.coli (ColE1 ori), вируса SV40 (SV40 ori) и нитчатого фага f1 (f1 ori). Экспрессия тяжелой цепи управляется областью раннего промотора/энхансера из цитомегаловируса человека (CMV) в сочетании с усиливающим транскрипцию элементом (TE) из генома хомячка. Для остановки транскрипции и стабилизации транскриптов используется сигнал полиаденилирования из гормона роста хомячка и для усиления транскрипции - некодирующая последовательность из генома хомячка (TE).

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

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

Гуманизированное 2A4 получали в клетках яичника китайского хомячка (CHO), выращиваемых в химической среде без каких-либо компонентов, полученных из крупного рогатого скота. Антитело пулировали из стабильно трансфицированных клеток, из которых в итоге была получена продуцирующая клеточная линия. Полученный пулированный материал очищали с помощью аффинной хроматографии на белке А. Этот материал использовали для исследований перекрестной реактивности на тканях человека и для одноклонового фармакокинетического исследования (PK) на яванских макаках. Состав гуманизированного антитела 2A4 включал 10 мг/мл антитела, 25 мМ L-гистидин/L-гистидин-HCl моногидрат, 230 мМ безводную трегалозу, 0,02%-й (мас./об.) полисорбат 20 (TWEEN® 20), pH 6,5.

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

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

Пример 6. Способ изготовления гуманизированного антитела 2A4.

Разморозка ампулы и размножение посевной культуры.

Клетки из MCB размораживают и переносят в подходящий клеточный культуральный флакон.

Клетки инкубируют при температуре приблизительно 37°C. Размороженную культуру размножают от одного до четырех дней (первый пассаж после разморозки клеток). Для субкультивирования аликвоту выросшей клеточной культуры (и определенный объем прогретой профильтрованной через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм или меньше посевной среды) используют для достижения плотности высева клеток приблизительно $0,1-0,5 \times 10^6$ клеток/мл в стандартных клеточных культуральных сосудах с рабочим объемом, составляющим приблизительно от 0,02 до 1 л. Например, первый пассаж можно провести в сосудах 0,125, или 0,25 л, или 0,5 л с последующими пассажами в 1-литровых сосудах. На этой стадии культивирования можно заложить исходную культуру. Для приготовления посевных культур для отдельных производственных ферментеров аликвоты фондовых культур размножали, чтобы получить объем культуры до 25 л. Как правило, культуру клеток рассеивают из 1-литровой культуры на 2 или несколько 1-литровых или 2-литровых культур, затем на 2 или несколько 2-литровых или 3-литровых культур и, наконец, на 2 или несколько культур с объемом до 25 л на сосуд. Выросшие клеточные суспензии из нескольких сосудов можно объединить и использовать для посева в 80-литровый биореактор. Для вышеуказанных стадий культивирования в качестве стандартных клеточных культуральных сосудов могут использоваться встряхиваемые колбы, Т-образные колбы, вращающиеся колбы и мешки.

Посев культур в биореакторы.

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

Производственная культура в 2000-литровом биореакторе.

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

Сбор и осветление культуры.

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

Очистка.

Антитело очищают из HCCF с помощью серии стадий, включающих аффинную хроматографию, кислотную обработку, глубинную фильтрацию, анионообменную хроматографию, катионообменную хроматографию, нанофильтрацию и ультра/диафильтрацию, некоторые из которых могут быть выполнены в нескольких циклах. Для удаления загрязнений антитело специфично связывается на стадии аффинной хроматографии. HCCF наносится на хроматографическую колонку, заполненную носителем MabSelect. Носитель связывается с антителом при нейтральном pH, в то время как загрязнения остаются в проскоке и удаляются. Колонку элюируют ступенчато 100 мМ раствором уксусной кислоты/ацетата натрия, pH 3,5. Для инактивации потенциальных вирусных загрязнений раствор антитела инкубируют при комнатной температуре в течение как минимум 60 мин при pH $3,5 \pm 0,1$. После инкубации обработанный ки-

