

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202390186 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.03.09

(51) Int. Cl. A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.06.28

(54) ГУМАНИЗИРОВАННЫЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ ЕМАРП

(31) 63/045,687

(72) Изобретатель:

(32) 2020.06.29

Хэй Дуглас В.П., Березовски
Сьюзанн Э., Найт Дэвид, Хуан
Кэсинь, Ванг Джордон К. (US)

(33) US

(86) PCT/US2021/039389

(87) WO 2022/005979 2022.01.06

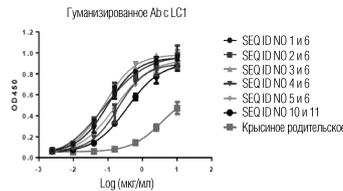
(74) Представитель:

(71) Заявитель:

АЛЛИНЭР ТЕРАПЬЮТИКС, ЭлЭлСи
(US)

Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к моноклональным антителам, которые связываются с эндотелиальным моноцитактивирующим полипептидом II, и к способам лечения с их использованием.



	SEQ ID NO 1 и 6	SEQ ID NO 2 и 6	SEQ ID NO 3 и 6	SEQ ID NO 4 и 6	SEQ ID NO 5 и 6	SEQ ID NO 10 и 11	Крысиное родительское
EC50 (μg/ml)	0.098	0.076	0.082	0.198	0.163	0.361	3.605

A1

202390186

202390186

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-576924EA/032

ГУМАНИЗИРОВАННЫЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ ЕМАР II

Перекрестные ссылки на родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет в соответствии с 35 U.S.C. § 119(e) в отношении временной заявки США № 63/045687, поданной 29 июня 2020 г., каждая из которых включена в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Эндотелиальный моноцитактивирующий полипептид II (ЕМАРII), представляет собой проапоптотический и моноцитарный хемоаттрактантный цитокин, вовлеченный в широкий спектр патологий, в совокупности оказывающий огромное влияние на здоровье человека. В частности, было показано, что ЕМАРII является медиатором эмфиземы, вызванной сигаретным дымом. В данной области техники существует потребность в новых методах лечения, нацеленных на ЕМАРII. Настоящее описание направлено на удовлетворение этой потребности.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В одном аспекте изобретение относится к гуманизованному антителу против эндотелиального моноцитактивирующего полипептида II (анти-ЕМАРII), содержащему: переменный домен тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, имеющую 90% или больше идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 5; и переменный домен легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, имеющую 90% или больше идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 6 - SEQ ID NO: 9.

В другом аспекте изобретение относится к гуманизованному антителу против эндотелиального моноцитактивирующего полипептида II (анти-ЕМАРII), содержащему переменный домен тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, имеющую 90% или больше идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 5.

Еще в одном аспекте изобретение относится к гуманизованному антителу против эндотелиального моноцитактивирующего полипептида II (анти-ЕМАРII), содержащему переменный домен легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, имеющую 90% или больше идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 6 - SEQ ID NO: 9.

Еще в одном аспекте изобретение относится к химерному антителу против эндотелиального моноцитактивирующего полипептида II (анти-ЕМАРII), содержащему переменный домен тяжелой цепи, имеющий 90% или больше идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10, и переменный домен легкой цепи, имеющий 90% или больше идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11.

Еще в одном аспекте изобретение относится к рекомбинантному вектору, содержащему нуклеиновую кислоту, кодирующую аминокислотную последовательность

любой из SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 11.

Еще в одном аспекте изобретение относится к клетке, трансформированной рекомбинантным вектором, описанным в другом месте настоящего документа.

Еще в одном аспекте изобретение относится к способу получения антитела, включающему культивирование трансформированной клетки, описанной в другом месте настоящего документа, в условиях, при которых экспрессируется антитело.

Еще в одном аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей антитело, как описано здесь в другом месте настоящего документа, и по меньшей мере одно фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

Еще в одном аспекте изобретение относится к способу лечения хронической обструктивной болезни легких (COPD) у пациента, причем способ включает введение пациенту фармацевтической композиции, описанной в другом месте настоящего документа.

Еще в одном аспекте изобретение относится к способу лечения эмфиземы у пациента, причем способ включает введение пациенту фармацевтической композиции, описанной в другом месте настоящего документа.

Еще в одном аспекте изобретение относится к способу лечения бронхолегочной дисплазии у пациента, причем способ включает введение пациенту фармацевтической композиции, описанной в другом месте настоящего документа.

Еще в одном аспекте изобретение относится к способу лечения заболевания, опосредованного эндотелиальным моноцитактивирующим полипептидом II (EMAPII), у пациента, причем способ включает введение пациенту фармацевтической композиции, как описано в другом месте настоящего документа.

В некоторых вариантах осуществления вариабельный домен тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность, имеющую 95% или больше идентичности последовательности с любой из последовательностей SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 5; и вариабельный домен легкой цепи имеет аминокислотную последовательность, имеющую 95% или больше идентичности последовательности с любой из последовательностей SEQ ID NO: 6 - SEQ ID NO: 9.

В некоторых вариантах осуществления вариабельный домен тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность, имеющую 99% или больше идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3; и вариабельный домен легкой цепи имеет аминокислотную последовательность, имеющую 99% или больше идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 9.

В некоторых вариантах осуществления вариабельный домен тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность, имеющую 95% или больше идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах осуществления вариабельный домен легкой цепи имеет аминокислотную последовательность, имеющую 95% или больше идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 9.

В некоторых вариантах осуществления переменный домен тяжелой цепи имеет 95% или больше идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10, а переменный домен легкой цепи имеет 95% или больше идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Следующее подробное описание конкретных вариантов осуществления изобретения будет лучше понятно при чтении вместе с приложенными чертежами. С целью иллюстрации изобретения на чертежах показаны конкретные варианты осуществления. Однако следует понимать, что изобретение не ограничивается точными схемами и инструментами вариантов осуществления, показанных на чертежах.

На ФИГ. 1 представлен твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА) гуманизированных антител с LC1 (SEQ ID NO. 6) против про-ЕМАРII человека.

На ФИГ. 2 представлен твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА) гуманизированных антител с LC2 (SEQ ID NO. 7) против про-ЕМАРII человека.

На ФИГ. 3 представлен твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА) гуманизированных антител с LC3 (SEQ ID NO. 8) против про-ЕМАРII человека.

На ФИГ. 4 представлен твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА) гуманизированных антител с LC4 (SEQ ID NO. 9) против про-ЕМАРII человека.

На ФИГ. 5 представлен скрининг ИФА восьми антител против про-ЕМАРII человека.

На ФИГ. 6 представлен скрининг ИФА восьми антител против зрелого ЕМАРII человека.

На ФИГ. 7 представлен скрининг ИФА восьми антител против про-ЕМАРII мыши.

На ФИГ. 8 представлен скрининг ИФА восьми антител против зрелого ЕМАРII мыши.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Определения

Если иное не определено, все технические и научные термины, использованные в настоящем описании, имеют тот же смысл, который вкладывается в них обычным специалистом области, к которой принадлежит данное изобретение. Хотя любые способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным здесь, могут быть использованы на практике для тестирования настоящего изобретения, здесь описаны предпочтительные материалы и способы. При описании и заявлении настоящего изобретения будет использоваться следующая терминология. Также следует понимать, что используемая в настоящем описании терминология предназначена только для целей описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения.

Каждый из следующих используемых в настоящем описании терминов имеет значение, связанное с ним в этом разделе.

Если не указано иное, все используемые в настоящем описании технические и научные термины обычно имеют то же значение, которое обычно понимается

специалистом в области техники, к которой относится данное изобретение. Как правило, номенклатура, используемая в настоящем описании, и лабораторные процедуры в клеточных культурах, молекулярной генетике, аналитической химии, иммунологии, химии и гибридизации нуклеиновых кислот, синтезе моноклональных антител и анализах биологической и биофизической характеристики хорошо известны и широко используются в данной области. Стандартные методики или их модификации используются для химического синтеза и химического анализа.

Форма единственного числа используется в настоящем описании для обозначения одного или более чем одного (т. е. по меньшей мере, одного) грамматического объекта. Например, «элемент» означает один элемент или более одного элемента.

Используемый в настоящем описании термин «эндотелиальный моноцитактивирующий полипептид II» или «EMAPII» относится к провоспалительному цитокину. EMAPII высвобождается из клеток либо в виде проформы 34 кДа («про-EMAPII»), либо в виде зрелого белка 18 кДа при протеолитическом расщеплении протеазами («зрелый-EMAPII»). Человеческий гомолог зрелого EMAPII содержит последовательность

SEQ ID NO:12:

SKPIDVSRDLRIGCIPTARKHPDADSLYVEEVDVGEIAPRTVVSGLVNHVPLE
 QMQNRMVILLCNLKPAKMRGVLSQAMVMCASSPEKIEILAPPNGSVPGDRITFDAFPGE
 PDKELNPKKKIWEQIQPDLHT NDECVATYKGVPFVVKGKGVCR AQTMSNSGIK.

Термин «EMAPII» может использоваться для обозначения как про-, так и зрелой формы этого белка, если не указано иное.

Используемый в настоящем описании термин «примерно» будет понятен специалистам в данной области техники и будет варьироваться в некоторой степени в зависимости от контекста, в котором он используется. Используемый в настоящем описании термин «примерно» применительно к измеримому значению, такому как количество, концентрация, временная продолжительность и т. п., означает, что он включает вариации $\pm 20\%$ или $\pm 10\%$, более предпочтительно $\pm 5\%$, еще более предпочтительно $\pm 1\%$ и еще более предпочтительно $\pm 0, 1\%$ от указанного значения, поскольку такие отклонения подходят для выполнения раскрытых способов.

Используемый в настоящем описании термин «аффинность» для молекулы по отношению к другой относится к степени (или плотности) связывания между двумя молекулами. Более высокая аффинность означает более плотное связывание между двумя молекулами. Аффинность можно количественно определить с помощью константы диссоциации (или K_d), где значение K_d , которое ниже по величине (ближе к нулю), указывает на более высокую аффинность.

Термин «аминокислота», используемый в настоящем описании, включает как природные, так и синтетические аминокислоты, а также как D-, так и L-аминокислоты. «Стандартная аминокислота» означает любую из двадцати L-аминокислот, обычно встречающихся в природных пептидах. «Нестандартные аминокислотные остатки» означают любую аминокислоту, кроме стандартных аминокислот, независимо от того,

получена ли она синтетическим путем или получена из природного источника. Используемый в настоящем описании термин «синтетическая аминокислота» также включает химически модифицированные аминокислоты, включая, помимо прочего, соли, производные аминокислот (такие как амиды) и замены. Аминокислоты, содержащиеся в пептидах, и особенно на карбокси- или амино-конце, могут быть модифицированы путем метилирования, амидирования, ацетилирования или замещения другими химическими группами, которые могут изменить время полужизни пептида в кровотоке без неблагоприятного воздействия на активность пептида. Кроме того, в пептидах может присутствовать или отсутствовать дисульфидная связь.

Термин «антитело», используемый в настоящем описании, относится к молекуле иммуноглобулина, способной специфически связываться со специфическим эпитопом на антигене. Антитела могут представлять собой интактные иммуноглобулины, полученные из природных источников или из рекомбинантных источников, и могут представлять собой иммунореактивные части интактных иммуноглобулинов. Антитела обычно представляют собой тетрамеры молекул иммуноглобулинов. Антитела по настоящему изобретению могут существовать в различных формах, включая, например, поликлональные антитела, моноклональные антитела, внутриклеточные антитела («интраантитела»), Fv, Fab и F(ab)₂, а также одноцепочечные антитела (scFv), антитела верблюдовых и гуманизированные антитела (Harlow et al., 1999, *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow et al., 1989, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, New York; Houston et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; Bird et al., 1988, *Science* 242:423-426). Используемый в настоящем описании термин «нейтрализующее антитело» представляет собой молекулу иммуноглобулина, которая связывается с антигеном и блокирует его биологическую активность.

«Тяжелая цепь антитела», используемая в настоящем описании, относится к большей из двух типов полипептидных цепей, присутствующих во всех молекулах антител в их встречающихся в природе конформациях.

«Легкая цепь антитела», используемая в настоящем описании, относится к меньшей из двух типов полипептидных цепей, присутствующих во всех молекулах антител в их встречающихся в природе конформациях. Легкие цепи α и β относятся к двум основным изотипам легких цепей антител.

