

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **046416**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2024.03.13**

(51) Int. Cl. **C07K 16/28 (2006.01)**

(21) Номер заявки  
**201291065**

(22) Дата подачи заявки  
**2011.04.15**

---

(54) **АНТИТЕЛА ПРОТИВ VLA-4**

---

(31) **61/324,944**

(56) **WO-A2-2006096653  
US-A-5840299**

(32) **2010.04.16**

(33) **US**

(43) **2013.03.29**

(86) **PCT/US2011/032641**

(87) **WO 2011/130603 2011.10.20**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**БАЙОДЖЕН АЙДЕК МА ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:  
**Луговской Алексей А., Тэйлор  
Фредерик Р., Маклахлан Карен (US)**

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

---

(57) Изобретение относится к рекомбинантным молекулам антител или их антигенсвязывающим фрагментам, связывающимся с  $\alpha 4$ -цепью белка VLA-4. Изобретение также относится к векторам, кодирующим указанные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, способу получения указанных антител или их антигенсвязывающих фрагментов, а также способу лечения пациента, страдающего от заболевания или нарушения, выбранного из рака, воспалительного заболевания, неврологического заболевания или острого нарушения, включающему введение указанных антител или их антигенсвязывающих фрагментов.

**046416**

**B1**

**046416**  
**B1**

### Родственные заявки

Изобретение претендует на приоритет временной заявки США № 61/324944 от 16 апреля 2010 г., содержание которой полностью включено сюда в качестве ссылки.

### Область техники

Настоящее изобретение относится к антителам, связывающимся с белком альфа-4, и их фрагментам.

### Уровень техники

Гуманизированные антитела можно применять в качестве терапевтических агентов вместо антител мыши во избежание нежелательного иммунного ответа, называемого ответом, опосредованным антителами человека против антител мыши (НАМА). Гуманизированные антитела в общем случае конструируют путем замещения областей, определяющих комплементарность (CDR), антитела человека на области CDR другого биологического вида, в типичном случае - области из антитела мыши.

Белок VLA-4 (который также называют  $\alpha 4\beta 1$ ) является членом семейства рецепторов клеточной поверхности -  $\beta 1$ -интегринов. VLA-4 содержит  $\alpha 4$ -цепь и  $\beta 1$ -цепь и участвует в межклеточных взаимодействиях. Его экспрессия в основном ограничена лимфоидными и миелоидными клетками. VLA-4 связывается с лигандом эндотелиальных клеток VCAM-1 (молекулой адгезии сосудистого эндотелия-1) и может опосредовать присоединение Т- и В-лимфоцитов к гепарин II-связывающему фрагменту фибронектина плазмы крови человека.

### Сущность изобретения

Авторы изобретения обнаружили, что каркасные области переменных областей эмбрионального типа можно применять для оптимизации антител, связывающихся с альфа-4, с пересаженными областями CDR, таких как антитела против VLA-4. Соответственно, изобретение представляет переменные области тяжелых цепей (VH) и переменные области легких цепей (VL), и молекулы антител против VLA-4, содержащие такие каркасные области.

В одном из вариантов воплощения настоящее изобретение представляет VH-цепь антитела против  $\alpha 4$ , содержащую области CDR из донорного антитела против  $\alpha 4$ , например, антитела против  $\alpha 4$ , описанного здесь, и каркасную область VH-цепи, содержащую области 1, 2, 3 и 4 из последовательности или несущую не более 5, 10 или 15 отличий от последовательности переменной области эмбрионального типа для VH-цепи. В одном из вариантов воплощения каркасная область 4 переменной области (FR4) является консенсусной последовательностью человека. В одном из вариантов воплощения присутствуют полные последовательности каркасных областей FR1, FR2, FR3 и FR4 VH-цепи. В другом варианте воплощения цепь является антигенсвязывающим фрагментом VH-области.

В одном из вариантов воплощения последовательность эмбрионального типа является IGHV1-f (SEQ ID NO: 2), изображенной на фиг. 1. В некоторых вариантах воплощения последовательность каркасной области VH-цепи может отличаться по меньшей мере одним, но не более чем 2, 3, 4, 5, 10 или 15 аминокислотными остатками от последовательности эмбрионального типа, например, SEQ ID NO: 2. В одном из вариантов воплощения каркасная область VH-цепи дополнительно включает остатки, отличные от соответствующих остатков в последовательности человека. Например, VH-цепь содержит отсутствующие у человека остатки в одном или нескольких положениях 24, 67, 76, 80 и 94 в каркасной области (нумерация по Кабату) в SEQ ID NO: 2.

В одном из вариантов воплощения по меньшей мере одна или более из областей, определяющих комплементарность (CDR), переменных доменов происходят от донорного антитела, связывающегося с  $\alpha 4$ , не принадлежащего человеку. В одном из вариантов воплощения антигенсвязывающие области переменной домена тяжелой цепи с пересаженными CDR содержат CDR, соответствующие положениям 26-34 (CDR1), 50-65 (CDR2) и 95-102 (CDR3) (нумерация по Кабату; Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5<sup>th</sup> ed., vol. 4, 1991, U.S. Department of Health and Human Services, NIH, USA).

Таким образом, в одном из вариантов воплощения каркасная область переменной области тяжелой цепи (VH) имеет акцепторную последовательность, происходящую от последовательности эмбрионального типа антитела человека IGHV1-f.

В другом варианте воплощения по меньшей мере один аминокислотный остаток и менее чем 2, 3, 4, 5 или 10 аминокислотных остатков в области FR1 в составе области VH отличается от соответствующего остатка, находящегося в последовательности эмбрионального типа у человека. Один или более таких остатков могут, например, быть идентичны остаткам в каркасной области не принадлежащего человеку антитела, из которого происходят последовательности CDR. В одном из вариантов воплощения аминокислотный остаток в положении 24 (при нумерации по Кабату) мутирован таким образом, чтобы он был идентичен остатку в каркасной области не принадлежащего человеку антитела.

В другом варианте воплощения по меньшей мере один аминокислотный остаток и менее чем 2, 3, 4, 5 или 10 аминокислотных остатков в области FR2 в составе области VH отличается от соответствующего остатка, находящегося в последовательности эмбрионального типа у человека. Один или более таких остатков могут, например, быть идентичны остаткам в каркасной области не принадлежащего человеку антитела, из которого происходят последовательности CDR.

В другом варианте воплощения по меньшей мере один аминокислотный остаток и менее чем 2, 3, 4, 5 или 10 аминокислотных остатков в области FR3 в составе цепи VH отличается от соответствующего остатка, находящегося в последовательности эмбрионального типа у человека. Один или более таких остатков могут, например, быть идентичны остаткам в каркасной области не принадлежащего человеку антителя, из которого происходят последовательности CDR. В одном из вариантов воплощения аминокислотный остаток в положении 94 (при нумерации по Кабату) идентичен остатку в каркасной области не принадлежащего человеку антителя. В еще одном из вариантов воплощения аминокислотные остатки в положениях 67, 76, 80 и 94 (при нумерации по Кабату) идентичны остаткам в каркасной области не принадлежащего человеку антителя.

В некоторых вариантах воплощения VH-цепь антителя имеет последовательность SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5.

В одном аспекте настоящее изобретение представляет VL-цепь антителя против VLA-4, содержащую области CDR из донорного антителя против VLA-4, например, антителя против VLA-4, описанного здесь, и каркасную область VL-цепи, содержащую области 1, 2, 3 и 4 из последовательности или несущую не более 5, 10 или 15 отличий (либо на область, либо в целом) от последовательности варибельной области эмбрионального типа для VL-цепи. В одном из вариантов воплощения каркасная область 4 варибельной области (FR4) является консенсусной последовательностью человека. В одном из вариантов воплощения присутствуют полные последовательности каркасных областей FR1, FR2, FR3 и FR4 VL-цепи. В другом варианте воплощения цепь является антигенсвязывающим фрагментом VL-области.