слотой пул антитела подводят до pH 7,2 с помощью 2М раствора триметанола и проводят глубинную фильтрацию для осветления. Для анионообменной хроматографии пулированный продукт после глубинной фильтрации доводят до проводимости ≤ 7 мСм/см водой для инъекций (WFI). Доведенный пул наносят на хроматографическую колонку, заполненную смолой Q Sepharose FF. Антитело проходит через анионообменный носитель, не связываясь с ним. Осуществляют контроль проскока, и фракцию, содержащую антитело, собирают исходя из измерения оптической плотности. Для катионообменной хроматографии пулированный продукт доводят до pH $5,5 \pm 0,1$ добавлением уксусной кислоты и до проводимости $\leq 7,5$ мСм/см, используя WFI. Доведенный пулированный продукт наносят на хроматографическую колонку, заполненную катионообменной смолой SP Sepharose FF. Эту хроматографическую стадию выполняют в режиме связывание-элюция. Антитело связывается с катионообменным носителем. Колонку элюируют ступенчато раствором 100 мМ уксусной кислоты ацетата/натрия и 138,5 мМ хлорида натрия, pH 5,5. Потенциальные вирусные загрязнения удаляются путем пропускания раствора антител через предварительный фильтр 0,1 мкм и нанофильтр Planova 20N при максимальном давлении в 1 бар дифференциального давления нанофильтра Planova 20N. Во время ультрафильтрации/диафильтрации (UF/DF) продукт концентрируют до заданной концентрации, а буфер заменяют на буфер фармацевтического состава. Концентрирование и диафильтрацию осуществляют с использованием ультрафильтрационных мембран, имеющих отсечение приблизительно 30 кДа. Материал обрабатывается путем концентрирования продукта до 30-100 мг/мл. Пул после 30 кДа подвергают диафильтрации с раствором 25 мМ L-гистидина, pH 6,5 и промывают до концентрации примерно 60-70 мг/мл. Промежуточный пул 30 кДа можно хранить при -40°C до приготовления фармацевтического состава. Для приготовления фармацевтического состава пулированный продукт 30 кД переводят в раствор, содержащий 17,5 мМ L-гистидин/7,5 мМ L-гистидина гидрохлорид, 230 мМ трегалоза и 0,02% (мас./об.) полисорбат 20, pH 6,5. В конце антитело разбавляют буфером фармацевтического состава до заданной концентрации 10 мг/мл. Полученное лекарственное вещество фильтруют через фильтр с размером пор 0,22 мкм для удаления любых потенциальных случайных микробных загрязнений и частиц. До фасовки лекарственное вещество можно хранить в замороженном виде при -40°C .

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

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

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

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

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

Таблица 1

Композиция доклинического и клинического лекарственного вещества гуманизованного антитела 2A4

Компонент	Функция	Концентрация (г/л)	Номинальное количество (мг/флакон)	
			Размер доклинического флакона = 25 мл (20R)	Размер клинического флакона = 25 мл (20R)
Лекарственное вещество гуманизованное антитело 2A4	Действующее вещество	10	200	100
L-гистидин	Компонент буфера	2,72	54,4	27,2
L-гистидина гидрохлорид, моногидрат	Компонент буфера	1,57	31,4	15,7
Трегалозы дигидрат	Вещество для изменения тоничности	87,02	1740,4	870,2
Полисорбат 20 (TWEEN® 20)	Поверхностно-активное вещество	0,20	4,0	2,0
Вода для инъекций (WFI)	Растворитель	--	Добавляют WFI до общего объема 20 мл	Добавляют WFI до общего объема 10 мл

Пример 9. Состав партии для лекарственного продукта (флакон 100 мг/мл).
Для партии из 2600 флаконов лекарственного продукта был разработан состав, который приведен в табл. 2.

Таблица 2
Состав партии из 2600 флаконов

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

Пример 10. Лиофилизация.

Использовали лиофильную сушилку Hof Com 26041 для лиофилизации состава лекарственного вещества гуманизованного антитела 2A4 в течение примерно 86 ч с давлением, регулируемым контрольной системой MKS (MKS Instruments), с вводом N₂ в соответствии с программой, указанной в табл. 3. Конечную точку определяли по сигналу Пирани. Во время сушки флаконы стояли непосредственно на полках без подносов для лиофилизации. Продув азотом проводили при примерно 600 мбар, используя стерильный азот фармацевтического качества. Флаконы затем закрывали и хранили при 5°C в лиофильной сушке. Конечный лекарственный продукт хранили при температуре 2-8°C в защищенном от света месте. Этот процесс должен давать лиофилизированный остаток от белого до желтоватого цвета.