Используемый в настоящем описании термин «антиген» или «Ag» определяется как молекула, вызывающая иммунный ответ. Этот иммунный ответ может включать либо выработку антител, либо активацию специфических иммунологически компетентных клеток, или то и другое. Специалисту в данной области будет понятно, что любая макромолекула, включая практически все белки или пептиды, может служить антигеном. Кроме того, антигены могут быть получены из рекомбинантной или геномной ДНК. Специалисту в данной области будет понятно, что любая ДНК, которая включает нуклеотидную последовательность или неполную нуклеотидную последовательность,

кодирующую белок, который вызывает иммунный ответ, следовательно, кодирует «антиген», как этот термин используется в настоящем описании. Кроме того, специалисту в данной области техники будет понятно, что антиген необязательно должен кодироваться исключительно полноразмерной нуклеотидной последовательностью гена. Очевидно, что настоящее изобретение включает, но не ограничивается этим, использование неполных нуклеотидных последовательностей более чем одного гена, и что эти нуклеотидные последовательности расположены в различных комбинациях для индукции желаемого иммунного ответа. Более того, специалисту в данной области будет понятно, что антиген вообще не обязательно должен кодироваться «геном». Совершенно очевидно, что антиген может быть получен или синтезирован или может быть получен из биологического образца. Такой биологический образец может включать, помимо прочего, образец ткани, образец опухоли, клетку или биологическую жидкость.

«Кодирующая область» гена состоит из нуклеотидных остатков кодирующей цепи гена и нуклеотидов некодирующей цепи гена, которые гомологичны или комплементарны, соответственно, кодирующей области молекулы мРНК, продуцируемой при транскрипции гена.

«Кодирующая область» молекулы мРНК также состоит из нуклеотидных остатков молекулы мРНК, которые совпадают с областью антикодона транспортной молекулы РНК во время трансляции молекулы мРНК или которые кодируют стоп-кодон. Таким образом, кодирующая область может включать нуклеотидные остатки, соответствующие аминокислотным остаткам, отсутствующим в зрелом белке, кодируемом молекулой мРНК (например, аминокислотные остатки в сигнальной последовательности экспорта белка).

Термин «комплементарный», используемый в настоящем описании для обозначения нуклеиновой кислоты, относится к широкому понятию комплементарности последовательностей между областями двух цепей нуклеиновой кислоты или между двумя областями одной и той же цепи нуклеиновой кислоты. Известно, что остаток аденина первой области нуклеиновой кислоты способен образовывать специфические водородные связи («спаривание оснований») с остатком второй области нуклеиновой кислоты, антипараллельным первой области, если этот остаток представляет собой тимин или урацил. Точно так же известно, что остаток цитозина первой цепи нуклеиновой кислоты способен образовывать пары оснований с остатком второй цепи нуклеиновой кислоты, которая антипараллельна первой цепи, если этот остаток представляет собой гуанин. Первая область нуклеиновой кислоты комплементарна второй области той же или другой нуклеиновой кислоты, если при антипараллельном расположении двух областей по меньшей мере один нуклеотидный остаток первой области способен к образованию пары оснований с остатком второй области. Предпочтительно первая область включает первую часть, а вторая область включает вторую часть, при этом, когда первая и вторая части расположены антипараллельно, по меньшей мере примерно 50%, а предпочтительно по меньшей мере примерно 75%, по меньшей мере примерно 90% или по меньшей мере примерно 95% нуклеотидных остатков первой части способны образовывать пары

оснований с нуклеотидными остатками второй части. Более предпочтительно, если все нуклеотидные остатки первой части способны образовывать пары оснований с нуклеотидными остатками второй части.

Используемые в настоящем описании термины «консервативная вариация» или «консервативная замена» относятся к замене аминокислотного остатка другим, биологически сходным остатком. Консервативные вариации или замены вряд ли изменят форму пептидной цепи. Примеры консервативных вариаций или замен включают замену одного гидрофобного остатка, такого как изолейцин, валин, лейцин или метионин, на другой или замену одного полярного остатка на другой, например замену аргинина на лизин, глутаминовой кислоты на аспарагиновую кислоту или глутамин на аспарагин и т. п.

Термин «средство доставки» используется в настоящем описании в качестве общей ссылки на любое средство доставки, способное доставлять соединение пациенту, включая, но не ограничиваясь ими, средства парентеральной доставки.

Используемый в настоящем описании термин «ДНК» означает дезоксирибонуклеиновую кислоту.

«Эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество» используются в настоящем описании взаимозаменяемо и относятся к количеству соединения, состава, материала или композиции, как описано в настоящем документе, эффективному для достижения определенного биологического результата. Такие результаты могут включать, но не ограничиваться этим, лечение заболевания или состояния, определяемое любым способом, подходящим в данной области.

«Кодирование» относится к неотъемлемому свойству определенных последовательностей нуклеотидов в полинуклеотиде, таком как ген, кДНК или мРНК, служить в качестве матрицы для синтеза других полимеров и макромолекул в биологических процессах, имеющих определенную последовательность нуклеотидов (т. е. рРНК, тРНК и мРНК) или определенную последовательность аминокислот и вытекающие из этого биологические свойства. Таким образом, ген кодирует белок, если транскрипция и трансляция мРНК, соответствующей этому гену, приводит к образованию белка в клетке или другой биологической системе. Как кодирующая цепь, нуклеотидная последовательность которой идентична последовательности мРНК и обычно указывается в списках последовательностей, так и некодирующая цепь, используемая в качестве матрицы для транскрипции гена или кДНК, могут упоминаться как кодирующие белок или другой продукт этого гена или кДНК.

Используемый в настоящем описании термин «заболевание, опосредованное ЕМАРП» означает любое заболевание у пациента, в котором играют роль чрезмерные уровни ЕМАРП, когда на лечение влияет снижение уровня ЕМАРП у пациента.

«Гуманизированные» формы антител, не являющихся человеческими, (например, мышинных), представляют собой химерные иммуноглобулины, цепи иммуноглобулинов или их фрагменты (такие как F_v, Fab, Fab', F(ab')₂ или другие антигенсвязывающие

субпоследовательности антител), которые содержат минимальную последовательность, полученную из иммуноглобулина, не являющегося человеческим. По большей части гуманизированные антитела представляют собой иммуноглобулины человека (антитело-реципиент), в которых остатки из определяющей комплементарности области (CDR) реципиента заменены остатками из CDR вида, отличного от человека (донорное антитело), такого как мышь, крыса или кролик, имеющими желаемую специфичность, аффинность и способность. В некоторых случаях остатки каркасной области Fv (FR) человеческого иммуноглобулина заменены соответствующими остатками из вида, отличного от человека. Кроме того, гуманизированные антитела могут содержать остатки, которые не обнаруживаются ни в реципиентном антителе, ни в импортированных последовательностях CDR или каркаса. Эти модификации сделаны для дальнейшего совершенствования и оптимизации эффективности антитела. Как правило, гуманизированное антитело будет содержать по существу все, по меньшей мере один, а обычно два переменных домена, в которых все или по существу все области CDR соответствуют областям иммуноглобулина с происхождением, отличным от человеческого, и все или по существу все области FR относятся к последовательности человеческого иммуноглобулина. Гуманизированное антитело оптимально также будет содержать по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc), как правило, иммуноглобулина человека. Для получения дополнительной информации см. Jones et al., *Nature*, 321: 522-525, 1986; Reichmann et al., *Nature*, 332: 323-329, 1988; Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2: 593-596, 1992.

Термин «идентичность», используемый в настоящем описании, относится к идентичности последовательности субъединиц между двумя полимерными молекулами, в частности, между двумя молекулами аминокислот, например, между двумя молекулами полипептида. Когда две аминокислотные последовательности имеют одинаковые остатки в одинаковых положениях; например, если положение в каждой из двух полипептидных молекул занято аргинином, то они идентичны в этом положении. Идентичность или степень, в которой две аминокислотные последовательности имеют одни и те же остатки в одних и тех же положениях при выравнивании, часто выражают в процентах. Идентичность между двумя аминокислотными последовательностями является прямой функцией количества совпадающих или идентичных положений; например, если половина (например, пять положений в полимере длиной десять аминокислот) положений в двух последовательностях идентичны, две последовательности идентичны на 50%; если 90% положений (например, 9 из 10) совпадают или идентичны, две аминокислотные последовательности идентичны на 90%.

При использовании в настоящем описании термины «индивидуум», «пациент» или «объект» включают представителя любого вида животных, включая, но не ограничиваясь ими, птиц, человека и других приматов, а также других млекопитающих, включая коммерчески значимых млекопитающих, таких как крупный рогатый скот, свиньи, лошади, овцы, кошки и собаки. Предпочтительно объектом является человек.

Используемый в настоящем описании термин «материал с инструкциями» включает публикацию, запись, диаграмму или любое другое средство выражения, которое можно использовать для сообщения о полезности композиции и/или соединения по изобретению в наборе. Материал с инструкциями к набору может быть, например, прикреплен к контейнеру, содержащему соединение и/или композицию по изобретению, или отправлен вместе с контейнером, содержащим соединение и/или композицию. В качестве альтернативы, материал с инструкциями может быть отправлен отдельно от контейнера с намерением, чтобы получатель совместно использовал материал с инструкциями и соединение. Доставка материала с инструкциями может осуществляться, например, путем физической доставки публикации или другого средства выражения, сообщающего о полезности набора, или, в качестве альтернативы, может быть осуществлена электронной передачей, например, с помощью компьютера, как например, по электронной почте или с веб-сайта.

«Выделенный» означает измененный или изъятый из естественного состояния. Например, нуклеиновая кислота или пептид, естественным образом присутствующие в живом организме, не являются «выделенными», но та же нуклеиновая кислота или пептид, частично или полностью отделенные от сосуществующих веществ в своем естественном состоянии, являются «выделенными». Выделенная нуклеиновая кислота или белок могут существовать в по существу очищенной форме или могут существовать в ненативной среде, такой как, например, клетка-хозяин.

«Выделенная нуклеиновая кислота» относится к сегменту или фрагменту нуклеиновой кислоты, который был отделен от последовательностей, фланкирующих его в естественном состоянии, т. е., относится к фрагменту ДНК, который был удален из последовательностей, которые обычно соседствуют с фрагментом, т. е. последовательности, соседствующие с фрагментом в геноме, где он встречается в природе. Этот термин также применяется к нуклеиновым кислотам, которые были в значительной степени очищены от других компонентов, которые естественным образом сопровождают нуклеиновую кислоту, т. е. РНК, или ДНК, или белки, которые естественным образом сопровождают ее в клетке. Таким образом, этот термин включает, например, рекомбинантную ДНК, которая включена в вектор, в автономно реплицирующуюся плазмиду или вирус, или в геномную ДНК прокариот или эукариот, или которая существует в виде отдельной молекулы (т. е. в виде кДНК или геномного фрагмента или фрагмента кДНК, полученного с помощью ПЦР или расщепления ферментами рестрикции), независимо от других последовательностей. Он также включает рекомбинантную ДНК, которая является частью гибридного гена, кодирующего дополнительную полипептидную последовательность.

В контексте настоящего изобретения используются следующие сокращения наиболее часто встречающихся оснований нуклеиновых кислот. «А» относится к аденозину, «С» относится к цитозину, «G» относится к гуанозину, «Т» относится к тимидину, а «U» относится к уридину.

Под «нуклеиновой кислотой» подразумевается любая нуклеиновая кислота, независимо от того, состоит ли она из дезоксирибонуклеозидов или рибонуклеозидов, и состоит ли она из фосфодиэфирных связей или модифицированных связей, таких как фосфотриэфирные, фосфорамидатные, силоксановые, карбонатные, карбоксиметилэфирные, ацетамидатные, карбаматные, тиоэфирные, мостиковые фосфорамидатные, мостиковые метиленфосфонатные, фосфоротиоатные, метилфосфонатные, фосфородитиоатные, мостиковые фосфоротиоатные или сульфоновые связи и комбинации таких связей. Термин «нуклеиновая кислота» также конкретно включает нуклеиновые кислоты, состоящие из оснований, отличных от пяти биологически встречающихся оснований (аденин, гуанин, тимин, цитозин и урацил).

Если не указано иное, «нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность» включает все нуклеотидные последовательности, которые являются вырожденными версиями друг друга и которые кодируют одну и ту же аминокислотную последовательность. Нуклеотидная последовательность, которая кодирует белок или РНК, может также включать интроны до такой степени, что нуклеотидная последовательность, кодирующая белок, может в некоторых вариантах содержать интрон(ы).

Для описания полинуклеотидных последовательностей в настоящем описании используются общепринятые обозначения: левый конец одноцепочечной полинуклеотидной последовательности представляет собой 5'-конец; левостороннее направление двухцепочечной полинуклеотидной последовательности называют 5'-направлением.