В еще одном из вариантов воплощения последовательность эмбрионального типа является IGKV4-1 (SEQ ID NO: 7), изображенной на фиг. 2. В других вариантах воплощения последовательность каркасной области VL-цепи может отличаться по меньшей мере одним, но не более чем 2, 3, 4, 5, 10 или 15 аминокислотными остатками от последовательности каркасной области эмбрионального типа, например, SEQ ID NO: 7. В другом варианте воплощения VL-цепь дополнительно включает аминокислотные остатки, отличные от соответствующих остатков в последовательности человека. Например, VL-цепь дополнительно содержит отсутствующие у человека остатки в одном или нескольких положениях 1, 73 и 87 в каркасной области (нумерация по Кабату) в SEQ ID NO: 7.

В одном из вариантов воплощения последовательность является AАН7035.1 (SEQ ID NO: 12) или ее созданной генно-инженерными методами версией эмбрионального типа (SEQ ID NO: 13), показанной на фиг. 2. В некоторых вариантах воплощения последовательность каркасной области VL-цепи может отличаться по меньшей мере одним, но не более чем 5, 10, 15, 20 или 25 аминокислотными остатками от созданной генно-инженерными методами последовательности каркасной области эмбрионального типа, например, SEQ ID NO: 13. В одном из вариантов воплощения VL-цепь включает остатки, отличные от соответствующих остатков в последовательности человека. Например, VL-цепь содержит отсутствующие у человека остатки в одном или нескольких положениях 1 и 87 в каркасной области (нумерация по Кабату) в SEQ ID NO: 12. В другом варианте воплощения VL содержит аминокислотные замены в каркасных областях, произведенные таким образом, чтобы последовательность была похожа на другую последовательность каркасной области человека эмбрионального типа, такую как в последовательность эмбрионального типа IGKV4-1. В некоторых вариантах воплощения последовательность каркасной области VL-цепи изменена таким образом, чтобы она была идентична последовательности эмбрионального типа IGKV4-1 в положениях 1-3, 5-23, 35-37, 39-42, 45-49, 57, 59-61, 63-64, 70-72, 74-84, 86-88, 99-106 (нумерация по Кабату) в SEQ ID NO: 12.

В одном из вариантов воплощения по меньшей мере одна или более областей, определяющих комплементарность (CDR), варибельных доменов происходят от донорного антителя, связывающегося с  $\alpha 4$ , не принадлежащего человеку. В другом варианте воплощения антигенсвязывающие области варибельного домена тяжелой цепи с пересаженными CDR включают CDR, соответствующие положениям 24-31 (CDR1), 50-56 (CDR2) и 89-97 (CDR3) (нумерация по Кабату). Таким образом, в одном из вариантов воплощения каркасная область VL-цепи содержит акцепторную последовательность, сконструированную из последовательности эмбрионального типа IGKV4-1, из антителя AАН70335.1 или из созданного генно-инженерными методами антителя AАН70335.1.

В другом варианте воплощения по меньшей мере один аминокислотный остаток и менее чем 2, 3, 4, 5, 10 или 15 аминокислотных остатков в области FR1 в составе цепи VL отличается от соответствующего остатка, находящегося в последовательности у человека. Один или более таких остатков могут, например, быть идентичны остаткам в каркасной области не принадлежащего человеку антителя, из которого происходят последовательности CDR. В одном из вариантов воплощения аминокислотный остаток в N-концевом положении FR1 мутирован таким образом, чтобы он был идентичен остатку в каркасной области не принадлежащего человеку антителя.

В еще одном варианте воплощения по меньшей мере один аминокислотный остаток и менее чем 2, 3, 4, 5, 10 или 15 аминокислотных остатков в области FR2 в составе цепи VL отличается от соответствующего остатка, находящегося в последовательности у человека. Один или более таких остатков могут, например, быть идентичны остаткам в каркасной области не принадлежащего человеку антителя, из которого происходят последовательности CDR.

В еще одном варианте воплощения по меньшей мере один аминокислотный остаток и менее чем 2, 3, 4, 5, 10 или 15 аминокислотных остатков в области FR3 в составе цепи VL отличается от соответствующего остатка, находящегося в последовательности у человека. Один или более таких остатков могут, например, быть идентичны остаткам в каркасной области не принадлежащего человеку антитела, из которого происходят последовательности CDR. В еще одном из вариантов воплощения аминокислотный остаток в положении 87 (при нумерации по Кабату) мутирован таким образом, чтобы он был идентичен остатку в каркасной области не принадлежащего человеку антитела. В еще одном из вариантов воплощения аминокислотный остаток в положениях 67 и 87 (при нумерации по Кабату) мутирован таким образом, чтобы он был идентичен остатку в последовательности каркасной области не принадлежащего человеку антитела. В еще одном из вариантов воплощения аминокислотный остаток в положениях 67, 73 и 87 (при нумерации по Кабату) в SEQ ID NO: 7 мутирован таким образом, чтобы он был идентичен остатку в каркасной области не принадлежащего человеку антитела.

В других воплощениях VL-цепь антитела имеет последовательность SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11.

В одном из вариантов воплощения CDR акцепторных последовательностей каркасных областей цепей VH и VL выбраны таким образом, чтобы они были похожи на последовательности CDR в последовательности не принадлежащего человеку (например, принадлежащего мыши) антитела, при этом не принадлежащее человеку антитело связывается с интегрином альфа-4 или его фрагментом. В другом варианте воплощения последовательности CDR выбраны таким образом, чтобы они были похожи на последовательности CDR не принадлежащего человеку антитела, которое связывается с эпитопом B1 на цепи VLA-4  $\alpha 4$ . В одном из вариантов воплощения CDR выбраны таким образом, чтобы они были похожи на области моноклонального антитела мыши, например, HP1/2, HP2/1, HP2/4, L25, P4C2 или 21.6 (Pulido et al., J. Biol. Chem. 266:10241-10245. 1991; патент США № 6033665). Модификации могут означать, например, отщепление и вставку или изменение, например, посредством направленного мутагенеза.

Другой особенностью является то, что изобретение представляет антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие:

VL-цепь антитела против VLA-4, описанную здесь, например, VL-цепь антитела против VLA-4, содержащую CDR из донорного антитела против VLA-4, например, антитела против VLA-4, описанного здесь, и каркасную область VL-цепи, содержащую каркасные области легкой цепи 1, 2 и 3 из последовательности или несущую не более 5, 10 или 15 отличий от последовательности вариабельной области эмбрионального типа для VL-цепи. В одном из вариантов воплощения вариабельная область 4 является консенсусной последовательностью человека; и

VH-цепь антитела против VLA-4, описанную здесь, например, VL-цепь антитела против VLA-4, содержащую CDR из донорного антитела против VLA-4, например, антитела против VLA-4, описанного здесь, и каркасную область VL-цепи, содержащую каркасные области легкой цепи 1, 2 и 3 из последовательности или несущую не более 5, 10 или 15 отличий от последовательности вариабельной области эмбрионального типа для VL-цепи. В одном из вариантов воплощения вариабельная область 4 является консенсусной последовательностью человека.

В одном из вариантов воплощения антитело связывает один или оба белка  $\alpha 4\beta 1$  и  $\alpha 4\beta 7$ .

В другом аспекте VL- или VH-цепь, или антитело или его фрагмент, описанные здесь, мечены таким образом, чтобы была возможна их детекция.