В табл. 3 приведена программа лиофилизации лекарственного вещества гуманизованного антитела 2A4.

Таблица 3

Стадии лиофилизации

Стадия	№ стадии	Время [ч:мин]	Температура на полке [°С]	Вакуум MKS [мбар]
Загрузка	01	00:01	5	выключен
Заморозка	02	00:15	5	выключен
	03	00:05	2	выключен
	04	02:00	2	выключен
	05	01:05	-50	выключен
	06	02:30	-50	выключен
Первичная сушка	07	00:05	-50	0, 10
	08	00:40	-10	0, 10
	09	55:00	-10	0, 10
Вторичная сушка	10	04:30	30	0, 10
	11	20:00	30	0, 10
Общее время		86:11		

Пример 11. Восстановление лиофилизированного лекарственного продукта.

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

Пример 12. Клиническая оценка лекарственного вещества гуманизированного антитела 2A4.

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

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Лيوфилизированный состав антитела, которое связывается с агрегированным амилоидным белком легкой цепи для терапевтического или профилактического лечения человека, имеющего AA-амилоидоз или AL-амилоидоз или имеющего риск его развития, содержащий:

(а) гуманизированную версию антитела 2A4 (номер доступа ATCC PTA-9662) или ее антигенсвязывающий фрагмент;

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую три определяющие комплементарность области, приведенные в SEQ ID NO: 6, 7 и 8, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую три определяющие комплементарность области, приведенные в SEQ ID NO: 9, 10 и 11,

(b) L-гистидин;

(c) L-гистидин-HCl моногидрат;

(d) трегалозу и

(e) полисорбат 20,

в таких количествах, которые при восстановлении дают водный раствор, где:

(i) антитело присутствует в концентрации в диапазоне от примерно 5 до примерно 15 мг/мл;
 (ii) гистидиновый буфер присутствует в концентрации в диапазоне от примерно 20 до примерно 30 мМ;

(iii) трегалоза присутствует в концентрации в диапазоне от примерно 210 до примерно 250 мМ;

(iv) полисорбат 20 присутствует в концентрации в диапазоне от примерно 0,005 до примерно 0,05 мас.%; и где водный раствор имеет рН в интервале от примерно 6 до примерно 7.

2. Лиофилизированный состав по п.1, который при восстановлении дает водный раствор, содержащий:

(a) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент присутствует в концентрации примерно 10 мг/мл;

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

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

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

(e) рН примерно 6,5.

3. Лиофилизированный состав по п.2, где лиофилизированный состав содержит примерно 100 мг антитела или его антигенсвязывающего фрагмента для восстановления с помощью стерильной воды.

4. Лиофилизированный состав по п.1, содержащий:

(i) 100 мг антитела или его антигенсвязывающего фрагмента;

(ii) 27,2 мг L-гистидина и 15,7 мг L-гистидин-НСI моногидрата;

(iii) 870,2 мг трегалозы дегидрата и

(iv) 2 мг полисорбата 20.

5. Лиофилизированный состав антитела, которое связывается с агрегированным амилоидным белком легкой цепи для терапевтического или профилактического лечения человека, имеющего АА-амилоидоз или АL-амилоидоз или имеющего риск его развития, содержащий:

(a) гуманизированный вариант антитела 2А4 (номер доступа АТСС РТА-9662) или его антигенсвязывающий фрагмент, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4, и переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5;

(b) L-гистидин;

(c) L-гистидин-НСI моногидрат;

(d) трегалозу и

(e) полисорбат 20,

в таких количествах, которые при восстановлении дают водный раствор, где:

(i) антитело присутствует в концентрации в диапазоне от примерно 5 до примерно 15 мг/мл;

(ii) гистидиновый буфер присутствует в концентрации в диапазоне от примерно 20 до примерно 30 мМ;

(iii) трегалоза присутствует в концентрации в диапазоне от примерно 210 до примерно 250 мМ;

(iv) полисорбат 20 присутствует в концентрации в диапазоне от примерно 0,005 до примерно 0,05 мас.%; и

где водный раствор имеет рН в интервале от примерно 6 до примерно 7.