Направление добавления нуклеотидов от 5' к 3' к зарождающимся транскриптам РНК называется направлением транскрипции. Цепь ДНК, имеющая ту же последовательность, что и мРНК, называется «кодирующей цепью»; последовательности в цепи ДНК, расположенные в 5'-области от контрольной точки на ДНК, называются «последовательностями, расположенными выше»; последовательности на цепи ДНК, которые находятся в 3'-области от контрольной точки ДНК, называются «последовательностями, расположенными ниже».

Термин «олигонуклеотид» обычно относится к коротким полинуклеотидам, обычно не превышающим примерно 60 нуклеотидов. Следует понимать, что когда последовательность нуклеотидов представлена последовательностью ДНК (т.е. А, Т, G, С), она также включает последовательность РНК (т.е. А, U, G, С), в которой «U» заменяет «Т».

Термин «функционально связанный» относится к функциональной связи между регуляторной последовательностью и последовательностью гетерологичной нуклеиновой кислоты, приводящей к экспрессии последней. Например, первая последовательность нуклеиновой кислоты функционально связана со второй последовательностью нуклеиновой кислоты, когда первая последовательность нуклеиновой кислоты находится в функциональной связи со второй последовательностью нуклеиновой кислоты.

Например, промотор функционально связан с кодирующей последовательностью, когда промотор воздействует на транскрипцию или экспрессию кодирующей последовательности. Как правило, функционально связанные последовательности ДНК являются непрерывными и, если необходимо, для соединения двух областей, кодирующих белок, в одной и той же рамке считывания.

Используемый в настоящем описании термин «промотор» определяется как последовательность ДНК, распознаваемая синтетическим аппаратом клетки или введенным синтетическим аппаратом, необходимая для инициации специфической транскрипции полинуклеотидной последовательности.

Используемый в настоящем описании термин «промоторная/регуляторная последовательность» означает последовательность нуклеиновой кислоты, которая требуется для экспрессии продукта гена, функционально связанного с промоторной/регуляторной последовательностью. В некоторых случаях эта последовательность может быть последовательностью основного промотора, а в других случаях эта последовательность может также включать последовательность энхансера и другие регуляторные элементы, которые необходимы для экспрессии продукта гена. Промоторная/регуляторная последовательность может, например, представлять собой последовательность, которая экспрессирует продукт гена тканеспецифическим образом.

Используемый в настоящем описании термин «фармацевтическая композиция» относится к смеси по меньшей мере одного соединения по изобретению с другими химическими компонентами, такими как носители, стабилизаторы, разбавители, диспергаторы, суспендирующие агенты, загустители и/или вспомогательные вещества. Фармацевтическая композиция облегчает введение соединения в организм. В данной области техники существует множество способов введения соединения, включая, но не ограничиваясь ими, внутривенное, пероральное, аэрозольное, парентеральное, глазное, легочное и местное введение.

«Фармацевтически приемлемый» относится к тем свойствам и/или веществам, которые приемлемы для пациента с фармакологической/токсикологической точки зрения и для фармацевта-производителя с физической/химической точки зрения в отношении композиции, состава, стабильности, приемлемости для пациента и биодоступности. «Фармацевтически приемлемый носитель» относится к среде, которая не влияет на эффективность биологической активности активного(активных) ингредиента(ингредиентов) и не токсична для хозяина, которому ее вводят.

Термин «полинуклеотид», используемый в настоящем описании, определяется как цепь нуклеотидов. Кроме того, нуклеиновые кислоты представляют собой полимеры нуклеотидов. Таким образом, используемые в настоящем описании нуклеиновые кислоты и полинуклеотиды являются взаимозаменяемыми. Специалисту в данной области известно, что нуклеиновые кислоты представляют собой полинуклеотиды, которые могут гидролизываться в мономерные «нуклеотиды». Мономерные нуклеотиды могут гидролизываться в нуклеозиды. Используемые в настоящем описании полинуклеотиды

включают, но не ограничиваются ими, все последовательности нуклеиновых кислот, которые получены любыми способами, доступными в данной области, включая, помимо прочего, рекомбинантные способы, т. е. клонирование последовательностей нуклеиновых кислот из рекомбинантной библиотеки или клеточного генома с использованием обычных технологий клонирования и ПЦР™ и т. п., а также синтетическими способами.

Используемые в настоящем описании термины «белок», «пептид» и «полипептид» используются взаимозаменяемо и относятся к соединению, состоящему из аминокислотных остатков, ковалентно связанных пептидными связями. Термин «пептидная связь» означает ковалентную амидную связь, образованную потерей молекулы воды между карбоксильной группой одной аминокислоты и аминогруппой второй аминокислоты. Белок или пептид должен содержать по меньшей мере две аминокислоты, и не накладывается никаких ограничений на максимальное количество аминокислот, которые могут составлять последовательность белка или пептида. Полипептиды включают любой пептид или белок, содержащий две или более аминокислоты, соединенные друг с другом пептидными связями. Используемый в настоящем описании термин относится как к коротким цепям, которые также обычно упоминаются в данной области, например, как пептиды, олигопептиды и олигомеры, так и к более длинным цепям, которые обычно упоминаются в данной области как белки, и которых существует множество типов. «Белки» включают, например, биологически активные фрагменты, по существу гомологичные белки, олигопептиды, гомодимеры, гетеродимеры, варианты белков, модифицированные белки, производные, аналоги и слитые белки, среди прочего. Белки включают природные белки, рекомбинантные белки, синтетические белки или их комбинацию. Белок может быть рецептором или не является им.

Термин «рекомбинантная ДНК», используемый в настоящем описании, определяется как ДНК, полученная путем соединения фрагментов ДНК из разных источников.

Термин «рекомбинантный полипептид», используемый в настоящем описании, определяется как полипептид, полученный с использованием методов рекомбинантной ДНК.

Используемый в настоящем описании термин «РНК» означает рибонуклеиновую кислоту.

Используемый в настоящем описании термин «терапевтический» означает лечение и/или профилактику.

Используемый в настоящем описании термин «лечить» означает снижение частоты проявления симптомов у пациента или введение агента или соединения для снижения частоты и/или тяжести проявления симптомов. Используемый в настоящем описании термин «облегчать» используется взаимозаменяемо с термином «лечить».

Используемый в настоящем описании термин «лечение заболевания, расстройства или состояния» означает снижение частоты или тяжести проявления симптома

заболевания, расстройства или состояния у пациента. Лечение заболевания, расстройства или состояния может включать, а может и не включать полное искоренение или устранение симптома.

«Экспрессирующий вектор» относится к вектору, содержащему рекомбинантный полинуклеотид, содержащий последовательности контроля экспрессии, функционально связанные с нуклеотидной последовательностью, подлежащей экспрессии. Экспрессирующий вектор включает достаточное количество цис-действующих элементов для экспрессии; другие элементы для экспрессии могут поставляться клеткой-хозяином или в системе экспрессии *in vitro*. Экспрессирующие векторы включают все известные в данной области техники, такие как космиды, плазмиды (например, депротенинизированные или содержащиеся в липосомах) и вирусы (например, ретровирусы, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), которые включают рекомбинантный полинуклеотид.

«Вектор» представляет собой композицию вещества, которая содержит ген и которую можно использовать для доставки гена внутрь клетки. Вектор относится к любой плазмиде, содержащей ген, способный перемещать чужеродные последовательности в геномы целевого организма или клетки.

Используемый в настоящем описании термин «фрагмент» применительно к нуклеиновой кислоте означает меньше, чем целое.

В настоящем описании используются следующие сокращения: VH, переменная область тяжелой цепи; VL, переменная область легкой цепи; CH, константная область тяжелой цепи; CL, константная область легкой цепи.

Диапазоны: в настоящем описании различные аспекты изобретения могут быть представлены в формате диапазона. Следует понимать, что описание в формате диапазона дано просто для удобства и краткости и не должно рассматриваться как жесткое ограничение объема изобретения. Соответственно, следует считать, что описание диапазона конкретно раскрывает все возможные субдиапазоны, а также отдельные числовые значения в этом диапазоне. Например, описание диапазона, такого как от 1 до 6, следует считать специально раскрытыми субдиапазонами, такими как от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 2 до 4, от 2 до 6, от 3 до 6 и т. д., а также отдельные числа в этом диапазоне, например, 1, 2, 2,7, 3, 4, 5, 5,3 и 6. Это применимо независимо от широты диапазона.

Описание

Изобретение относится к гуманизированному моноклональному антителу, которое распознает про- и зрелый ЕМАРП. Антитело содержит одну из четырех переменных областей легкой цепи и одну из пяти переменных областей тяжелой цепи. Изобретение дополнительно относится к химерному антителу против ЕМАРП. Кроме того, раскрыты фармацевтические композиции для доставки антител, а также способы лечения заболеваний путем нацеливания на ЕМАРП с помощью антитела по изобретению.

Антитела, векторы и композиции, содержащие антитела

В одном аспекте изобретение относится к гуманизированному антителу против ЕМАРП. Антитело содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий

аминокислотную последовательность, имеющую 90% или больше идентичности последовательности с любой из последовательностей SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 5, и переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую 90% или больше идентичности последовательности с любой из последовательностей SEQ ID NO: 6 - SEQ ID NO: 9. Как показано на ФИГ. 1-8 и в Пример 1, раскрытые в настоящем описании антитела связываются с про- и зрелым ЕМАPII.

H4424 (Гуманизированная HC1) SEQ ID NO: 1
 MDPKGSLSWRILLFLSLAFELSYGEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSDAAMY
 WVRQASGKGLEWVGRIRTKPNNYATYYAASVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTED
 TAVYYCTSWSYDFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
 FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
 KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
 PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
 KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
 QPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
 SPG

H4425 (Гуманизированная HC2) SEQ ID NO: 2

MDPKGSLSWRILLFLSLAFELSYGAVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSD
 AAMYWVRQASGKGLEWVARIRTKPNNYATYYAASVKGRFTISRDDSKNTVYLQMNSL
 KTEDTAVYYCTSWSYDFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL
 VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK
 PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
 VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
 VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
 ESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQK
 SLSLSPG

H4426 (Гуманизированная HC3) SEQ ID NO: 3

MDPKGSLSWRILLFLSLAFELSYGAVHLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSD
 AAMYWVRQASGKGLEWVARIRTKPNNYATYYAASVKGRFTISRDDSKNTVYLQMNSL
 KTEDTAVYYCTSWSYDFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL
 VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK
 PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
 VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
 VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
 ESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQK
 SLSLSPG

H4427 (Гуманизированная HC4) SEQ ID NO: 4

MDPKGSLSWRILLFLSLAFELSYGEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSD
 AAIYWVRQASGKGLEWVARIRTKPNNYATYYAASVKGRFTISRDDSNSTAYLQMNSLK
 TEDTAVYYCTSWSYDFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV

KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK
 SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV
 SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
 VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
 SNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKS
 LSLSPG

H4428 (Гуманизированная HC5) SEQ ID NO: 5

MDPKGSLSWRILLFLSLAFELSYGAVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSD
 AAMYWVRQASGKGLEWVARIRTKPNNYATYYAASVKGRFTISRDDSNTAYLQMNSL
 KTEDTAVYYCTSWSYDFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL
 VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK
 PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD
 VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
 KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
 ESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQK
 SLSLSPG

L4424 (Гуманизированная LC1) SEQ ID NO: 6

METDTLLLWVLLLWVPGSTGDIVMTQSPLSLPVTTPGEPASISCRSSKSLHSSGKT
 YLNWYLQKPGQSPQLLIYWMSNRASGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQ
 QFLEYPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK
 VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS
 FNRGEC

L4425 (Humanized LC2) SEQ ID NO: 7

METDTLLLWVLLLWVPGSTGDIVMTQSPLSLPVTTPGEPASISCRSSKSLHSSGKT
 YLNWYLQKPGQSPQLLIYWMSTRASGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQ
 QFLEYPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK
 VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS
 FNRGEC

L4426 (Гуманизированная LC3) SEQ ID NO: 8

METDTLLLWVLLLWVPGSTGDIVMTQSPLSLPVTTPGEPASISCRSSKSLHSSGKT
 YLNWYLQKPGQSPQLLIYWMSTRASGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQ
 QFLEYPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK
 VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS
 FNRGEC

L4427 (Гуманизированная LC4) SEQ ID NO: 9

METDTLLLWVLLLWVPGSTGDIQMTQSPLSLPVTTPGEPASISCRSSKSLHSSGKT
 YLNWYLQKPGQSPQLLIYWMSTRASGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQ
 QFLEYPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK
 VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS
 FNRGEC

В различных вариантах осуществления одна или обе переменные области тяжелой и легкой цепей гуманизованного антитела против ЕМАРІІ содержат аминокислотную последовательность, имеющую 95% или больше, 96% или больше, 97% или больше, 98% или больше, 99% или больше, или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 5 и с SEQ ID NO: 6 - SEQ ID NO: 9, соответственно.