В еще одном аспекте изобретение представляет вектор, содержащий ДНК, кодирующую тяжелую цепь антитела или ее фрагмент, связывающий  $\alpha 4$ , описанные здесь. В некоторых вариантах воплощения ДНК вектора кодирует VH-цепь, имеющую последовательность SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5.

Еще один аспект заключается в том, что изобретение представляет вектор, содержащий ДНК, кодирующую легкую цепь антитела или ее фрагмент, связывающий  $\alpha 4$ , описанные здесь. В некоторых вариантах воплощения ДНК вектора кодирует VL-цепь, имеющую последовательность SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11.

Еще в одном аспекте изобретение представляет вектор, содержащий ДНК, кодирующую тяжелую цепь антитела или ее фрагмент, связывающий  $\alpha 4$ , описанные здесь, и легкую цепь антитела или ее фрагмент, связывающий  $\alpha 4$ , описанные здесь.

Другой аспект заключается в том, что изобретение представляет клетку-хозяина, содержащую вектор, описанный здесь, например, вектор, способный экспрессировать тяжелую и/или легкую цепь антитела или фрагмента антитела, описанных здесь.

В одном аспекте изобретение представляет способ получения рекомбинантного антитела против  $\alpha 4$  или его фрагмента, связывающегося с  $\alpha 4$ , путем получения клетки-хозяина, трансфицированной (а) последовательностью ДНК, кодирующей тяжелую цепь антитела, описанную здесь, или ее фрагмент, связывающий  $\alpha 4$ ; и (б) последовательностью ДНК, кодирующей легкую цепь антитела, описанную здесь, или ее фрагмент, связывающий  $\alpha 4$ , и путем культивирования трансфицированной клетки с получением рекомбинантной молекулы антитела против  $\alpha 4$  или его фрагмента, связывающего  $\alpha 4$ . ДНК, кодирующая

тяжелую и легкую цепи антитела, может быть получена с расположением в составе одного и того же вектора или на разных векторах.

В одном аспекте изобретение представляет способ получения рекомбинантного антитела против  $\alpha 4$  или его фрагмента, связывающегося с  $\alpha 4$ , посредством получения клетки-хозяина, трансфецированной (а) последовательностью ДНК, кодирующей тяжелую цепь антитела или ее фрагмент, связывающий  $\alpha 4$ , например, где ДНК последовательность может иметь последовательности SEQ ID NO: 3, 4 или 5; и (б) последовательностью ДНК, кодирующей легкую цепь антитела или ее фрагмент, связывающий  $\alpha 4$ , например, где ДНК последовательность может иметь последовательности SEQ ID NO: 8, 9, 10 или 11, и путем культивирования трансфецированной клетки с получением рекомбинантной молекулы антитела против  $\alpha 4$  или его фрагмента, связывающего  $\alpha 4$ . ДНК, кодирующая тяжелую и легкую цепи антитела, может быть получена с расположением в составе одного и того же вектора или на разных векторах.

В еще одном аспекте изобретение представляет способ лечения заболевания или состояния, опосредованного  $\alpha 4$ -интегрином, например, интегрином  $\alpha 4\beta 1$  (VLA-4) или  $\alpha 4\beta 7$ , путем введения антитела против  $\alpha 4$  или фрагмента антитела, описанных здесь, или фармацевтической композиции, содержащей это антитело или фрагмент, субъекту, которому необходимо такое лечение. У субъекта может наблюдаться или иметься риск развития, например, воспалительных, иммунных или аутоиммунных нарушений (например, воспаления центральной нервной системы, такого как рассеянный склероз, менингит, нейромиелит зрительного нерва, нейросаркоидоз, васкулит ЦНС, энцефалит и поперечный миелит), риск отторжения тканевого или органного трансплантата или реакции "трансплантат против хозяина", острого повреждения ЦНС, такого как инсульт, травматическое повреждение головного мозга (ПГМ) или повреждение спинного мозга (ПСМ); хронического заболевания почек; аллергии, например, аллергической астмы; сахарного диабета 1 типа; воспалительного заболевания кишечника, такого как болезнь Крона, неспецифический язвенный колит; миастении гравис; фибромиалгии; нарушений суставов, таких как ревматоидный артрит, псориатический артрит; воспалительных/иммунных кожных нарушений, таких как псориаз, витилиго, дерматит, красный плоский лишай; системной красной волчанки; синдрома Гужеро - Шегрена; гемобластозов, таких как множественная миелома, лейкемия, лимфома; солидных раковых опухолей, таких как саркомы или карциномы, например, легких, груди, простаты, головного мозга; и фиброзных нарушений, таких как фиброз легких, миелофиброз, цирроз печени, мезангиальный пролиферативный гломерулонефрит, серповидный гломерулонефрит, диабетическая невропатия и интерстициальный фиброз почки.

В другом аспекте изобретение представляет способ лечения пациента путем введения пациенту антитела или фрагмента антитела, связывающихся с  $\alpha 4$ . В одном из вариантов воплощения у пациента наблюдается онкологическое заболевание, такое как солидная опухоль или гемобластоз. Например, пациент, получающий лечение с применением антитела или фрагмента антитела, связывающихся с  $\alpha 4$ , может страдать острым миелогенным лейкозом (ОМЛ) или множественной миеломой (ММ).

В другом варианте воплощения пациент страдает воспалительным нарушением, таким как рассеянный склероз, астма (например, от умеренной до тяжелой форм астмы), ревматоидный артрит, диабет или болезнь Крона. В другом варианте воплощения композицию вводят в соответствии с определенным режимом. В другом варианте воплощения способ дополнительно включает выбор пациента, подходящего для лечения с применением композиции. Пациент, подходящий для лечения, например, демонстрировал признак или симптом, свидетельствующие о возникновении заболевания, такие как признак или симптом, свидетельствующие о рассеянном склерозе.

В другом варианте воплощения способ дополнительно включает введение пациенту второго терапевтического агента, такого как химиотерапевтический агент, тромболитический агент, нейропротекторный агент, противовоспалительный агент, стероид, цитокин или фактор роста.

В одном из вариантов воплощения пациенту вводят гуманизированное антитело против VLA-4 или его фрагмент, описанные здесь, такие как HuHP1/2, H1L1, H1L2 или H1L3.

В одном из вариантов воплощения композицию, содержащую антитело, связывающееся с  $\alpha 4$ , вводят в соответствии с определенным режимом, например, с регулярными интервалами. Например, композицию могут вводить один раз в день, еженедельно или ежемесячно; один раз в неделю, два раза в неделю, три раза в неделю, четыре раза в неделю или чаще; или один раз в две недели, один раз в три недели, один раз в четыре недели или более.

В одном из вариантов воплощения дозировку могут корректировать в соответствии с наблюдаемой у пациента скоростью клиренса ранее введенного антитела против  $\alpha 4$ . Например, в одном из вариантов воплощения пациенту не будут вводить вторую или последующую дозу до того, как уровень антител против  $\alpha 4$  в организме пациента не упадет до уровня ниже, чем заранее заданный уровень. В одном из вариантов воплощения берут у пациента пробу (например, пробу плазмы, сыворотки, крови или мочи) анализируют на присутствие антител против  $\alpha 4$ , и если уровень антител против  $\alpha 4$  выше заранее заданного уровня, пациенту не будут вводить вторую или последующую дозу. Если уровень антител против  $\alpha 4$  в организме пациента ниже заранее установленного уровня, то пациенту вводят вторую или последующую дозу.

В одном из вариантов воплощения композицию вводят непрерывно, например, в течение периода более чем 30 мин, но менее чем 1, 2, 4 или 12 ч. Композицию, содержащую антитело и второй агент, можно вводить любым пригодным способом, например, подкожно, внутримышечно или внутривенно.