6. Лиофилизированный состав по п.5, который при восстановлении дает водный раствор, содержащий:

(a) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, присутствующее в концентрации примерно 10 мг/мл;

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

(c) трегалозу присутствующую в концентрации 230 мМ;

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

(e) при рН 6,5.

7. Лиофилизированный состав по п.6, где лиофилизированный состав содержит 100 мг антитела для восстановления стерильной водой.

8. Лиофилизированный состав по п.5, содержащий:

(i) 100 мг антитела или его антигенсвязывающего фрагмента;

(ii) 27,2 мг L-гистидина и 15,7 мг L-гистидин-НСI моногидрата;

(iii) 870,2 мг трегалозы дегидрата и

(iv) 2 мг полисорбата 20.

9. Лиофилизированный состав антитела, которое связывается с агрегированным амилоидным белком легкой цепи для терапевтического или профилактического лечения человека, имеющего АА-амилоидоз или АL-амилоидоз или имеющего риск его развития, содержащий:

(a) гуманизированную версию антитела 2А4 (номер доступа АТСС РТА-9662) или ее антигенсвязывающий фрагмент;

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2;

кислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 15;

- (b) L-гистидин;
- (c) L-гистидин-HCl моногидрат;
- (d) трегалозу и
- (e) полисорбат 20,

в таких количествах, которые при восстановлении дают водный раствор, где:

- (i) антитело присутствует в концентрации в диапазоне от примерно 5 до примерно 15 мг/мл;
- (ii) гистидиновый буфер присутствует в концентрации в диапазоне от примерно 20 до примерно 30 мМ;
- (iii) трегалоза присутствует в концентрации в диапазоне от примерно 210 до примерно 250 мМ;
- (iv) полисорбат 20 присутствует в концентрации в диапазоне от примерно 0,005 до примерно 0,05 мас.%; и где водный раствор имеет pH в интервале от примерно 6 до примерно 7.

10. Лиофилизированный состав по п.9, который при восстановлении дает водный раствор, содержащий:

- (a) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент присутствует в концентрации примерно 10 мг/мл;
- (b) гистидиновый буфер, присутствующий в концентрации примерно 25 мМ;
- (c) трегалозу, присутствующую в концентрации примерно 230 мМ;
- (d) полисорбат 20, присутствующий в концентрации примерно 0,2 г/л; и
- (e) pH примерно 6,5.

11. Лиофилизированный состав по п.10, где лиофилизированный состав содержит 100 мг антитела для восстановления стерильной водой.

12. Лиофилизированный состав по п.9, содержащий:

- (i) 100 мг антитела или его антигенсвязывающего фрагмента;
- (ii) 27,2 мг L-гистидина и 15,7 мг L-гистидин-HCl моногидрата;
- (iii) 870,2 мг трегалозы дегидрата и
- (iv) 2 мг полисорбата 20.

13. Лиофилизированный состав антитела, которое связывается с агрегированным амилоидным белком легкой цепи для терапевтического или профилактического лечения человека, имеющего AL-амилоидоз или AL-амилоидоз или имеющего риск его развития, содержащий:

(a) гуманизованную версию антитела 2A4 (номер доступа ATCC PTA-9662) или ее антигенсвязывающий фрагмент;

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую три определяющие комплементарность области, приведенные в SEQ ID NO: 6, 7 и 8, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую три определяющие комплементарность области, приведенные в SEQ ID NO: 9, 10 и 11,

- (b) L-гистидин;
- (c) L-гистидин-HCl моногидрат;
- (d) трегалозу и
- (e) полисорбат 20,

в таких количествах, которые при восстановлении дают водный раствор, где:

- (i) антитело присутствует в концентрации в диапазоне от примерно 25 до примерно 75 мг/мл;
- (ii) гистидиновый буфер присутствует в концентрации в диапазоне от примерно 20 до примерно 30 мМ;
- (iii) трегалоза присутствует в концентрации в диапазоне от примерно 210 до примерно 250 мМ;
- (iv) полисорбат 20 присутствует в концентрации в диапазоне от примерно 0,005 до примерно 0,05 мас.%; и

где водный раствор имеет pH в интервале от примерно 6 до примерно 7.