В другом аспекте изобретение относится к химерному антителу против ЕМАРІІ, содержащему переменный домен тяжелой цепи, имеющий 90% или больше идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10, и переменный домен легкой цепи, имеющий 90% или больше идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11.

МНС1309НС. 4 SEQ ID NO: 10

AVHLVESGGGFVQPTESLKISCAASGFTFSDAAMYWVRQAPGKGLEWVARIRTK
PNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKSMVYLQMDNLKTEDTAMYYCTSWSYDFDYWGQ
GVMVTVSS

МНС1309LC. 1 SEQ ID NO: 11

DIVMTQGALPNPVPSGESASITCQSSKSLHSSGKTYLNWYLQRPGQSPHLLIYW
MSTRASGVSDRLSGSGSGTDFTLKISSVEAEDVGVYYCQQFLEYPLTFGSGTKLEIK

В различных вариантах осуществления одна или обе переменные области тяжелой и легкой цепей химерного антитела против ЕМАРІІ содержат аминокислотную последовательность, имеющую 95% или больше, 96% или больше, 97% или больше, 98% или больше, 99% или больше, или 100% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 11, соответственно.

В другом аспекте изобретение относится к рекомбинантному вектору, содержащему нуклеиновую кислоту, кодирующую аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 11. В различных вариантах осуществления вектор содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую тяжелую цепь гуманизованного антитела против ЕМАРІІ, представленную в любой из SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 5. В различных вариантах осуществления вектор содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую легкую цепь гуманизованного антитела против ЕМАРІІ, представленную в любой из SEQ ID NO: 6 - SEQ ID NO: 11. В различных вариантах осуществления вектор содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую тяжелую цепь гуманизованного антитела против ЕМАРІІ, представленную в любой из SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 5, и легкую цепь гуманизованного антитела против ЕМАРІІ, представленную в любой из SEQ ID NO: 6 - SEQ ID NO: 9. В различных вариантах осуществления нуклеиновая кислота функционально связана с промотором. В различных вариантах осуществления изобретение относится к клетке, трансформированной рекомбинантным вектором. Изобретение дополнительно относится к способу получения тяжелой цепи гуманизованного антитела против ЕМАРІІ, представленной в любой из SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 5, и легкой цепи гуманизованного антитела против ЕМАРІІ, представленной в любой из SEQ ID NO: 6 - SEQ ID NO: 9, включающему

культивирование клеток, трансформированных вектором, в условиях, в которых экспрессируется антитело.

Вкратце, экспрессия природных или синтетических нуклеиновых кислот, кодирующих антитела, обычно достигается путем функционального связывания нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид антитела или его части, с промотором и включения конструкции в экспрессирующий вектор. Векторы могут подходить для репликации и интеграции в эукариотах. Типичные клонирующие векторы включают терминаторы транскрипции и трансляции, последовательности инициации и промоторы, полезные для регуляции экспрессии целевой последовательности нуклеиновой кислоты.

Нуклеиновая кислота может быть клонирована во множество типов векторов. Например, нуклеиновая кислота может быть клонирована в вектор, включающий, без ограничения указанным, плазмиду, фагемиду, производное фага, вирус животных и космиду. Векторы, представляющие особый интерес, включают экспрессирующие векторы, репликационные векторы, векторы для получения зондов и векторы для секвенирования.

Кроме того, экспрессирующий вектор может быть предоставлен клетке в форме вирусного вектора. Технология вирусных векторов хорошо известна в данной области и описана, например, в Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, тома 1-3 (3-е изд., Cold Spring Harbour Press, NY 2001) и в других руководствах по вирусологии и молекулярной биологии. Вирусы, которые можно использовать в качестве векторов, включают, но не ограничиваются ими, ретровирусы, аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, вирусы герпеса и лентивирусы. Как правило, подходящий вектор содержит точку начала репликации, функционирующую по меньшей мере в одном организме, промоторную последовательность, подходящие сайты эндонуклеаз рестрикции и один или более маркеров селекции (например, WO 01/96584; WO 01/29058; и патент США . № 6326193).

Дополнительные промоторные элементы, например энхансеры, регулируют частоту инициации транскрипции. Как правило, они расположены в области 30-110 п.н. выше старт-сайта, хотя недавно было показано, что ряд промоторов также содержит функциональные элементы ниже старт-сайта. Интервал между элементами промотора часто является гибким, так что функция промотора сохраняется, когда элементы инвертированы или перемещены относительно друг друга. В промоторе тимидинкиназы (tk) расстояние между промоторными элементами может быть увеличено до 50 п.н., прежде чем активность начнет снижаться. В зависимости от промотора оказывается, что отдельные элементы могут функционировать совместно или независимо для активации транскрипции.

Примером промотора является промотор EF1 α . Дополнительный пример включает последовательность немедленно раннего промотора цитомегаловируса (CMV). Эта промоторная последовательность является сильной конститутивной промоторной последовательностью, способной стимулировать высокие уровни экспрессии любой

полинуклеотидной последовательности, функционально связанной с ней. Однако могут также использоваться другие последовательности конститутивных промоторов, включая, без ограничения указанным, ранний промотор обезьяньего вируса 40 (SV40), вирус опухоли молочной железы мыши (MMTV), промотор длинного концевой повтора (LTR) вируса иммунодефицита человека (HIV), промотор MoMuLV, промотор вируса птичьего лейкоза, немедленно-ранний промотор вируса Эпштейна-Барра, промотор вируса саркомы Рауса, а также промоторы генов человека, такие как, без ограничения указанным, промотор актина, промотор миозина, промотор гемоглобина и промотор креатинкиназы. Кроме того, изобретение не должно быть ограничено применением конститутивных промоторов. Индуцируемые промоторы также рассматриваются как часть изобретения. Использование индуцируемого промотора обеспечивает молекулярный переключатель, способный включать экспрессию полинуклеотидной последовательности, с которой он функционально связан, когда такая экспрессия желательна, или выключать экспрессию, когда экспрессия нежелательна. Примеры индуцируемых промоторов включают, без ограничения указанным, металлотиониновый промотор, глюкокортикоидный промотор, прогестероновый промотор и тетрациклиновый промотор.

Чтобы оценить экспрессию полипептида антитела или его частей, экспрессирующий вектор, который должен быть введен в клетку, может также содержать либо ген маркера селекции, либо репортерный ген, либо и то, и другое для облегчения идентификации и отбора экспрессирующих клеток из популяции клеток, которые предположительно трансфицированы или инфицированы с помощью вирусных векторов. В других аспектах отдельный фрагмент ДНК может быть носителем маркера селекции и использован в процедуре котрансфекции. Как маркеры селекции, так и репортерные гены могут быть фланкированы соответствующими регуляторными последовательностями для обеспечения экспрессии в клетках-хозяевах. Полезные маркеры селекции включают, например, гены устойчивости к антибиотикам, такие как нео и т. п.

Репортерные гены используются для идентификации потенциально трансфицированных клеток и для оценки функциональности регуляторных последовательностей. Как правило, репортерный ген представляет собой ген, который не присутствует или не экспрессируется организмом или тканью реципиента и который кодирует полипептид, экспрессия которого проявляется в некотором легко детектируемом свойстве, например, ферментативной активности. Экспрессию репортерного гена анализировали в подходящее время после введения ДНК в клетки реципиента. Подходящие репортерные гены могут включать гены, кодирующие люциферазу, бета-галактозидазу, хлорамфениколацетилтрансферазу, секретируемую щелочную фосфатазу или ген зеленого флуоресцентного белка (например, Ui-Tei et al., 2000 FEBS Letters 479: 79-82). Подходящие системы экспрессии хорошо известны и могут быть получены с использованием известных методов или получены коммерчески. В целом, конструкция с минимальной 5'-фланкирующей областью, показывающая самый высокий уровень экспрессии репортерного гена, идентифицируется как промотор. Такие промоторные

области могут быть связаны с репортерным геном и использоваться для оценки агентов на способность модулировать управляемую промотором транскрипцию.

Способы введения и экспрессии генов в клетке известны в данной области. В контексте экспрессирующего вектора вектор может быть легко введен в клетку-хозяин, например в клетку млекопитающего, бактерии, дрожжей или насекомого, любым способом, известным в данной области. Например, экспрессирующий вектор может быть перенесен в клетку-хозяин физическим, химическим или биологическим способом.

Физические способы введения полинуклеотида в клетку-хозяин включают осаждение с фосфатом кальция, липофекцию, бомбардировку частицами, микроинъекцию, электропорацию и т. п. Способы получения клеток, содержащих векторы и/или экзогенные нуклеиновые кислоты, хорошо известны в данной области. См., например, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, тома 1-3 (3-е изд., Cold Spring Harbour Press, NY 2001).

Биологические способы введения интересующего полинуклеотида в клетку-хозяин включают применение векторов на основе ДНК и РНК. Вирусные векторы и особенно ретровирусные векторы стали наиболее широко используемым способом для встраивания генов в клетки млекопитающих, например в клетки человека. Другие вирусные векторы могут быть получены из лентивирусов, поксвирусов, вируса простого герпеса I, аденовирусов и аденоассоциированных вирусов и т. п. см., например, патент США No. 5350674 и 5585362.

Химические средства для введения полинуклеотида в клетку-хозяина включают коллоидные дисперсионные системы, такие как макромолекулярные комплексы, нанокапсулы, микросферы, гранулы и системы на основе липидов, включая эмульсии масло-в-воде, мицеллы, смешанные мицеллы и липосомы. Типичной коллоидной системой для применения в качестве средства доставки *in vitro* и *in vivo* является липосома (например, везикула с искусственной мембраной).

В случае, когда используется невирусная система доставки, примерным средством доставки является липосома. Предполагается применение липидных составов для введения нуклеиновых кислот в клетку-хозяин (*in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*). В другом аспекте нуклеиновая кислота может быть связана с липидом. Нуклеиновая кислота, связанная с липидом, может быть инкапсулирована в водной внутренней части липосомы, помещена в липидный бислой липосомы, присоединена к липосоме через связывающую молекулу, которая связана как с липосомой, так и с олигонуклеотидом, захваченным в липосому, образует комплекс с липосомой, диспергируется в растворе, содержащем липид, смешивается с липидом, объединяется с липидом, содержится в виде суспензии в липиде, содержится или образует комплекс с мицеллой, или иным образом связана с липидом. Композиции, связанные с липидом, липидом/ДНК или липидом/экспрессирующим вектором, не ограничиваются какой-либо конкретной структурой в растворе. Например, они могут присутствовать в двухслойной структуре, в виде мицелл или в «свернутой» структуре. Они также могут просто помещаться в раствор,

возможно, образуя агрегаты, которые не являются однородными по размеру или форме. Липиды представляет собой жирные вещества, которые могут встречаться в природе или синтетические липиды. Например, липиды включают жировые капли, которые естественным образом встречаются в цитоплазме, а также класс соединений, которые содержат длинноцепочечные алифатические углеводороды и их производные, такие как жирные кислоты, спирты, амины, аминспирты и альдегиды.

Липиды, пригодные для применения, могут быть получены из коммерческих источников. Например, димиристилфосфатидилхолин («DMPC») может быть получен от Sigma, Сент-Луис, Миссури; дицетилфосфат («DCP») может быть получен от K&K Laboratories (Plainview, NY); холестерин («Choi») может быть получен от Calbiochem-Behring; димиристилфосфатидилглицерин («DMPG») и другие липиды можно получить от Avanti Polar Lipids, Inc. (Бирмингем, Алабама). Исходные растворы липидов в хлороформе или хлороформе/метаноле можно хранить при температуре примерно -20°C . Хлороформ используется в качестве единственного растворителя, поскольку он легче испаряется, чем метанол. «Липосома» является общим термином, охватывающим множество одно- и многослойных липидных носителей, образованных путем образования замкнутых липидных бислоев или агрегатов. Липосомы могут быть охарактеризованы как имеющие везикулярные структуры с фосфолипидной двухслойной мембраной и внутренней водной средой. Мультиламеллярные липосомы имеют несколько липидных слоев, разделенных водной средой. Они образуются спонтанно, когда фосфолипиды суспендируют в избытке водного раствора. Липидные компоненты подвергаются самоорганизации перед образованием замкнутых структур и захватывают воду и растворенные растворы между липидными бислоями (Ghosh et al., 1991 *Glycobiology* 5: 505-10). Однако также охвачены композиции, которые имеют структуры в растворе, отличные от нормальной везикулярной структуры. Например, липиды могут иметь мицеллярную структуру или просто существовать в виде неоднородных агрегатов молекул липидов. Также рассматриваются комплексы липофектамин-нуклеиновая кислота.