В некоторых вариантах воплощения каждый компонент - антитело и второй агент - вводят в той же дозе, что и при назначении каждого из них для монотерапии. В других вариантах воплощения антитело вводят в дозировке, которая равна или менее, чем количество, необходимое для эффективного лечения при введении без дополнительного агента. Схожим образом второй агент можно вводить в дозировке, которая равна или менее, чем количество, необходимое для эффективного лечения при введении без антитела.

Еще один аспект, представленный в изобретении, - это способ оценки состояния пациента путем определения, соответствует ли пациент заранее выбранному критерию, и, если пациент соответствует заранее выбранному критерию, - способ утверждения, предоставления, предписания или введения пациенту композиции антитела, связывающегося с VLA-4, описанной здесь. В одном из вариантов воплощения заранее выбранный критерий - это неспособность пациента адекватным образом отвечать на предшествующее альтернативное терапевтическое лечение или режим, например, в случае лечения рассеянного склероза. В другом варианте воплощения заранее выбранный критерий - это отсутствие каких-либо признаков или симптомов прогрессирующей многоочаговой лейкоэнцефалопатии (ПМЛ) или отсутствие любого диагноза ПМЛ. В некоторых случаях выбор основан на отсутствии фактора риска для ПМЛ, например, у субъекта нет положительного теста на ДНК вируса JC или нет положительного теста на антитела против вируса JC. В другом варианте воплощения критерием является критерий, описанный в заявке PCT/US07/75577 (опубликованной как WO 2008/021954), включенной сюда в качестве ссылки, которая описывает способы и системы для распределения лекарственных средств и для доставки лекарств в организм пациентов.

В другом аспекте предложен способ распределения композиции, описанной здесь. Композиция содержит антитело, связывающее альфа-4. Способ включает предоставление реципиенту (например, конечному пользователю, пациенту, врачу, розничному и оптовому продавцу фармацевтической продукции, дистрибьютору или фармацевтическому отделению в больнице, клинике сестринского ухода или организации медицинского обеспечения) упаковки, содержащей достаточное количество единиц дозирования лекарственного средства для проведения лечения пациента в течение по меньшей мере 6, 12, 24, 36 или 48 месяцев. Еще в одном аспекте изобретение представляет способ оценки качества упаковки или серии упаковок (например, с целью определения возможного истечения срока годности) композиции, описанной здесь, содержащей антитело, связывающееся с альфа-4. Способ включает оценку того, прошел ли срок годности упаковки. Срок годности составляет по меньшей мере 6, 12, 24, 36 или 48 месяцев, например, более чем 24 или 36 месяцев, начиная с заранее заданного события, такого как производство, проведение анализа или упаковка. В некоторых вариантах воплощения решение или выполнение какого-то этапа происходит в результате анализа. Например, в зависимости от правильно проведенного анализа, антитело в упаковке применяют или выбрасывают, классифицируют, выбирают, выпускают или приостанавливают выпуск, транспортируют, перемещают в другое место, выпускают в продажу, продают или предлагают для продажи, изымают из продажи или больше не предлагают для продажи, в зависимости от того, истек ли срок годности продукта.

В другом аспекте изобретение представляет упаковку, содержащую по меньшей мере две унифицированные дозы водной композиции, содержащей антитело, связывающееся с  $\alpha 4$ . В одном из вариантов воплощения все унифицированные дозы содержат одинаковое количество антитела, а в других вариантах воплощения имеются унифицированные дозы с двумя или более уровней дозировки или с двумя или более различных композиций, например, имеющие различные дозировки или свойства высвобождения.

В другом аспекте изобретение включает способ инструктажа реципиента по введению композиции, содержащей антитело, связывающееся с  $\alpha 4$ . Способ включает инструктаж реципиента (например, конечного пользователя, пациента, врача, розничного и оптового продавца фармацевтической продукции, дистрибьютора или сотрудника фармацевтического отделения в больнице, клиники сестринского ухода или организации медицинского обеспечения) о том, что антитело необходимо вводить пациенту в соответствии с описанным здесь режимом. Способ также может включать инструктаж реципиента о том, что антитело необходимо вводить до того, как истечет срок годности. Срок годности составляет по меньшей мере 6, 12, 24, 36 или 48 месяцев, например, более чем 24 или 36 месяцев, начиная с заранее заданного события, такого как производство, проведение анализа или упаковка. В одном из вариантов воплощения реципиент также получает запас антитела, например, запас унифицированных доз антитела.

В еще одном аспекте изобретение представляет способ получения антитела, которое содержит CDR, из донорного антитела, такого как не принадлежащее человеку антитело, например, антитело мыши, и каркасные области переменных областей одной из или обеих цепей, тяжелой и легкой, происходящие от каркасной области (областей) переменной области эмбрионального типа человека. Способ включает один или оба из пунктов 1 и 2, где пункты 1 и 2 следующие:

- 1) выявление или выбор каркасной области переменной области стабильной акцепторной тяжелой

цепи человека, которая содержит один или более тех же остатков, что и не принадлежащая человеку донорная тяжелая цепь, в одном или нескольких из указанных в пунктах а), б) и в) положениях:

а) VH по Кабату № 2, 4, 24, 26, 27, 29, 36, 38, 46, 47, 48, 49, 66, 67, 69, 71, 78, 93 и 94, которые, как полагают, не следуя какой-то определенной теории, являются важными для поддержания конформации CDR;

б) VH по Кабату № 1, 2, 27, 28, 30, 43, 66, 68, 70, 72, 73, 74 и 75, которые, как полагают, не следуя какой-то определенной теории, способны взаимодействовать с антигеном и;

в) VH по Кабату № 37, 39, 44, 45, 47, 91, 93 и 103, которые, как полагают, не следуя какой-то определенной теории, важны для сохранения взаимодействия между VH и VL; и

2) выявление или выбор каркасной области варибельной области стабильной акцепторной легкой цепи, которая содержит один или более тех же остатков, что и донорная легкая цепь, в одном или нескольких из указанных в пунктах а), б) и в) положениях:

а) VL по Кабату № 2, 4, 38, 43, 44, 48, 58, 64, 71 и 73, которые, как полагают, не следуя какой-то определенной теории, являются важными для поддержания конформации CDR;

б) VL по Кабату № 1, 2, 49, 57, 60, 63, 65, 66, 67, 68, 69 и 70, которые, как полагают, не следуя какой-то определенной теории, потенциально способны взаимодействовать с антигеном и;

в) VL по Кабату № 36, 38, 43, 44, 46, 49, 87 и 98, которые, как полагают, не следуя какой-то определенной теории, важны для сохранения взаимодействия между VH и VL;

3) создание варибельной области, содержащей донорные CDR и выбранную каркасную область эмбрионального типа, имеющую совпадающие остатки, указанные в пп.1 и 2, таким образом, чтобы посредством выбора последовательности эмбрионального типа и дальнейшего внесения обратных мутаций дополнительных остатков, указанных в пп.1 и 2, в последовательности эмбрионального типа с восстановлением последовательности мыши дополнительно максимизировать совпадение остатков, указанных в пп.1 и 2; и

4) оценка каждого совпадающего положения, например, с применением анализа пространственной структуры или моделирования, и в случае, если положение удовлетворяет заранее установленные стандарты риска, например, оказания мешающих воздействий на конформацию CDR, взаимодействия с антигеном или сохранения взаимодействия между VH и VL, - повторное внесение эквивалентного остатка из последовательности мыши или стандартного для антитела человека остатка, совместимого со структурой антитела.