14. Лиофилизированный состав по п.13, который при восстановлении дает водный раствор, содержащий:

- (a) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, присутствующее в концентрации примерно 50 мг/мл;
- (b) гистидиновый буфер, присутствующий в концентрации 25 мМ;
- (c) трегалозу, присутствующую в концентрации 230 мМ;
- (d) полисорбат 20, присутствующий в концентрации 0,2 г/л; и
- (e) при pH 6,5.

15. Лиофилизированный состав по п.14, где лиофилизированный состав содержит 500 мг антитела для восстановления стерильной водой.

16. Лиофилизированный состав по п.13, содержащий:

- (i) 500 мг антитела или его антигенсвязывающего фрагмента;
- (ii) 27,2 мг L-гистидина и 15,7 мг L-гистидин-HCl моногидрата;

(iii) 870,2 мг трегалозы дегидрата и

(iv) 2 мг полисорбата 20.

17. Лиофилизированный состав антитела, которое связывается с агрегированным амилоидным белком легкой цепи для терапевтического или профилактического лечения человека, имеющего АА-амилоидоз или AL-амилоидоз или имеющего риск его развития, содержащий:

(a) гуманизированный вариант антитела 2A4 (номер доступа ATCC PTA-9662) или его антигенсвязывающий фрагмент, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4, и переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5;

(b) L-гистидин;

(c) L-гистидин-HCl моногидрат;

(d) трегалозу и

(e) полисорбат 20,

в таких количествах, которые при восстановлении дают водный раствор, где:

(i) антитело присутствует в концентрации в диапазоне от примерно 25 до примерно 75 мг/мл;

(ii) гистидиновый буфер присутствует в концентрации в диапазоне от примерно 20 до примерно 30 мМ;

(iii) трегалоза присутствует в концентрации в диапазоне от примерно 210 до примерно 250 мМ;

(iv) полисорбат 20 присутствует в концентрации в диапазоне от примерно 0,005 до примерно 0,05 мас.%; и

где водный раствор имеет pH в интервале от примерно 6 до примерно 7.

18. Лиофилизированный состав по п.17, который при восстановлении дает водный раствор, содержащий:

(a) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, присутствующее в концентрации примерно 50 мг/мл;

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

(c) трегалозу, присутствующую в концентрации 230 мМ;

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

(e) при pH 6,5.

19. Лиофилизированный состав по п.18, где лиофилизированный состав содержит 500 мг антитела для восстановления стерильной водой.

20. Лиофилизированный состав по п.17, содержащий:

(i) 500 мг антитела или его антигенсвязывающего фрагмента;

(ii) 27,2 мг L-гистидина и 15,7 мг L-гистидин-HCl моногидрата;

(iii) 870,2 мг трегалозы дегидрата и

(iv) 2 мг полисорбата 20.

21. Лиофилизированный состав антитела, которое связывается с агрегированным амилоидным белком легкой цепи для терапевтического или профилактического лечения человека, имеющего АА-амилоидоз или AL-амилоидоз или имеющего риск его развития, содержащий:

(a) гуманизованную версию антитела 2A4 (номер доступа ATCC PTA-9662) или ее антигенсвязывающий фрагмент;

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 15;

(b) L-гистидин;

(c) L-гистидин-HCl моногидрат;

(d) трегалозу и

(e) полисорбат 20,

в таких количествах, которые при восстановлении дают водный раствор, где:

(i) антитело присутствует в концентрации в диапазоне от примерно 25 до примерно 75 мг/мл;

(ii) гистидиновый буфер присутствует в концентрации в диапазоне от примерно 20 до примерно 30 мМ;

(iii) трегалоза присутствует в концентрации в диапазоне от примерно 210 до примерно 250 мМ;

(iv) полисорбат 20 присутствует в концентрации в диапазоне от примерно 0,005 до примерно 0,05 мас.%; и

где водный раствор имеет pH в интервале от примерно 6 до примерно 7.

22. Лиофилизированный состав по п.21, который при восстановлении дает водный раствор, содержащий:

(a) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, присутствующее в концентрации примерно 50 мг/мл;

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

- (c) трегалозу, присутствующую в концентрации 230 мМ;
- (d) полисорбат 20, присутствующий в концентрации 0,2 г/л; и
- (e) при рН 6,5.

23. Лиофилизированный состав по п.22, где лиофилизированный состав содержит 500 мг антитела для восстановления стерильной водой.