В различных вариантах осуществления изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей антитело и по меньшей мере одно фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество. Фармацевтическая композиция может быть представлена в любой форме, подходящей для доставки антитела пациенту, и особенности фармацевтической композиции будут варьироваться в зависимости от показания, для которого она предназначена. Примеры подходящих фармацевтических вспомогательных веществ раскрыты в настоящем описании в другом месте.

Метод лечения заболевания

ЕМАРП ассоциируется с поражением легких, вызванным сигаретным дымом, а также с поражением легких в целом. Как показано на ФИГ. 1-8, антитела по изобретению связывают как про-, так и зрелый ЕМАРП. Соответственно, в различных вариантах осуществления изобретение относится к способу лечения хронического обструктивного заболевания легких (COPD), в частности эмфиземы, у пациента, включающий введение

пациенту гуманизованного антитела против ЕМАРЦ, как описано в настоящем документе, в фармацевтическом составе.

В различных вариантах осуществления изобретение относится к способу лечения эмфиземы у пациента, включающему введение пациенту гуманизованного антитела против ЕМАРЦ, как описано в настоящем документе, в фармацевтической композиции.

В различных вариантах осуществления изобретение относится к способу лечения острого поражения легких у пациента, включающему введение пациенту гуманизованного антитела против ЕМАРЦ, как описано в настоящем документе, в фармацевтической композиции.

В различных вариантах осуществления изобретение относится к способу лечения бронхолегочной дисплазии у пациента, включающему введение пациенту гуманизованного антитела против ЕМАРЦ, как описано в настоящем документе, в фармацевтической композиции.

Антитело против ЕМАРЦ, описанное в настоящем документе, связывается и снижает уровень ЕМАРЦ, доступного для взаимодействия с клетками-мишенями. Соответственно, в различных вариантах осуществления изобретение относится к способу лечения опосредованного ЕМАРЦ заболевания у пациента, причем способ включает введение пациенту гуманизованного антитела против ЕМАРЦ, как описано в настоящем документе, в фармацевтической композиции.

Введение/Дозировка/Составы

Введение соединений и/или композиций по настоящему изобретению пациенту, предпочтительно млекопитающему, более предпочтительно человеку, может осуществляться с использованием известных процедур в дозах и в течение периодов времени, эффективных для лечения предполагаемого заболевания. Эффективное количество терапевтического соединения, необходимое для лечения предполагаемого заболевания, может варьироваться в зависимости от таких факторов, как состояние заболевания или расстройства у пациента; возраст, пол и вес пациента; и оборудование, используемое для детектирования соединения по изобретению. Специалист в данной области сможет изучить соответствующие факторы и определить эффективное количество терапевтического соединения без излишнего экспериментирования.

Фактические уровни дозировки активных ингредиентов в фармацевтических композициях по настоящему изобретению можно варьировать, чтобы получить количество активного ингредиента, эффективное для достижения лечения конкретного пациента, композиции и способа введения, не оказывающего токсического воздействия на пациента.

В некоторых вариантах осуществления композиции по изобретению приготовлены с использованием одного или более фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ или носителей. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции по изобретению содержат эффективное количество соединения по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

Носитель может быть растворителем или дисперсионной средой, содержащей например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль, и жидкий полиэтиленгликоль и т. п.), их подходящие смеси, и растительные масла. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, с помощью покрытия, такого как лецитин, поддерживая требуемый размер частиц в случае диспергирования и используя поверхностно-активные вещества. Предотвращение действия микроорганизмов может быть достигнуто различными антибактериальными и противогрибковыми средствами, например парабенами, хлорбутанолом, фенолом, аскорбиновой кислотой, тимеросалом и т. п. Во многих случаях предпочтительно включать в композицию изотонические агенты, например сахара, хлорид натрия или многоатомные спирты, такие как маннит и сорбит. Пролонгированное всасывание инъекционных композиций может быть вызвано включением в композицию агента, замедляющего всасывание, например моностеарата алюминия или желатина.

Соединения по изобретению для введения могут присутствовать в диапазоне от примерно 1 мкг до примерно 10000 мкг, от примерно 20 мкг до примерно 9500 мкг, от примерно 40 мкг до примерно 9000 мкг, от примерно 75 мкг до примерно 8500 мкг, от примерно 150 мкг до примерно 7500 мкг, от примерно 200 мкг до примерно 7000 мкг, от примерно 3050 мкг до примерно 6000 мкг, от примерно 500 мкг до примерно 5000 мкг, от примерно 750 мкг до примерно 4000 мкг, от примерно 1 мг до примерно 3000 мг, от примерно 10 мг до примерно 2500 мг, от примерно 20 мг до примерно 2000 мг, от примерно 25 мг до примерно 1500 мг, от примерно 30 мг до примерно 1000 мг, от примерно 40 мг до примерно 900 мг, от примерно 50 мг до примерно 800 мг, от примерно 60 мг до примерно 750 мг, примерно от 70 мг до примерно 600 мг, от примерно 80 мг до примерно 500 мг и любые и все полные или частичные интервалы между ними.

В некоторых вариантах осуществления доза соединения по изобретению составляет от примерно 1 мг до примерно 2500 мг. В некоторых вариантах осуществления доза соединения по изобретению, используемого в композициях, описанных в настоящем документе, составляет менее примерно 10000 мг, или менее примерно 8000 мг, или менее примерно 6000 мг, или менее примерно 5000 мг, или менее примерно 3000 мг, или менее примерно 2000 мг, или менее примерно 1000 мг, или менее примерно 500 мг, или менее примерно 200 мг, или менее примерно 50 мг. Аналогичным образом, в некоторых вариантах осуществления доза второго соединения, как описано в настоящем документе, составляет менее примерно 1000 мг, или менее примерно 800 мг, или менее примерно 600 мг, или менее примерно 500 мг, или менее примерно 400 мг, или менее примерно 300 мг, или менее примерно 200 мг, или менее примерно 100 мг, или менее примерно 50 мг, или менее примерно 40 мг, или менее примерно 30 мг, или менее примерно 25 мг, или менее примерно 20 мг, или менее примерно 15 мг, или менее примерно 10 мг, или менее примерно 5 мг, или менее примерно 2 мг, или менее примерно 1 мг, или менее примерно 0,5 мг, а также любые и все их полные или частичные интервалы.

Составы можно использовать в смесях с обычными вспомогательными

веществами, т. е. фармацевтически приемлемыми органическими или неорганическими веществами-носителями, подходящими для перорального, парентерального, назального, внутривенного, подкожного, энтерального или любого другого подходящего способа введения, известного в данной области техники. Фармацевтические препараты могут быть стерилизованы и при желании смешаны со вспомогательными агентами, например, смазывающими веществами, консервантами, стабилизаторами, смачивающими агентами, эмульгаторами, солями для воздействия на буферы осмотического давления, красителями, вкусовыми и/или ароматическими веществами и т. п.

Пути введения любой из композиций по изобретению включают пероральный, назальный, ректальный, интравагинальный, парентеральный, трансбуккальный, подъязычный или местный. Соединения для применения в изобретении могут быть приготовлены для введения любым подходящим путем, как например, перорально или парентерально, например, чрескожно, чрезслизисто (например, подъязычно, лингвально, (транс)буккально, (транс)уретрально, вагинально (например, транс- и перивагинально), (интра)назально и (транс)ректально), интравезикулярно, внутрилегочно, интрадуоденально, внутрижелудочно, интратекально, подкожно, внутримышечно, внутрикожно, внутриартериально, внутривенно, внутрибронхиально, ингаляционно и местно.

Подходящие композиции и лекарственные формы включают, например, таблетки, капсулы, каплеты, пилюли, желатиновые капсулы, пастилки, дисперсии, суспензии, растворы, сиропы, гранулы, микросферы, чрескожные пластыри, гели, порошки, пеллеты, магмы, леденцы, кремы, пасты, пластыри, лосьоны, диски, суппозитории, жидкие спреи для назального или перорального введения, сухие порошкообразные или аэрозольные составы для ингаляции, композиции и составы для интравезикулярного введения и т. п. Следует понимать, что составы и композиции, которые можно было бы использовать в настоящем изобретении, не ограничиваются конкретными составами и композициями, описанными в настоящем документе.

Парентеральное введение

Используемый в настоящем описании термин «парентеральное введение» фармацевтической композиции включает любой способ введения, характеризующийся физическим преодолением ткани пациента и введением фармацевтической композиции через разрыв ткани. Таким образом, парентеральное введение включает, но не ограничивается этим, введение фармацевтической композиции путем инъекции композиции, путем нанесения композиции через хирургический разрез, путем нанесения композиции через проникающую в ткань нехирургическую рану и т. п. В частности, предполагается, что парентеральное введение включает, но не ограничивается ими, подкожную, внутривенную, внутрибрюшинную, внутримышечную, интратермальную инъекцию и диалитическую инфузию почек.

Составы фармацевтической композиции, подходящие для парентерального введения, содержат активный ингредиент в сочетании с фармацевтически приемлемым

носителем, таким как стерильная вода или стерильный изотонический солевой раствор. Такие составы могут быть приготовлены, упакованы или проданы в форме, пригодной для болюсного введения или для непрерывного введения. Препараты для инъекций могут быть приготовлены, упакованы или проданы в стандартной лекарственной форме, например, в ампулах или в контейнерах с несколькими дозами, содержащими консервант. Составы для парентерального введения включают, но не ограничиваются ими, суспензии, растворы, эмульсии в масляных или водных носителях, пасты и имплантируемые составы с замедленным высвобождением или биодеградируемые составы. Такие составы могут дополнительно содержать один или более дополнительных ингредиентов, включая, но не ограничиваясь ими, суспендирующие, стабилизирующие или диспергирующие агенты. В некоторых вариантах осуществления состава для парентерального введения активный ингредиент предоставляется в сухой (т. е. порошковой или гранулированной) форме для восстановления подходящим носителем (например, стерильной апиrogenной водой) перед парентеральным введением восстановленной композиции.

Фармацевтические композиции могут быть приготовлены, упакованы или проданы в форме стерильной водной или масляной суспензии или раствора для инъекций. Эта суспензия или раствор могут быть приготовлены в соответствии с известным уровнем техники и могут содержать, помимо активного ингредиента, дополнительные ингредиенты, такие как диспергирующие агенты, смачивающие агенты или суспендирующие агенты, описанные в настоящем документе. Такие стерильные составы для инъекций могут быть приготовлены с использованием нетоксичного приемлемого для парентерального введения разбавителя или растворителя, такого как, например, вода или 1,3-бутандиол. Другие приемлемые разбавители и растворители включают, но не ограничиваются ими, раствор Рингера, изотонический раствор хлорида натрия и нелетучие масла, такие как синтетические моно- или диглицериды. Другие пригодные для парентерального введения композиции включают те, которые содержат активный ингредиент в микрокристаллической форме, в липосомном препарате или в качестве компонента биодеградируемой полимерной системы. Композиции для пролонгированного высвобождения или имплантации могут содержать фармацевтически приемлемые полимерные или гидрофобные материалы, такие как эмульсия, ионообменная смола, труднорастворимый полимер или труднорастворимая соль.

Дополнительные формы введения

Дополнительные лекарственные формы по настоящему изобретению включают лекарственные формы, как описано в патентах США №. 6340475; 6488962; 6451808; 5972389; 5582837; и 5007790. Дополнительные лекарственные формы по настоящему изобретению также включают лекарственные формы, как описано в патентных заявках США №№ 2003/0147952; 2003/0104062; 2003/0104053; 2003/0044466; 2003/0039688; и 2002/0051820. Дополнительные лекарственные формы по настоящему изобретению также включают лекарственные формы, как описано в заявках PCT № WO 03/35041; WO 03/35040; WO 03/35029; WO 03/35177; WO 03/35039; WO 02/96404; WO 02/32416; WO

01/97783; WO 01/56544; WO 01/32217; WO 98/55107; WO 98/11879; WO 97/47285; WO 93/18755; и WO 90/11757.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ПРИМЕРЫ

Далее изобретение подробно описано со ссылкой на следующие экспериментальные примеры. Эти примеры представлены только в целях иллюстрации и не предназначены для ограничения, если не указано иное. Таким образом, изобретение никоим образом не следует рассматривать как ограниченное следующими примерами, а скорее следует рассматривать как охватывающее любые и все варианты, которые становятся очевидными в результате представленной в настоящем описании информации.

Без дополнительного описания предполагается, что специалист в данной области может, используя предыдущее описание и следующие иллюстративные примеры, применить на практике заявленные способы настоящего изобретения. Следовательно, следующие рабочие примеры конкретно указывают на предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения и не должны рассматриваться как ограничивающие каким-либо образом оставшуюся часть описания.