В одном из вариантов воплощения по меньшей мере 3, 4 или 5 остатков, выявленных в (1.a), совпадают. Например, в одном из вариантов воплощения остатки 24, 29 или 94 совпадают.

В одном из вариантов воплощения по меньшей мере 3, 4 или 5 остатков, выявленных в (1.b), совпадают. Например, в одном из вариантов воплощения остатки 1, 73 или 75 совпадают.

В одном из вариантов воплощения по меньшей мере 3, 4 или 5 остатков, выявленных в (1.c), совпадают. Например, в одном из вариантов воплощения остатки 37, 93 или 103 совпадают.

В одном из вариантов воплощения по меньшей мере 3, 4 или 5 остатков, выявленных в (2.a), совпадают. Например, в одном из вариантов воплощения остатки 2, 71 и 73 совпадают.

В одном из вариантов воплощения по меньшей мере 3, 4 или 5 остатков, выявленных в (2.b), совпадают. Например, в одном из вариантов воплощения остатки 1, 68 или 70 совпадают.

В одном из вариантов воплощения по меньшей мере 3, 4 или 5 остатков, выявленных в (2.c), совпадают. Например, в одном из вариантов воплощения остатки 46, 87 или 98 совпадают.

В одном из вариантов воплощения остаток 6 в (1.a), остаток 2 в (1.b) и остаток 4 в (1.c) совпадают.

В другом варианте воплощения остаток 4 в (2.a), остаток 2 в (2.b) и остаток 4 в (2.c) совпадают.

В одном из вариантов воплощения последовательность тяжелой цепи эмбрионального типа принадлежит к классу эмбрионального типа VH3, VH1 и VH5. В другом варианте воплощения последовательность легкой цепи эмбрионального типа является последовательностью V-каппа или V-лямбда.

Термин "лечение" относится к введению терапевтического средства в количестве, способом и/или с помощью методики, эффективных для улучшения состояния, симптома или параметра, связанного с нарушением, или для профилактики прогрессирования нарушения в статистически значимой степени или в степени, которую может определить специалист в данной области техники. Эффективное количество, способ или методика могут меняться в зависимости от субъекта и могут быть скорректированы для субъекта.

Термин "антитело, связывающееся с  $\alpha 4$ " означает антитело, которое связывается с субъединицей  $\alpha 4$  интегрина VLA-4 ( $\alpha 4\beta 1$ ) и по меньшей мере частично ингибирует активность VLA-4, в частности, связывающую активность интегрина VLA-4 или сигнальную активность, например, способность передавать опосредованный белком VLA-4 сигнал. Например, антитело, связывающееся с VLA-4, может ингибировать связывание VLA-4 с собственным лигандом VLA-4, например, белком клеточной поверхности, таким как VCAM-1 (молекула адгезии сосудистого эндотелия-1), или с компонентом внеклеточного матрикса, таким как фибронектин или остеоопонтин. Антитело, связывающееся с альфа-4, может связываться как с  $\alpha 4\beta 1$ , так и с  $\alpha 4\beta 7$ . В типичном случае антитело связывается с эпитопом B1 на  $\alpha 4$ . Антитело, свя-

зываются с  $\alpha 4$ , может связываться с VLA-4 с  $K_d$  менее чем примерно  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-10}$  или  $10^{-11}$  М.

При использовании здесь термин "антитело" означает белок, который содержит по меньшей мере одну варибельную область иммуноглобулина, например, аминокислотную последовательность, которая содержит варибельный домен иммуноглобулина или последовательность варибельного домена иммуноглобулина. Например, антитело может содержать варибельную область тяжелой (H) цепи (кратко обозначаемую здесь как VH) и варибельную область легкой (L) цепи (кратко обозначаемую здесь как VL). В еще одном примере антитело содержит две варибельные области тяжелой (H) цепи и две варибельные области легкой (L) цепи. Легкие цепи иммуноглобулина могут принадлежать к типу каппа или лямбда. В одном из вариантов воплощения антитело гликозилировано. Антитело может быть функционально активным в отношении антитело-опосредованной цитотоксичности и/или комплемент-опосредованной цитотоксичности или может быть функционально неактивным в отношении одной или обеих этих активностей.

Области VH и VL могут дополнительно подразделяться на гиперварибельные области, называемые "областями, определяющими комплементарность" ("CDR"), чередующиеся с более консервативными областями, называемыми "каркасными областями" (FR). Размер FR и CDR был точно определен (см. Kabat, E.A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; и Chothia, C et al. (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917). Здесь используются определения согласно нумерации по Кабату. Каждая область VH и VL в типичном случае состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных в направлении от N (амино-)конца к C (карбоксил-)концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

Термин "иммуноглобулиновый домен" означает домен из варибельного или консервативного домена молекул иммуноглобулина. Иммуноглобулиновые домены в типичном случае содержат два  $\beta$ -слоя, образованных из примерно семи  $\beta$ -структур, и консервативную дисульфидную связь (см., например, A.F. Williams and A.N. Barclay (1988) Ann. Rev. Immunol. 6:381-405).

При использовании здесь термин "последовательность варибельного домена иммуноглобулина" означает аминокислотную последовательность, которая может образовывать структуру варибельного домена иммуноглобулина. Например, последовательность может включать всю или часть аминокислотной последовательности варибельного домена, встречающегося в природе. Например, в последовательности могут отсутствовать одна, две или более N- или C-концевых аминокислот, внутренних аминокислот, может включать одну или более вставок или дополнительных концевых аминокислот, или может содержать другие изменения. В одном из вариантов воплощения полипептид, который включает последовательность варибельного домена иммуноглобулина, может быть ассоциирован с другой последовательностью варибельного домена иммуноглобулина с образованием связывающей мишень структуры ("антиген-связывающего сайта"), например, структуры, которая взаимодействует с VLA-4.

Цепь VH или VL антитела может дополнительно включать всю или часть консервативной области тяжелой или легкой цепи и, таким образом, образовывать тяжелую или легкую цепь иммуноглобулина, соответственно. В одном из вариантов воплощения антитело является тетрамером из двух тяжелых цепей иммуноглобулина и двух легких цепей иммуноглобулина. Тяжелые и легкие цепи иммуноглобулина могут быть соединены дисульфидными связями. Консервативная область тяжелой цепи в типичном случае состоит из трех консервативных доменов, CH1, CH2 и CH3. Консервативная область легкой цепи в типичном случае содержит домен CL. Варибельная область тяжелой и легкой цепей содержит связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Консервативные области антител в типичном случае могут опосредовать связывание антитела с тканями или факторами организма-хозяина, в том числе с различными клетками иммунной системы (например, с эффекторными клетками) и с первым компонентом (C1q) классической системы комплемента.

Термин "иммуноглобулин" включает большое разнообразие классов полипептидов, которые можно отличать друг от друга по биохимическим свойствам. Специалистам в данной области техники понятно, что тяжелые цепи классифицируют как гамма, мю, альфа, дельта или эпсилон ( $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ) с выделением внутри классов нескольких подклассов (например,  $\gamma 1$ - $\gamma 4$ ). Именно природа этой цепи определяет "класс" антитела как IgG, IgM, IgA, IgD или IgE, соответственно. Подклассы иммуноглобулинов (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и т.д., хорошо охарактеризованы, и известно, что они обладают функциональной специализацией. Специалист может легко понять различие между модифицированными вариантами каждого из этих классов и изотипами, в связи с рассматриваемым изобретением, и, следовательно, они входят в объем настоящего изобретения. Все классы иммуноглобулинов явным образом находятся в объеме настоящего изобретения. Легкие цепи классифицируют как каппа или лямбда ( $\kappa$ ,  $\lambda$ ). Каждый класс тяжелых цепей может связываться либо с каппа, либо с лямбда легкой цепью.