24. Лиофилизированный состав по п.21, содержащий:

- (i) 500 мг антитела или его антигенсвязывающего фрагмента;
- (ii) 27,2 мг L-гистидина и 15,7 мг L-гистидин-НСI моногидрата;
- (iii) 870,2 мг трегалозы дегидрата и
- (iv) 2 мг полисорбата 20.

25. Способ терапевтического или профилактического лечения пациента человека, имеющего амилоидоз легких цепей (AL-амилоидоз) или имеющего риск его возникновения, характеризующийся наличием амилоидных фибрилл, отложений или префибриллярных агрегатов, который включает введение пациенту человеку по меньшей мере одной дозы бортезомиба и по меньшей мере одной дозы лиофилизированного состава по любому из пп.1-24, который был восстановлен для введения пациенту человеку, где по меньшей мере одну дозу бортезомиба вводят пациенту один раз в семь дней; и где по меньшей мере одна доза восстановленного лиофилизированного состава содержит примерно 25 мг антитела на кг массы тела пациента человека и ее вводят пациенту один раз каждые 28 дней.

26. Фармацевтический продукт, содержащий:

- (a) флакон, содержащий лиофилизированный состав по п.1;
- (b) инструкции для восстановления лиофилизированного состава, требующие восстановления с водой для инъекций до экстрагируемого объема 10 мл; и
- (c) инструкции для получения восстановленного состава для инфузий, где флакон содержит примерно 100 мг антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, примерно 27,2 мг L-гистидина, примерно 15,7 мг L-гистидин НСI моногидрата, примерно 870,2 мг трегалозы дегидрата и примерно 2 мг полисорбата 20.

27. Фармацевтический продукт, содержащий:

- (a) флакон, содержащий лиофилизированный состав по п.5;
- (b) инструкции для восстановления лиофилизированного состава, требующие восстановления с водой для инъекций до экстрагируемого объема 10 мл; и
- (c) инструкции для получения восстановленного состава для инфузий, где:
 - (i) флакон, содержащий примерно 100 мг антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, примерно 27,2 мг L-гистидина, примерно 15,7 мг L-гистидин НСI моногидрата, примерно 870,2 мг трегалозы дегидрата и примерно 2 мг полисорбата 20; и
 - (ii) инструкции для восстановления, требующие восстановление с использованием воды для инъекций до экстрагируемого объема 10 мл.

28. Фармацевтический продукт, содержащий:

- (a) флакон, содержащий лиофилизированный состав по п.9;
- (b) инструкции по восстановлению лиофилизированного состава, требующие восстановления с водой для инъекций до экстрагируемого объема 10 мл; и
- (c) инструкции по получению восстановленного состава для инфузий, причем флакон содержит примерно 100 мг антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, примерно 27,2 мг L-гистидина, примерно 15,7 мг L-гистидин НСI моногидрата, примерно 870,2 мг трегалозы дегидрата и примерно 2 мг полисорбата 20.

29. Фармацевтический продукт, содержащий:

- (a) флакон, содержащий лиофилизированный состав по п.13, требующий восстановления с водой для инъекций до экстрагируемого объема 10 мл;
- (b) инструкции для восстановления лиофилизированного состава; и
- (c) инструкции для получения восстановленного состава для инфузий, где флакон содержит примерно 100 мг антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, примерно 27,2 мг L-гистидина, примерно 15,7 мг L-гистидин НСI моногидрата, примерно 870,2 мг трегалозы дегидрата и примерно 2 мг полисорбата 20.

30. Фармацевтический продукт, содержащий:

- (a) флакон, содержащий лиофилизированный состав по п.17, требующий восстановления с водой для инъекций до экстрагируемого объема 10 мл;
- (b) инструкции для восстановления лиофилизированного состава; и
- (c) инструкции для получения восстановленного состава для инфузий, где флакон содержит примерно 100 мг антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, примерно 27,2 мг L-гистидина, примерно 15,7 мг L-гистидин НСI моногидрата, примерно 870,2 мг трегалозы дегидрата и примерно 2 мг полисорбата 20.