Пример 1:

Клонирование и секвенирование переменных и константных областей IgG гибридомы крысы

Быструю амплификацию концов кДНК (RACE) проводили для амплификации ДНК для областей VH и VL, CH и CL. Положительные клоны идентифицировали с помощью гель-электрофореза. Положительную ДНК клонировали и секвенировали. Анализировали последовательности ДНК и аминокислот для переменных и константных областей IgG.

Дизайн гуманизации родительского антитела проводили с использованием анализов *in silico*. Процесс гуманизации начинается с создания трехмерной структуры антитела, смоделированного по гомологии, и создания профиля родительского антитела на основе моделирования структуры. Используемые акцепторные каркасы идентифицировали на основании общей идентичности последовательностей в каркасе, совпадения положения интерфейса, сходных классифицированных канонических положений CDR и присутствия сайтов N-гликозилирования, которые необходимо было удалить. Для дизайна гуманизации выбирали два каркаса легкой цепи (LC) и два каркаса тяжелой цепи (HC).

Гуманизованные антитела конструировали путем создания нескольких гибридных последовательностей, в которых слиты выбранные части последовательности родительского антитела с последовательностями каркаса человека. Используя трехмерную модель, эти гуманизованные последовательности методично анализировали с помощью визуального и компьютерного моделирования, чтобы выделить последовательности, которые, скорее всего, сохраняют связывание с антигеном. Цель состояла в том, чтобы максимизировать количество человеческой последовательности в конечных гуманизованных антителах, сохраняя при этом исходную специфичность антитела.

Три гуманизованные легкие цепи и пять гуманизованных тяжелых цепей

конструировали на основе двух различных человеческих акцепторных каркасов тяжелых и легких цепей (см. Таблицу 1). HC1 и LC1 используют первый соответствующий каркас и содержат в наибольшей степени человеческую последовательность с минимальной последовательностью каркаса родительского антитела. HC2, HC3 и LC2 используют тот же каркас, что и раньше, но содержат дополнительные родительские последовательности. HC4, HC5, LC3 и LC4 используют второй соответствующий каркас, а также содержат дополнительные родительские последовательности, слитые с каркасом человека.

Таблица 1: Информационная таблица гуманизованных цепей

Название цепи	Тип цепи	Акцепторный каркас
H4423 (химерная родительская) SEQ ID NO: 10	Тяжелая цепь	
L4423 (химерная родительская) SEQ ID NO: 11	Легкая цепь	
H4424 (Гуманизованная HC 1) SEQ ID NO: 1	Тяжелая цепь	HC каркас 1
H4425 (Гуманизованная HC 2) SEQ ID NO: 2	Тяжелая цепь	HC каркас 1
H4426 (Гуманизованная HC 3) SEQ ID NO: 3	Тяжелая цепь	HC каркас 1
H4427 (Гуманизованная HC 4) SEQ ID NO: 4	Тяжелая цепь	HC каркас 2
H4428 (Гуманизованная HC 5) SEQ ID NO: 5	Тяжелая цепь	HC каркас 2
L4424 (Гуманизованная LC 1) SEQ ID NO: 6	Легкая цепь	LC каркас 1
L4425 (Гуманизованная LC 2) SEQ ID NO: 7	Легкая цепь	LC каркас 1
L4426 (Гуманизованная LC 3) SEQ ID NO: 8	Легкая цепь	LC каркас 2
L4427 (Гуманизованная LC 4) SEQ ID NO: 9	Легкая цепь	LC каркас 2

Расчет показателей гуманизации гуманизованных цепей

Показатели гуманизации для моноклональных антител рассчитывали в соответствии с Gao, S.H., Huang, K., Tu, H., and Adler, A.S. 2013, Monoclonal antibody humanness score and its applications. BMC Biotechnology, 13:55. Эта оценка показывает, насколько имеет сходство с человеческой последовательностью варибельной области антитела с точки зрения пониженной антигенности у человека, что является важным фактором при гуманизации антител. Показатели гуманизации для родительских и гуманизованных антител показаны ниже. На основании этого метода для тяжелых цепей оценка 79 или выше указывает на антитело, подобное человеческому, с точки зрения его антигенности; для легких каппа-цепей показатель 86 или выше указывает на антитело, подобное человеческому, с точки зрения его антигенности.

Таблица 2: Показатели гуманизации тяжелых цепей

VH	Полноразмерная (каркас+CDR) порог=79	Только каркас порог=84
Родительская H4423	74	74

SEQ ID NO: 10		
H4424 SEQ ID NO: 1	87,9	91,5
H4425 SEQ ID NO: 2	85,4	87,9
H4426 SEQ ID NO: 3	84,5	86,6
H4427 SEQ ID NO: 4	85,6	89,3
H4428 SEQ ID NO: 5	85,5	88,3

Таблица 3: Показатели гуманизации легких цепей

VL	Полноразмерная (каркас+CDR) порог=86	Только каркас порог=90
Родительская L4423 SEQ ID NO: 11	76	81,9
L4424 SEQ ID NO: 6	88,3	98,7
L4425 SEQ ID NO: 7	87,6	98,7
L4426 SEQ ID NO: 8	88,2	99,3
L4427 SEQ ID NO: 9	87,4	98,3

Конструирование гуманизированных антител

Полноразмерные гены антител конструировали, сначала синтезируя последовательности вариабельной области. Последовательности оптимизировали для экспрессии в клетках млекопитающих. Эти последовательности вариабельной области затем клонировали в экспрессирующие векторы, которые уже содержат Fc-домены человека. Кроме того, для сравнения вариабельные области исходных тяжелых и легких цепей конструировали как полноразмерные химерные цепи с использованием тех же последовательностей Fc остова.

Мелкомасштабное производство

Гуманизированные антитела получали в масштабе производства 0, 03 литра. Химерное родительское антитело также масштабировали для повышенного производства для прямого сравнения. Плазмиды для указанных тяжелых и легких цепей трансфецировали в клетки HEK293 в суспензии с использованием среды с определенным химическим составом в отсутствие сыворотки для получения антител. В частности, последовательности антител синтезировали с генов и клонированы в запатентованный экспрессирующий вектор pLEV123. Цельные антитела в кондиционированных средах очищали с использованием среды MabSelectSuRe Protein A (GE Healthcare).

Таблица 3: Антитела, транзиторно продуцируемые в клетках HEK293.

Антитело:	Тяжелая цепь	Легкая цепь	Титр (мг/л)
Химерное родительское	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 11	20
Гуманизированное HC1+LC1	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 6	41
Гуманизированное HC1+LC2	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 7	42
Гуманизированное HC1+LC3	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 8	37
Гуманизированное HC1+LC4	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 9	36
Гуманизированное HC2+LC1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 6	35
Гуманизированное	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 7	39

HC2+LC2			
Гуманизированное HC2+LC3	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 8	38
Гуманизированное HC2+LC4	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 9	41
Гуманизированное HC3+LC1	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 6	52
Гуманизированное HC3+LC2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 7	39
Гуманизированное HC3+LC3	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 8	45
Гуманизированное HC3+LC4	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 9	46
Гуманизированное HC4+LC1	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 6	53
Гуманизированное HC4+LC2	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 7	51
Гуманизированное HC4+LC3	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 8	41
Гуманизированное HC4+LC4	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 9	45
Гуманизированное HC5+LC1	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6	56
Гуманизированное HC5+LC2	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 7	46
Гуманизированное HC5+LC3	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 8	46
Гуманизированное HC5+LC4	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 9	56

ИФА связывания гуманизированных антител

Проводили дозозависимый ИФА связывания 20 гуманизированных антител, химерного родительского антитела и крысиного родительского антитела. На планшет для ИФА наносили покрытие в виде человеческого pro-EMAPII в фосфатно-солевом буфере (PBS) в концентрации 2 мкг/мл при 4°C в течение ночи. Все антитела разводили 7-точечным 4-кратным серийным разведением, начиная с 10 мкг/мл с использованием 0,05% фосфатно-солевого буфера с твином (PBST), последней точкой является только PBST. Антитела инкубировали на предварительно блокированных планшетах для ИФА в течение 1,5 часов с последующим 3-кратным промыванием 0,05% PBST. Вторичное антитело (конъюгированное с пероксидазой хрена (HRP) антитело против человеческого IgG Fc или конъюгированное с пероксидазой хрена (HRP) антитело против крысиного IgG Fc) разбавляли в 5000 раз разбавителем для анализа HRP и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем планшет промывали 4 раза и добавляли субстрат ТМВ. Окрашивание проявлялось при комнатной температуре в течение 5 минут, после чего реакцию останавливали добавлением 1 N HCl. Кривые связывания показаны на ФИГ. 1-4.

Связывание с pro- и зрелым EMAPII

Проводили дозозависимый ИФА связывания 20 антител, и результаты показаны на

ФИГ. 5-8. Покрытие антигеном соответствовало 2 мкг/мл при 4°C в течение ночи. Блокирование 2% BSA в PBS, комнатная температура 1,5 часа. Первичную инкубацию проводили при комнатной температуре в течение 1 часа при концентрации 10 мкг/мл в разведении 1:4. Детектирующее антитело представляло собой козье антитело против белка человека для гуманизированных и химерных антител; Козье-анти-крысиное для Родительских крысиных антител. КТ 1 час (разведение 1:10000).

Список пронумерованных вариантов осуществления

Вариант осуществления 1. Гуманизированное антитело против эндотелиального моноцитактивирующего полипептида II (анти-EMAPII), содержащее:

вариабельный домен тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, имеющую 90% или больше идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 5; и

вариабельный домен легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, имеющую 90% или больше идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 6 - SEQ ID NO: 9.

Вариант осуществления 2. Антитело в соответствии с вариантом осуществления 1, где вариабельный домен тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность, имеющую 95% или больше идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 5; и

вариабельный домен легкой цепи имеет аминокислотную последовательность, имеющую 95% или больше идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 6 - SEQ ID NO: 9.

Вариант осуществления 3. Антитело в соответствии с вариантом осуществления 1, где вариабельный домен тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность, имеющую 99% или больше идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3; и

вариабельный домен легкой цепи имеет аминокислотную последовательность, имеющую 99% или больше идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 9.

Вариант осуществления 4. Гуманизированное антитело против эндотелиального моноцитактивирующего полипептида II (анти-EMAPII), содержащее вариабельный домен тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, имеющую 90% или больше идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 5.

Вариант осуществления 5. Антитело в соответствии с вариантом осуществления 4, где вариабельный домен тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность, имеющую 95% или больше идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3.

Вариант осуществления 6. Гуманизированное антитело против эндотелиального моноцитактивирующего полипептида II (анти-EMAPII), содержащее вариабельный домен легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, имеющую 90% или больше

идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 6 - SEQ ID NO: 9.

Вариант осуществления 7. Антитело в соответствии с вариантом осуществления 6, где переменный домен легкой цепи имеет аминокислотную последовательность, имеющую 95% или больше идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 9.

Вариант осуществления 8. Химерное антитело против эндотелиального моноцитактивирующего полипептида II (анти-EMAPII), содержащее переменный домен тяжелой цепи, имеющий 90% или больше идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10, и переменный домен легкой цепи, имеющий 90% или больше идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11.

Вариант осуществления 9. Антитело в соответствии с вариантом осуществления 8, где переменный домен тяжелой цепи имеет 95% или больше идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10, а переменный домен легкой цепи имеет 95% или больше идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11.

Вариант осуществления 10. Рекombинантный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 11.

Вариант 11. Клетка, трансформированная рекombинантным вектором в соответствии с вариантом осуществления 10.

Вариант осуществления 12. Способ получения антитела, включающий культивирование трансформированной клетки в соответствии с вариантом осуществления 11 в условиях, при которых экспрессируется антитело.

Вариант осуществления 13. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-9 и по меньшей мере одно фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

Вариант осуществления 14. Способ лечения хронического обструктивного заболевания легких (COPD) у пациента, включающий введение пациенту фармацевтической композиции в соответствии с Вариантом осуществления 13.

Вариант осуществления 15. Способ лечения эмфиземы у пациента, включающий введение пациенту фармацевтической композиции в соответствии с Вариантом осуществления 13.

Вариант осуществления 16. Способ лечения бронхолегочной дисплазии у пациента, включающий введение пациенту фармацевтической композиции в соответствии с Вариантом осуществления 13.

Вариант осуществления 17. Способ лечения заболевания, опосредованного эндотелиальным моноцитактивирующим полипептидом II (EMAPII) у пациента, включающий введение пациенту фармацевтической композиции в соответствии с вариантом осуществления 13.