Термин "антигенсвязывающий фрагмент" полноразмерного антитела означает один или более фрагментов полноразмерного антитела, которые сохраняют способность специфично связываться с представляющей интерес мишенью, например, с VLA-4. Примеры связывающих фрагментов, относящихся к термину "антигенсвязывающий фрагмент" полноразмерного антитела, включают (i) Fab-



фрагмент, моновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1; (ii) F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент, бивалентный фрагмент, содержащий два Fab-фрагмента, соединенных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) Fd-фрагмент, состоящий из доменов VH и CH1; (iv) Fv-фрагмент, состоящий из доменов VL и VH единичного фрагмента антитела, (v) dAb-фрагмент (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), который состоит из домена VH; и (vi) изолированную область, определяющую комплементарность (CDR), которая сохраняет функциональную активность. Дополнительно, хотя два домена Fv-фрагмента, VL и VH, кодируются разными генами, они могут быть объединены с помощью рекомбинантных методов посредством синтетического линкера, что позволяет получать их в виде единой белковой цепи, в которой области VL и VH спарены с образованием моновалентных молекул, известных как одноцепочечный Fv (scFv). См., например, Bird et al. (1988) Science 242:423-426; и Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883.

В некоторых вариантах воплощения вышеописанные антитела являются пегелированными.

В некоторых вариантах воплощения вышеописанные антитела или их фрагменты являются мультиспецифичными. В дополнительных вариантах воплощения вышеописанные антитела или их фрагменты являются моновалентными или биспецифичными.

Подробное описание одного или более воплощений изобретения изложено в сопроводительных чертежах и описании ниже. Другие особенности, объекты и преимущества изобретения будут очевидны из описания и чертежей, а также из формулы изобретения.

### Краткое описание фигур

На фиг. 1 представлены три варианта последовательности тяжелой цепи HP1/2 для тяжелой цепи эмбрионального типа человека IGHV1-f. Строчные буквы над последовательностью обозначают вставки, согласно схеме нумерации по Кабату.

На фиг. 2 представлены четыре варианта последовательности легкой цепи HP1/2 для последовательности антитела эмбрионального типа IGKV4-1 (дизайн L0, L1 и L2) или созданной генно-инженерными методами последовательности каппа цепи антитела эмбрионального типа человека AАН7033.1 (дизайн L3). Строчные буквы над последовательностью обозначают вставки, согласно схеме нумерации по Кабату.

На фиг. 3 представлен график, изображающий результаты анализа ELISA.

На фиг. 4 представлен график, изображающий результаты анализа ELISA.

На фиг. 5 представлена аминокислотная последовательность IgG4 Fc (шарнир + домен CH2 + домен CH3). Шарнирная область указана жирным шрифтом, а домен CH3 подчеркнут. Помещенная в квадратик буква "S" обозначает Ser228. Помещенная в кружок буква "N" обозначает Asn297.

На фиг. 6 представлен график, изображающий данные проточной цитометрии, полученные при анализе связывания NuHP1/2 с различными линиями опухолевых клеток. "HP1/2" означает гуманизированный HP1/2.

На фиг. 7А-7С представлена панель графиков, иллюстрирующих ингибирование молекулами NuHP1/2 связывания линий клеток ОМЛ (острого миелогенного лейкоза) с фибронектином или с лунками, покрытыми иммобилизованным VCAM1-Ig. На фиг. 7А изображено подавление связывания клеток HL60 и KG1 с лунками, покрытыми фибронектином. На фиг. 7В изображено подавление связывания клеток KG1 с лунками, покрытыми VCAM1-Ig. На фиг. 7С изображено подавление связывания клеток HL60 с лунками, покрытыми фибронектином и VCAM1-Ig, при инкубации с 20 мкг/мл NuHP1/2 (закрашенные столбики). Незакрашенные столбики показывают процент адгезии клеток в присутствии контроля с тем же изотипом. "HP1/2" означает гуманизированный HP1/2.

На фиг. 8А-8С представлена панель графиков, иллюстрирующих ингибирование молекулами NuHP1/2 связывания линий клеток ММ (множественной миеломы) с фибронектином или с лунками, покрытыми иммобилизованным VCAM1-Ig. На фиг. 8А изображено подавление связывания клеток U266 и H929 с лунками, покрытыми фибронектином. На фиг. 8В изображено подавление связывания клеток U266 и H929 с лунками, покрытыми VCAM1-Ig. На фиг. 8С изображено подавление связывания клеток U266 с лунками, покрытыми фибронектином и VCAM1-Ig, при инкубации с 20 мкг/мл NuHP1/2 (закрашенные столбики). Незакрашенные столбики показывают процент адгезии клеток в присутствии контроля с тем же изотипом. "HP1/2" означает гуманизированный HP1/2.

На фиг. 9А-9С представлена панель графиков, иллюстрирующих ингибирование молекулами NuHP1/2 связывания линий клеток ХЛЛ (хронического лимфоцитарного лейкоза) с фибронектином или с лунками, покрытыми иммобилизованным VCAM1-Ig. На фиг. 9А изображено подавление связывания клеток Mes1 и JM1 с лунками, покрытыми фибронектином. На фиг. 9В изображено подавление связывания клеток Mes1 и JM1 с лунками, покрытыми VCAM1-Ig. На фиг. 9С изображено подавление связывания клеток Mes1 с лунками, покрытыми фибронектином и VCAM1-Ig, при инкубации с 20 мкг/мл NuHP1/2 (закрашенные столбики). Незакрашенные столбики показывают процент адгезии клеток в присутствии контроля с тем же изотипом. "HP1/2" означает гуманизированный HP1/2.

### Детальное описание изобретения

Было продемонстрировано, что антитела против VLA-4 полезны для лечения заболевания. Например, натализумаб (Тизабри®), антитело против VLA-4, применяют для лечения рецидивирующего рассе-

янного склероза и болезни Крона. Однако для лечения некоторых состояний, например, таких острых состояний как повреждение спинного мозга (ПСМ) или травматическое повреждение головного мозга (ТПГМ), или для случаев лечения, применяемого в ограниченном количестве, например, лечения раковых заболеваний, может быть полезным проводить лечение антителом против VLA-4, которое имеет аффинность связывания, отличную от таковой натализумаба, например, имеет более высокую аффинность. Кроме того, лечение с применением антител против VLA-4 связано с редким, но иногда смертельным нарушением - прогрессирующей многоочаговой лейкоэнцефалопатией (ПМЛ), - лечение которого включает, среди прочего, удаление антитела из организма, получающего лечение субъекта, например, с применением замещения плазмы или иммуноабсорбции. Из-за потребности удалять антитело желательнее также найти баланс между преимуществами антитела, которое имеет повышенную аффинность к VLA-4, и недостатками антитела, которое связывается настолько прочно, что это затрудняет удаление или создает риск, связанный с низкой скоростью обмена. Такие антитела могут также быть полезны для лечения таких состояний как рассеянный склероз, поскольку позволяют проводить менее частое введение препарата или сделать более эффективным способы введения, отличные от инфузии. Возможность проводить лечение с применением более низких доз также может снизить риск таких нежелательных явлений как прогрессирующая многоочаговая лейкоэнцефалопатия. Соответственно, настоящее изобретение направлено на создание антител, имеющих такие желательные свойства.