31. Фармацевтический продукт, содержащий:

- (а) флакон, содержащий лиофилизированный состав по п.21, требующий восстановления с водой для инъекций до экстрагируемого объема 10 мл;
- (б) инструкции для восстановления лиофилизированного состава; и
- (с) инструкции для получения восстановленного состава для инфузий, где флакон содержит примерно 100 мг антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, примерно 27,2 мг L-гистидина, примерно 15,7 мг L-гистидин HCl моногидрата, примерно 870,2 мг трегалозы дегидрата и примерно 2 мг полисорбата 20.

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

```

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFN TYAMYWIRQA PGKGLEWVAR
51 IRSKSNYYAI YYADSVKDRF TISRDDSKNS LYLQMNLSLKT EDTAVYYCAR
101 PYSDSFAYWG QGTLVTVSSA STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD
151 YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFPVAVLQSSG LYSLSVSVTV PSSSLGTQTY
201 ICNVNHHKPSN TKVDKRVEPK SCDKTHTCP CPAPPELLGGP SVFLFPPKPK
251 DTLMISRTP E VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS
301 TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV
351 YTLPPSREEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTPPVVL
401 DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPGK
(SEQ ID NO: 15)

```

Каппа-легкая цепь гуманизированного 2A4:

```

DVVMTQSPSLP LPVTPGEPAS ISCRSSQSLV HSTGNTYLHW YLQKPGQSPQ
51 LLIIYKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCSQSTHVP
101 FTFGGGTQVE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVIVCL LNNFYPREAK
151 VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDYSTYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE
201 VTHQGLSSPV TKSFNREGC
(SEQ ID NO: 13)

```

Фиг. 1А

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

```

1 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFN TYAMYWIRQA PGKGLEWVAR
51 IRSKSNYYAI YYADSVKDRF TISRDDSKNS LYLQMNLSLKT EDTAVYYCAR
101 PYSDSFAYWG QGTLVTVSSA STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD
151 YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFPVAVLQSSG LYSLSVSVTV PSSSLGTQTY
201 ICNVNHHKPSN TKVDKRVEPK SCDKTHTCP CPAPPELLGGP SVFLFPPKPK
251 DTLMISRTP E VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS
301 TYRVSVLT V LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV
351 YTLPPSREEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTPPVVL
401 DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPGK
(SEQ ID NO: 14)

```

Тяжелая цепь гуманизированного 2A4 IgG2:

```

1 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFN TYAMYWIRQA PGKGLEWVAR
51 IRSKSNYYAI YYADSVKDRF TISRDDSKNS LYLQMNLSLKT EDTAVYYCAR
101 PYSDSFAYWG QGTLVTVSSA STKGPSVFPL APCSRSTSES TAALGCLVKD
151 YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFPVAVLQSSG LYSLSVSVTV PSSNFGTQTY
201 TCNVNHHKPSN TKVDKTVRER CCVECPPCA PPVAGPSVFL FPPKPKDTLM
251 ISRTEPVTCV VVDVSHEDPE VQFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQFNSTFRV
301 VSVLTVVHQD WLNKKEYKCK VSNKGLPAPI EKTISKTKGQ PREPQVYTLF
351 PSREEMTKNQ VSLTCLVKG F YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPMLDSGD
401 SFFLYSKLTV DKSRRWQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSL S LSPGK
(SEQ ID NO: 16)

```

Фиг. 1В

VL мышиноного 2A4:

MKLEPVRLLVLMFWIFASSSDVVMQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQSLVHSTGNTYLHWY LQKPGQSPKLLIYKVS NFRFSGVPDRFSGS
GSGTYFTLKISRVEAEDLGVYFC SQSTHVPFTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 1)

VL мышиноного 7D8:

MKLEPVRLLVLMFWIFASSSDVVMQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQSLVHSTGNTYLHWY LQKPGQSPKLLIYKVS NFRFSGVPDRFSGS
GSGTYFTLKISRVEAEDLGVYFC SQSTHVPFTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 2)

Мышиная VH (2A4 и 7D8):

MV LGLKWFVVFYQGVHCEVQLVESGGRLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTYAMYWIRQAPGKGLEWVARIRSKSNYYAIYYADSVKDRF
TIFRDDSQSMY LQMNLSLKTEDTAMYYCVR PYSDSFAYWGQGLVTVSSA (SEQ ID NO: 3)