Другие варианты осуществления

Перечисление списка элементов в любом определении переменной в данном

документе включает определения этой переменной как любого отдельного элемента или комбинации (или субкомбинации) перечисленных элементов. Перечисление варианта осуществления в настоящем документе включает этот вариант осуществления как любой отдельный вариант осуществления или в комбинации с любыми другими вариантами осуществления или их частями.

Описание каждого патента, патентной заявки и публикации, цитируемых в данном документе, настоящим включено в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме. Хотя настоящее изобретение было раскрыто со ссылкой на конкретные варианты осуществления, очевидно, что другие варианты осуществления и вариации настоящего изобретения могут быть разработаны другими специалистами в данной области без отклонения от истинной сущности и объема изобретения. Предполагается, что прилагаемая формула изобретения включает все такие варианты осуществления и эквивалентные варианты.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Гуманизированное антитело против эндотелиального моноцитактивирующего полипептида II (анти-EMAPII), содержащее:

вариабельный домен тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, имеющую 90% или больше идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 5; и

вариабельный домен легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, имеющую 90% или больше идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 6 - SEQ ID NO: 9.

2. Антитело по п. 1, где вариабельный домен тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность, имеющую 95% или больше идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 5; и

вариабельный домен легкой цепи имеет аминокислотную последовательность, имеющую 95% или больше идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 6 - SEQ ID NO: 9.

3. Антитело по п. 1, где вариабельный домен тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность, имеющую 99% или больше идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3; и

вариабельный домен легкой цепи имеет аминокислотную последовательность, имеющую 99% или больше идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 9.

4. Гуманизированное антитело против эндотелиального моноцитактивирующего полипептида II (анти-EMAPII), содержащее вариабельный домен тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, имеющую 90% или больше идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 5.

5. Антитело по п. 4, где вариабельный домен тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность, имеющую 95% или больше идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3.

6. Гуманизированное антитело против эндотелиального моноцитактивирующего полипептида II (анти-EMAPII), содержащее вариабельный домен легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, имеющую 90% или больше идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 6 - SEQ ID NO: 9.

7. Антитело по п. 6, где вариабельный домен легкой цепи имеет аминокислотную последовательность, имеющую 95% или больше идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 9.

8. Химерное антитело против эндотелиального моноцитактивирующего полипептида II (анти-EMAPII), содержащее вариабельный домен тяжелой цепи, имеющий 90% или больше идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10, и вариабельный домен легкой цепи, имеющий 90% или больше идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11.

9. Антитело по п. 8, где переменный домен тяжелой цепи имеет 95% или больше идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10, и переменный домен легкой цепи имеет 95% или больше идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11.

10. Рекombинантный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 11.

11. Клетка, трансформированная рекомбинантным вектором по п. 10.

12. Способ получения антитела, включающий культивирование трансформированной клетки по п. 11 в условиях, при которых экспрессируется антитело.

13. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из пп. 1-9 и по меньшей мере одно фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

14. Способ лечения хронического обструктивного заболевания легких (COPD) у пациента, включающий введение пациенту фармацевтической композиции по п. 13.

15. Способ лечения эмфиземы у пациента, включающий введение пациенту фармацевтической композиции по п. 13.

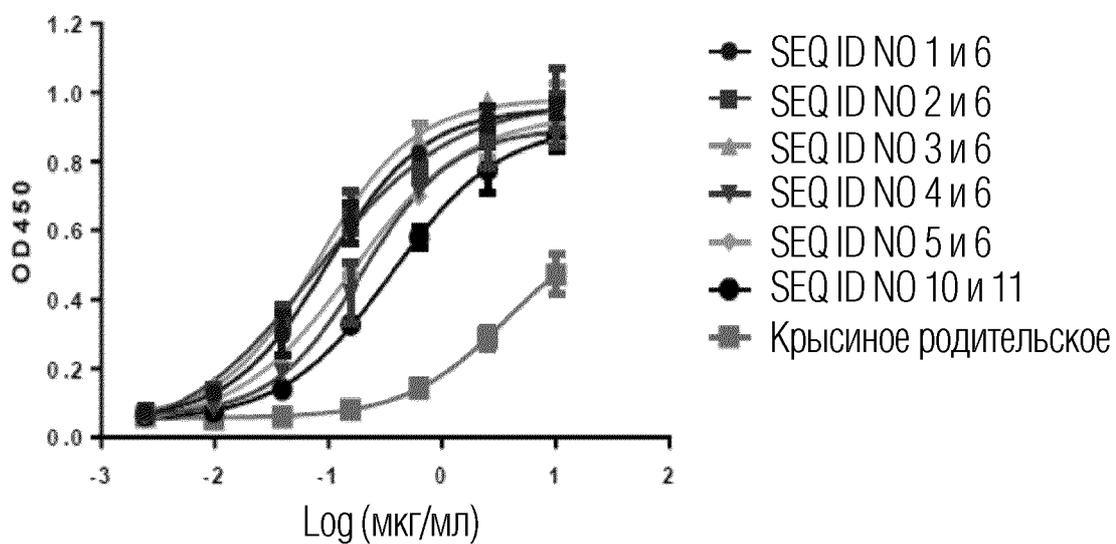
16. Способ лечения бронхолегочной дисплазии у пациента, включающий введение пациенту фармацевтической композиции по п. 13.

17. Способ лечения заболевания, опосредованного эндотелиальным моноцитактивирующим полипептидом II (EMAPII), у пациента, включающий введение пациенту фармацевтической композиции по п. 13.

По доверенности

1/8

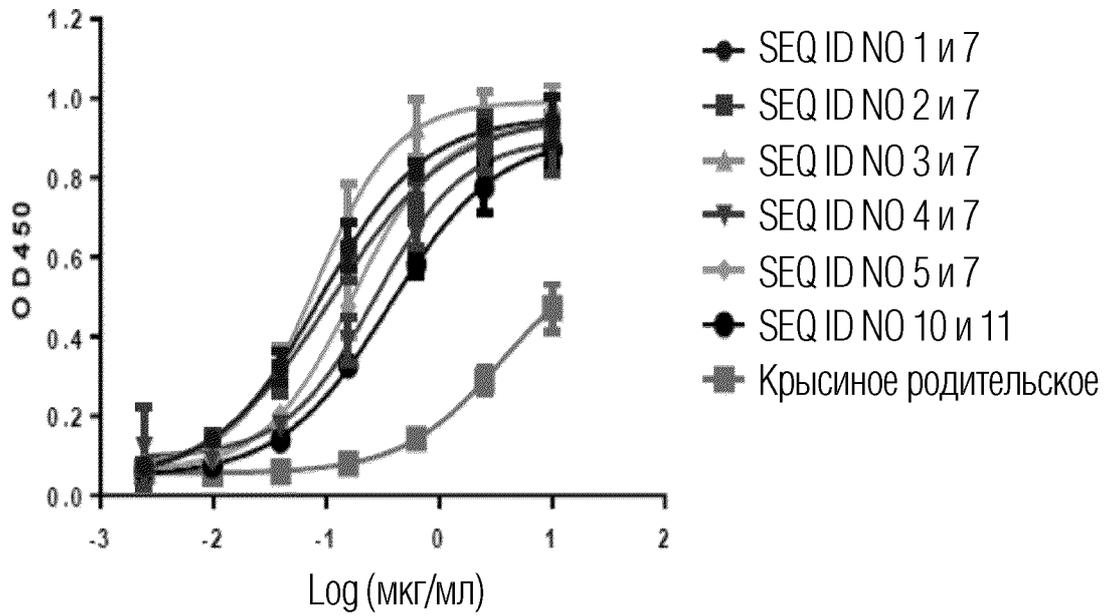
Гуманизированное Ab с LC1



	SEQ ID NO 1 и 6	SEQ ID NO 2 и 6	SEQ ID NO 3 и 6	SEQ ID NO 4 и 6	SEQ ID NO 5 и 6	SEQ ID NO 10 и 11	Крысиное родительское
EC50 (мкг/мл)	0.098	0.076	0.082	0.198	0.163	0.361	3.605

ФИГ. 1

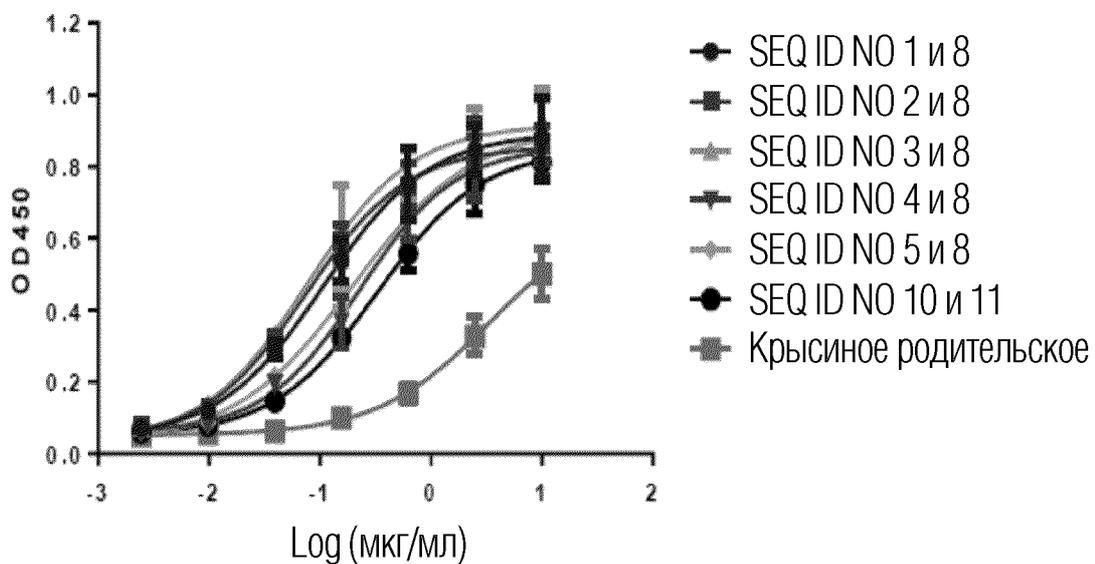
Гуманизированное Ab с LC2



	SEQ ID NO 1 и 7	SEQ ID NO 2 и 7	SEQ ID NO 3 и 7	SEQ ID NO 4 и 7	SEQ ID NO 5 и 7	SEQ ID NO 10 и 11	Крысиное родительское
EC50 (мкг/мл)	0.089	0.112	0.081	0.271	0.170	0.361	3.605

ФИГ. 2

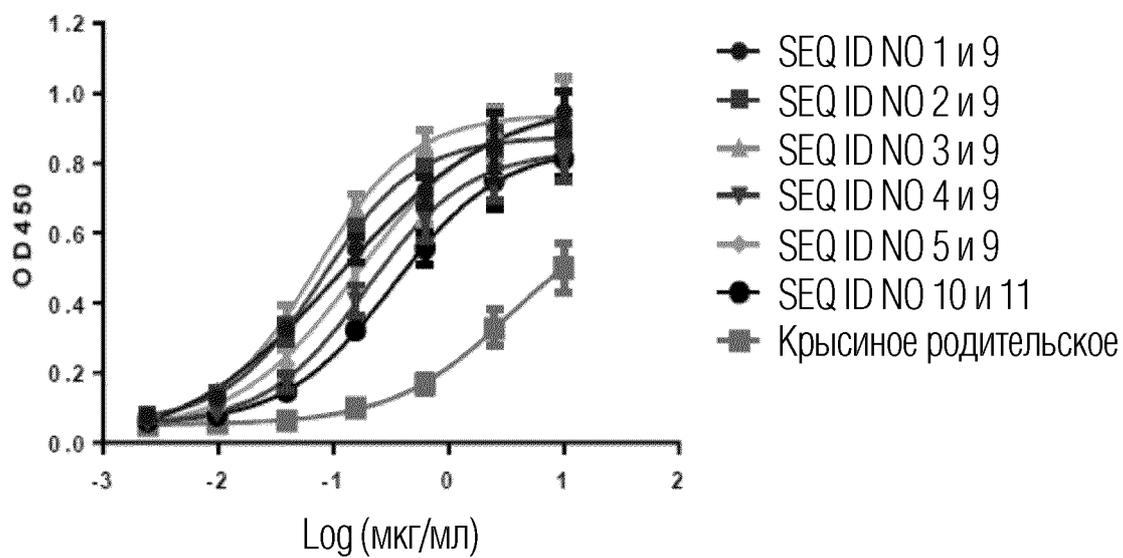
Гуманизированное Ab с LC3



	SEQ ID NO 1 и 8	SEQ ID NO 2 и 8	SEQ ID NO 3 и 8	SEQ ID NO 4 и 8	SEQ ID NO 5 и 8	SEQ ID NO 10 и 11	Крысиное родительское
EC50 (мкг/мл)	0.108	0.075	0.077	0.229	0.200	0.329	3.390