Изобретение основано, по меньшей мере частично, на неожиданных характеристиках новых сконструированных гуманизованных антител, связывающихся с  $\alpha 4$ , которые обладают аффинностью связывания с  $\alpha 4$ , которая в 10 раз выше, чем таковая у антитела против  $\alpha 4$  натализумаба. Предложены антитела, связывающиеся с альфа-4, и их фрагменты, в которых каркасные области варируемой области легкой цепи (VL) и варируемой области тяжелой цепи (VH) содержат акцепторные последовательности, сконструированные из последовательностей антител эмбрионального типа или созданных генно-инженерными методами последовательностей антител эмбрионального типа, таких как антитела IGKV4-1 или geAAH70335.1, или IGHV1-f. Последовательности CDR происходят из не принадлежащих человеку антител против  $\alpha 4$ , таких как антитело против VLA-4, имеющее название HP1/2. Антитела, описанные здесь, могут обладать аффинностью, повышенной по меньшей мере в 1,5, 2,0, 2,5, 3,0 раза, например, относительно исходного антитела мыши. В одном из вариантов воплощения повышение аффинности составляет по меньшей мере в 1,5, 2,0, 2,5, 3,0 раза, но, соответственно, менее чем в 25, 20 или 15 раз.

#### **Фармацевтические композиции**

Агент, связывающийся с  $\alpha 4$ , такой как связывающееся с VLA-4 антитело, может быть приготовлен в виде фармацевтической композиции. В типичном случае фармацевтическая композиция включает фармацевтически приемлемый носитель. При использовании здесь "фармацевтически приемлемый носитель" включает любой и все растворители, диспергирующие среды, агенты для нанесения оболочки, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотоничные и отсрочивающие всасывание агенты, и т.п., которые являются физиологически совместимыми.

"Фармацевтически приемлемая соль" означает соль, которая сохраняет требуемую биологическую активность исходного соединения и не вызывает каких-либо нежелательных токсикологических эффектов (см., например, Berge, S.M., et al. (1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19). Примеры таких солей включают соли, образующиеся при добавлении кислоты, и соли, образующиеся при добавлении основания. Соли, образующиеся при добавлении кислоты, включают соли являющиеся производными нетоксичных неорганических кислот, таких как хлористоводородная, азотная, фосфорная, серная, бромистоводородная, йодистоводородная и т.п., а также нетоксичных органических кислот, таких как алифатические моно- и дикарбоновые кислоты, фенол-замещенные алкановые кислоты, гидроксикарбоновые кислоты, ароматические кислоты, алифатические и ароматические сульфоновые кислоты, и т.п. Соли, образующиеся при добавлении основания, включают соли являющиеся производными щелочноземельных металлов, таких как натрий, калий, магний, кальций и т.п., а также нетоксичных органических аминов, таких как N,N'-дибензилэтилендиамин, N-метилглюкамин, хлоропрокаин, холин, диэтанолламин, этилендиамин, прокаин и т.п.

Композиции антител, описанные здесь, могут быть приготовлены согласно способам, известным специалистам в данной области техники. Приготовление фармацевтических средств - это хорошо установленная область знаний, которая дополнительно описана в публикациях: Gennaro (ed.), Remington The Science and Practice of Pharmacy. 20<sup>th</sup> ed., Lippincott, Williams & Wilkins (2000) (ISBN: 0683306472); Ansel et al., Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 7<sup>th</sup> Ed., Lippincott Williams & Wilkins Publishers (1999) (ISBN: 0683305727) и Kibbe (ed.), Handbook of Pharmaceutical Excipients American Pharmaceutical Association. 3<sup>rd</sup> ed. (2000) (ISBN: 091733096X).

В одном из вариантов воплощения лекарственная форма антитела против  $\alpha 4$  может быть приготовлена с применением вспомогательных веществ, таких как натрия хлорид, натрия дигидрофосфат семи-водный, гидрофосфат одноосновного натрия и полисорбат-80. В другом варианте воплощения лекарственная форма антитела против  $\alpha 4$  может быть приготовлена в цитратном буфере, например, с pH 5, 5,5, 6, 6,5, 7 или 7,5. В другом варианте воплощения лекарственная форма антитела против  $\alpha 4$  может быть

приготовлена в растворе, содержащем 2, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14 или 15% сахарозы. Антитело может поставляться, например, в буферном растворе с концентрацией примерно 20 мг/мл и может храниться при 2-8°C.

Фармацевтические композиции также могут находиться в различных других формах. К ним относятся, например, жидкость, полутвердые и сухие лекарственные формы, такие как жидкие растворы (например, инъекционный и инфузионный растворы), дисперсии или суспензии, таблетки, драже, порошки, липосомы и суппозитории. Форма может зависеть от предполагаемого способа введения и терапевтического применения. В типичном случае композиции для агентов, описанных здесь, находятся в форме инъекционных или инфузионных растворов.

Такие композиции можно вводить парентеральным способом (например, внутривенной, подкожной, интраперитонеальной или внутримышечной инъекцией). Фразы "парентеральное введение" и "введенный парентерально", при использовании здесь, означают способы введения, отличные от энтерального и местного введения, обычно - с применением инъекции, и включающие, без ограничения, внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, внутрикапсульную, внутриглазничную, интракардиальную, внутрикожную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсульную, субарахноидальную, интраспинальную, эпидуральную и интратеральную инъекцию и инфузию.

Фармацевтические композиции в типичном случае должны быть стерильными и стабильными в условиях производства и хранения. Фармацевтические композиции также можно испытывать, чтобы удостовериться в их соответствии нормативным и промышленным стандартам для препаратов, предназначенных для введения.

Композиции могут быть приготовлены в виде раствора, микроэмульсии, дисперсии, липосомы или другой упорядоченной структуры, пригодной для высокой концентрации лекарственного средства. Стерильные инъекционные растворы можно приготовить добавлением агента, описанного здесь, в требуемом количестве в соответствующий растворитель с одним или с комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, по необходимости, с последующей стерилизацией с применением фильтрации. В общем случае дисперсии готовят добавлением агента, описанного здесь, в стерильный носитель, содержащий основную диспергирующую среду и другие требуемые ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных инъекционных растворов типичными способами приготовления являются вакуумная сушка и замораживание-высушивание, в результате которых получают порошок агента, описанного здесь, в смеси с любым дополнительным требуемым ингредиентом из их раствора, предварительно простерилизованного фильтрацией. Требуемая текучесть раствора может поддерживаться, например, с помощью применения оболочки, например, из лецитина, поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и применения поверхностно-активных веществ. Длительная абсорбция инъекционных композиций может быть достигнута включением в композицию агента, который замедляет абсорбцию, например, солей моностеарата и желатина.

#### **Введение**

Антитело, связывающееся с  $\alpha 4$ , можно вводить субъекту, например, человеку, с применением различных способов. Для многих применений путем введения является один из следующих: внутривенная инъекция или инфузия, подкожная инъекция или внутримышечная инъекция. Антитело, связывающееся с  $\alpha 4$ , можно вводить в виде фиксированной дозы или в дозе из расчета в мг/кг. Антитело можно вводить внутривенно (в/в) или подкожно (п/к). Например, антитело можно вводить в виде фиксированной унифицированной дозы от примерно 50 до 600 мг в/в, например, каждые 4 недели, или от примерно 50 до 100 мг п/к (например, 75 мг), например, по меньшей мере один раз в неделю (например, два раза в неделю). В одном из вариантов воплощения антитело вводят в/в с фиксированной унифицированной дозой 50, 60, 80, 100, 120, 130, 140, 150, 160, 180, 200, 300, 400, 500 мг или 600 мг, или выше. Введение дозы в/в можно проводить один или два, или три, или более раз в неделю, или один раз каждые две, три, четыре или пять недель, или менее часто.