Фиг. 2

Версия 3 VL Hum2A4:

DVVMTQSPSLP LPVTPGEPASISCRSSQSLVHSTGNTYLHWY LQKPGQSPQLLIYKVS NFRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV
YYCSQSTHVPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 4)

Версия 3 VH Hum2A4/7D8/8G9:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMYWIRQAPGKGLEWVARIRSKSNYYAIYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNLSL
KTEDTAVYYCARPYSDSFAYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 5)

Фиг. 3

кДНК последовательность тяжелой цепи Nu2A4 VH3VL3 hcg1,k:

ATGGAGTTCGGCCTGTCCTGGCTGTTCTTGGTGGCCATCCTGAAGGGCGTGCAAGTGCAG 60
GTGCAGTGGTCCAGTCCGGCCGAGGCCTGGTGCAGCCTGGCGGCTCCCTGAGACTGTCC 120
TGCGCCGCTCCGGCTTCACTTCAACACCTAGCCATGTACTGGATCAGGCAGGCTCCT 180
GGCAAGGACTGGAGTGGTGGCCGGATCAGGTCCAAGTCCAACAACACGCTATCTAC 240
TACGCCGACTCCGTGAAGGACCGGTTACCATCTCCCGGACGACTCCAAGAACTCCCTG 300
TATCTGCAGATGAACCTCCGTGAAAAACCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCTCGGCCT 360
TACTCCGACTCCTTCGCCTACTGGGGCCAGGGCACCTGGTGAACCGTTCAGCGCCTCC 420
ACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCTTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACA 480
GCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAAC 540
TCAGGCCCCCTGACCAGGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTTACAGTCCCTCAGGACTC 600
TACTCCCTCAGCAGCGTGGTGAACCTGACCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACTACATC 660
TGCAACGTGAATCAACAAGCCAGCAACCAAGGTGGACAAAGAGAGTTGAGCCCAATCT 720
TGTGACAAAACTCACACATGCCACCGTGCACACCTGAACCTCTGGGGGACCGTCA 780
GTCTTCTCTTCCCGCCAAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC 840
ACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTG 900
GACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGCAAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACG 960
TACCGTGTGGTCAAGCGTCTCACCGTCCCTGCACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTAC 1020
AAGTGCAGGTTCTCCAACAAGCCCTCCAGCCCATCGAAGAACCATCTCCAAGGCT 1080
AAAGGGACGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACGCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACC 1140
AAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGCATCGCCGTG 1200
GAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATACAAAGACCAGCCCTCCCGTGTGGAC 1260
TCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG 1320
GGGAACGTTCTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTTGCACAACCACTACACGCAAGAAG 1380
AGCCTCTCCCTGTCCCGGTAATGA 1407
 (SEQ ID NO: 23)

Фиг. 4А

кДНК последовательность легкой цепи Nu2A4 VH3VL3 hcg1,k:

ATGGACATGCGGGTGCCCGCACAGTGTCTGGGCTGCTGATGCTGTGGGTGTCCGGCTCC 60
TCCGGCGACGTGGTGTGACCCAGTCCCTCTGTCCCTGCCTGTGACCCCTGGCGAGCCT 120
GCCTCCATCTCCTGCGGTCCTCCAGTCCCTGGTGCCTCCACCGCAACACCTATCTG 180
CACTGGTATCTGCAGAAGCCTGGCCAGTCTCCTCAGTGTGATCTACAAGGTGTCCAAC 240
CGGTTCTCCGGCGTGCCTGACCGGTTCTCTGGCTCCGGCTCCGGCACCGACTTCACCCCTG 300
AAGATCTCCCGGGTGGAGGCGAGGACGTGGGCGTGTACTACTGCTCCAGTCCACCCAC 360
GTCCCTTTACSTTCGGCGGAGGCACCAAGGTGGAGATCAAGCGAAGTGTGGCTGCACCA 420
TCTGTCTTCACTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTG 480
TGCTTGTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGTGGATAACGCC 540
CTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTCAAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTAC 600
AGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAGTCTACGCC 660
TGCGAAGTCACCCATCAGGGCTGAGCTCGCCGTCACAAGAGGTTCAACAGGGGAGAG 720
TGTTAG 726
 (SEQ ID NO: 20)

Фиг. 4В



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2