ФИГ. 3

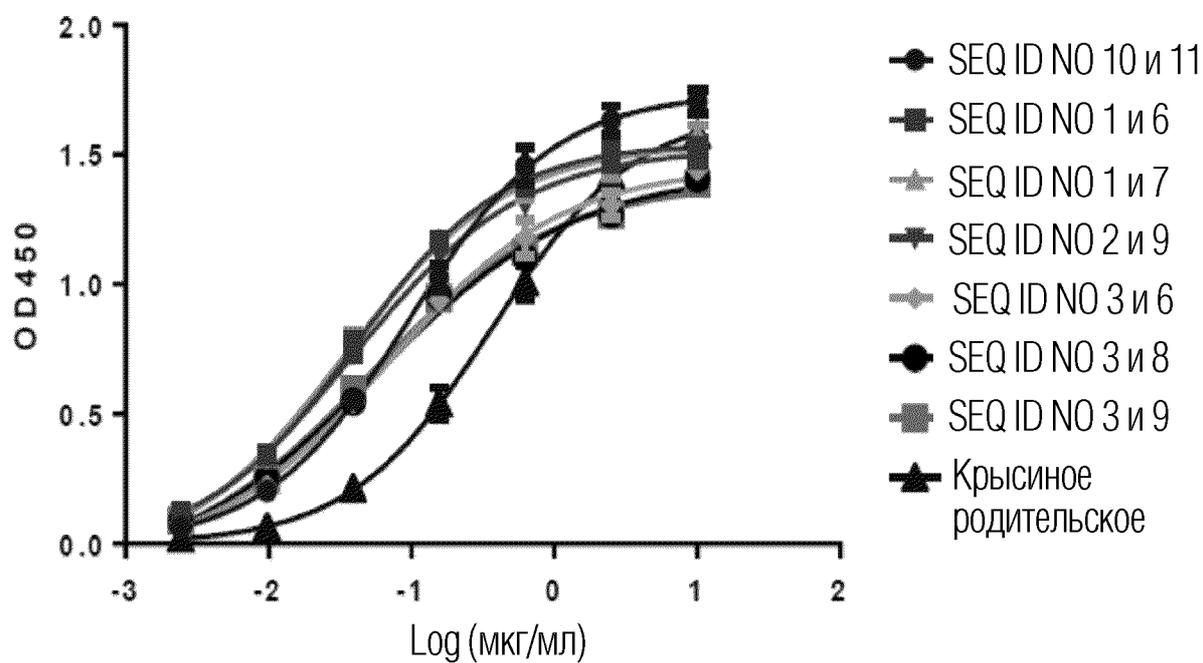
Гуманизированное Ab с LC4



	SEQ ID NO 1 и 9	SEQ ID NO 2 и 9	SEQ ID NO 3 и 9	SEQ ID NO 4 и 9	SEQ ID NO 5 и 9	SEQ ID NO 10 и 11	Крысиное родительское	
EC50 (мкг/мл)	0.113	0.078	0.070	0.197	0.166	0.329	3.390	

ФИГ. 4

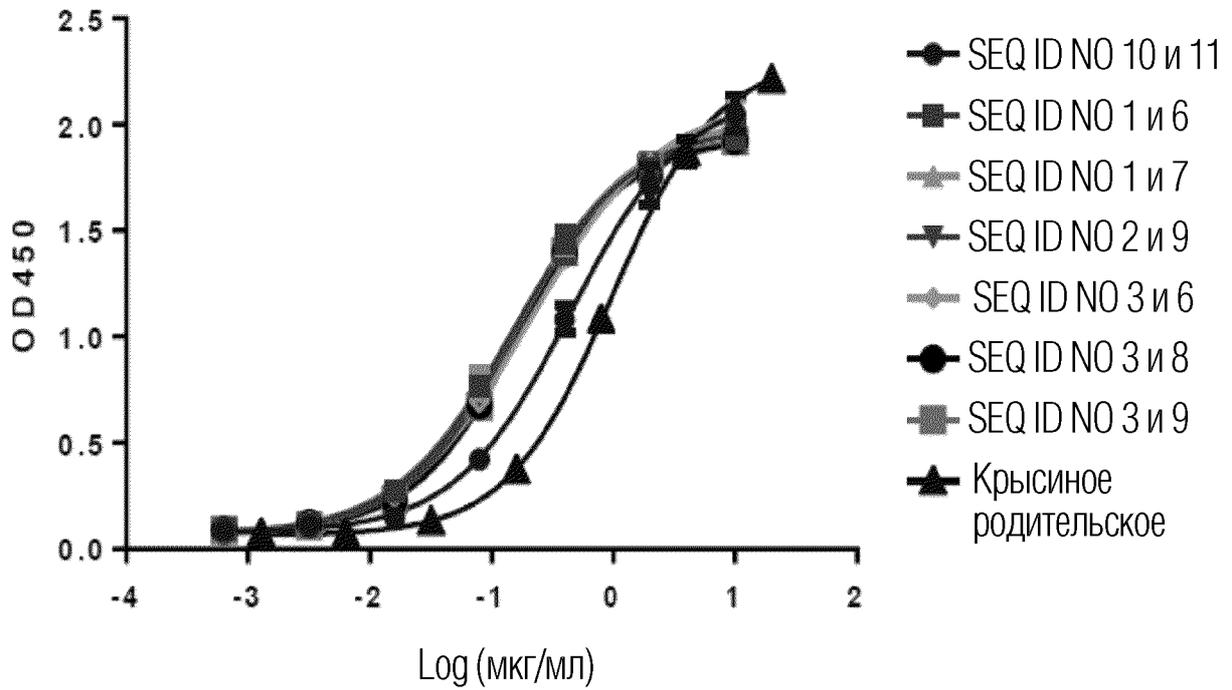
Человеческий про-EMAPII



Антитело	EC50 (мкг/мл)
SEQ ID NO 10 и 11	0.097
SEQ ID NO 1 и 6	0.041
SEQ ID NO 1 и 7	0.034
SEQ ID NO 2 и 9	0.038
SEQ ID NO 3 и 6	0.068
SEQ ID NO 3 и 8	0.057
SEQ ID NO 3 и 9	0.049
Крысиное родительское	0.372

ФИГ. 5

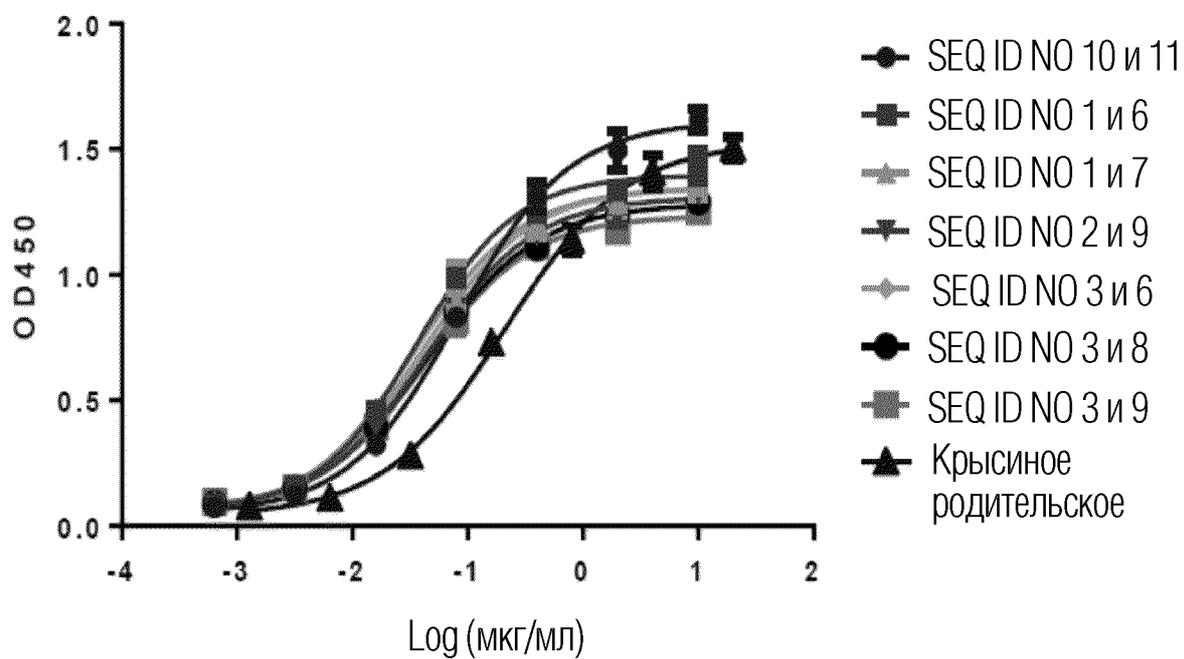
Человеческий зрелый ЕМАРII



Антитело	EC50 (мкг/мл)
SEQ ID NO 10 и 11	0.447
SEQ ID NO 1 и 6	0.152
SEQ ID NO 1 и 7	0.156
SEQ ID NO 2 и 9	0.161
SEQ ID NO 3 и 6	0.212
SEQ ID NO 3 и 8	0.169
SEQ ID NO 3 и 9	0.169
Крысиное родительское	0.973

ФИГ. 6

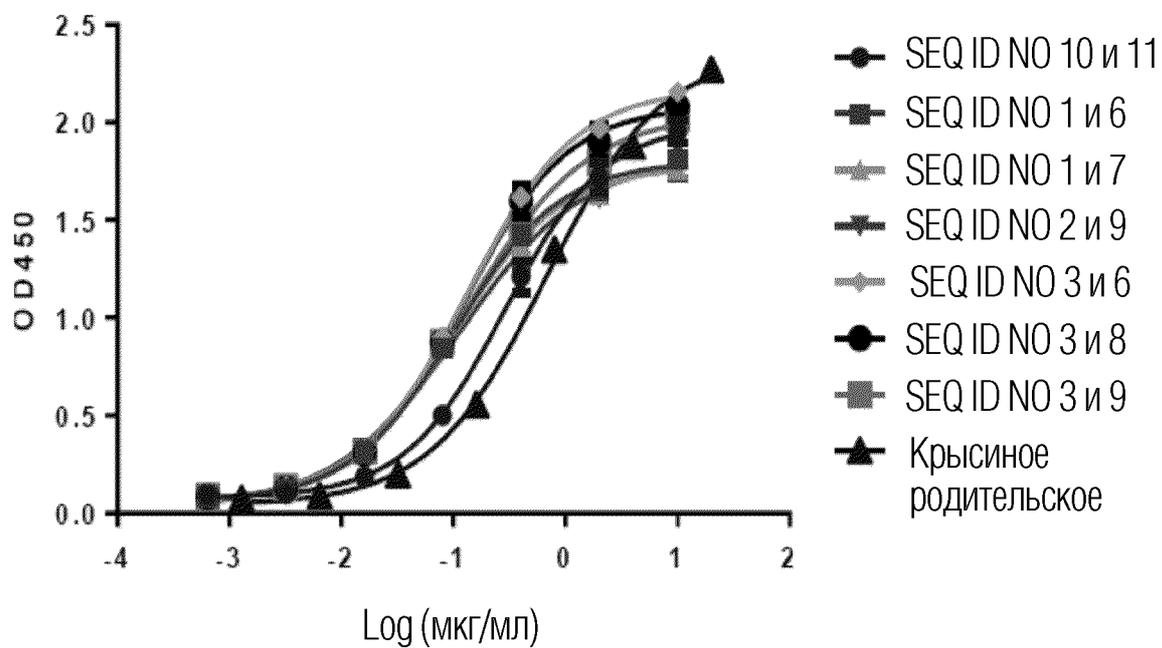
Мышиный про-EMAPII



Антитело	EC50 (мкг/мл)
SEQ ID NO 10 и 11	0.083
SEQ ID NO 1 и 6	0.036
SEQ ID NO 1 и 7	0.034
SEQ ID NO 2 и 9	0.044
SEQ ID NO 3 и 6	0.041
SEQ ID NO 3 и 8	0.044
SEQ ID NO 3 и 9	0.044
Крысиное родительское	0.211

ФИГ. 7

Мышиный зрелый ЕМАР II



Антитело	EC50 (мкг/мл)
SEQ ID NO 10 и 11	0.287
SEQ ID NO 1 и 6	0.102
SEQ ID NO 1 и 7	0.100
SEQ ID NO 2 и 9	0.114
SEQ ID NO 3 и 6	0.130
SEQ ID NO 3 и 8	0.124
SEQ ID NO 3 и 9	0.131
Крысиное родительское	0.666

ФИГ. 8