В одном из вариантов воплощения антитело вводят п/к с фиксированной унифицированной дозой 50 мг, 60 мг, 70 мг, 75 мг, 80 мг, 100 мг или 120 мг, или выше. Введение дозы п/к можно проводить один или два, или три, или более раз в неделю, или один раз каждые две, три, четыре или пять недель, или менее часто.

Антитело против  $\alpha 4$  также можно вводить в виде ударной дозы - при дозировке примерно от 1 до 10 мг/кг, например, примерно 6,0, 4,0, 3,0, 2,0, 1,0 мг/кг. Модифицированные диапазоны доз включают дозу, которая составляет менее чем примерно 600 мг/субъект, примерно 400 мг/субъект, примерно 300 мг/субъект, примерно 250 мг/субъект, примерно 200 мг/субъект, примерно 150 мг/субъект, в типичном случае - для введения каждые четыре недели или один раз в месяц. Антитело, связывающееся с  $\alpha 4$ , можно вводить, например, каждые три-пять недель, например, на каждой четвертой неделе или ежемесячно.

Дозировку можно корректировать в соответствии с наблюдаемой у пациента скоростью клиренса ранее введенного антитела против  $\alpha 4$ . Например, пациенту можно не вводить вторую или последующую дозу до того, как уровень антител против  $\alpha 4$  в организме пациента не упадет до уровня ниже, чем зара-

нее заданный уровень. В одном из вариантов воплощения взятую у пациента пробу (например, пробу плазмы, сыворотки, крови, мочи или цереброспинальной жидкости (ЦСЖ)) анализируют на присутствие антител против  $\alpha 4$  и, если уровень антител против  $\alpha 4$  выше заранее заданного уровня, -пациенту не будут вводить вторую или последующую дозу. Если уровень антител против  $\alpha 4$  в организме пациента ниже заранее установленного уровня, то пациенту вводят вторую или последующую дозу. Пациенту, для которого определено, что его уровни антитела против  $\alpha 4$  слишком высокие (выше заранее заданного уровня), может быть проведено повторное тестирование через один или два, или три дня, или через неделю, и, если уровень антитела против  $\alpha 4$  в пробах пациента упал ниже заранее заданного уровня, -пациенту можно ввести вторую или последующую дозу антитела.

Доза также может быть выбрана таким образом, чтобы снизить или избежать выработки антител против антитела, связывающегося с  $\alpha 4$ , с целью достижения более чем 40, 50, 70, 75 или 80% насыщения субъединицы  $\alpha 4$ , достижения менее чем 80, 70, 60, 50 или 40% насыщения субъединицы  $\alpha 4$ , или предотвращения повышения уровня циркулирующих белых клеток крови.

В некоторых вариантах воплощения активный агент может быть приготовлен с носителем, который обеспечит защиту соединения от быстрого высвобождения, например, в виде рецептуры с контролируемым высвобождением, включая имплантаты и микроинкапсулированные системы доставки. Могут применяться биodeградируемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфир и полимолочная кислота. Многие способы приготовления таких рецептур запатентованы или общеизвестны. См., например, *Controlled Drug Delivery (Drugs and the Pharmaceutical Sciences)*, Second Edition, J. Robinson and V. H. L. Lee, eds., Marcel Dekker, Inc., New York, 1987.

Фармацевтические композиции можно вводить с помощью медицинских устройств. Например, фармацевтические композиции можно вводить с применением безыгольного изделия для подкожного введения, такого как изделия, раскрытые в патентах США под номерами 5399163, 5383851, 5312335, 5064413, 4941880, 4790824 или 4596556. Примеры хорошо известных имплантатов и модулей обсуждаются, например, в патенте США № 4487603, в котором описан имплантируемый микроинфузионный насос для дозирования лекарственных препаратов с контролируемой скоростью; в патенте США № 4486194, в котором описано терапевтическое изделие для введения лекарственных препаратов через кожу; в патенте США № 4447233, в котором описан медицинский инфузионный насос для доставки лекарственных препаратов при определенной скорости инфузии; в патенте США № 4447224, в котором описаны имплантируемые инфузионные аппараты с регулируемым потоком для непрерывной доставки лекарственного средства; в патенте США № 4439196, в котором описана осмотическая система доставки лекарственных средств с многокамерными отделениями; и в патенте США № 4475196, в котором описана осмотическая система доставки лекарственных средств. Несомненно, известно множество других подобных имплантатов, систем доставки и модулей.

Настоящее изобретение также предлагает устройство для введения первого и второго агента. Устройство может включать, например, одно или более отделений для хранения фармацевтических препаратов и может быть сконфигурировано таким образом, чтобы высвобождать унифицированные дозы первого и второго агентов. Первый и второй агенты могут храниться в одном и том же или в разных отделениях. Например, устройство может объединять агенты перед введением. Также возможно применение разных устройств для введения первого и второго агента.

Режимы дозирования корректируют таким образом, чтобы обеспечить требуемый ответ, такой как терапевтический ответ или комбинированный терапевтический эффект. В общем случае можно применять любое сочетание доз (приготовленных как отдельные или совместно) агента, связывающегося с VLA-4, и второго агента с целью доставки в организм субъекта обоих агентов в биодоступных количествах.

Форма единицы дозирования или "фиксированная доза", при использовании здесь, означает физически разделенные единицы, приготовленные как единичные дозировки для субъектов, получающих лечение; при этом каждая единица содержит заранее установленное количество активного соединения, рассчитанное для получения требуемого терапевтического эффекта, в ассоциации с требуемым фармацевтическим носителем и, необязательно, в ассоциации с другим агентом.

Фармацевтическая композиция может включать "терапевтически эффективное количество" агента, описанного здесь. Такие эффективные количества можно определить на основании комбинаторного эффекта введенных первого и второго агентов. Терапевтически эффективное количество агента может также меняться в зависимости от таких факторов как стадия заболевания, возраст, пол и вес пациента, и способность соединения вызывать требуемый ответ у пациента, такой как улучшение по меньшей мере одного параметра нарушения, например, параметра рассеянного склероза, или уменьшение интенсивности по меньшей мере одного симптома нарушения, например, симптома рассеянного склероза, такого как мышечная атрофия, атаксия и тремор. Терапевтически эффективным количеством является также количество, при котором любые токсические или вредные эффекты композиции перевешиваются терапевтически полезными эффектами.

### Устройства и наборы

Композиции, содержащие антитело, описанное здесь, можно вводить с помощью медицинского устройства. Может быть разработано устройство с такими особенностями, как портативность, хранение при комнатной температуре и легкость в применении, таким образом, что его сможет применять в чрезвычайных ситуациях, например, не прошедший обучение субъект или персонал, оказывающий первую помощь, в условиях нахождения вне помещений медицинского назначения и в отсутствие другого медицинского оборудования. Устройство может включать, например, одно или более отделений для хранения фармацевтических препаратов, которые содержат антитело, связывающееся с  $\alpha 4$ , и может быть сконфигурировано таким образом, чтобы высвободить одну или более унифицированных доз агента.

Например, фармацевтическую композицию могут вводить с применением устройства для чрескожной доставки, такого как шприц, включая шприц для подкожного введения или многокамерный шприц. Другие подходящие устройства для доставки включают стенты, катетеры, микроиглы и имплантируемые устройства с контролируемым высвобождением. Композицию можно вводить внутривенно с применением стандартного оборудования для в/в введения, включая, например, в/в трубки со встроенными фильтрами или без фильтров. В некоторых вариантах воплощения устройство будет являться шприцем для применения при подкожном или внутримышечном введении.

Фармацевтические композиции можно вводить с помощью медицинских устройств. Например, фармацевтические композиции можно вводить с применением безыгольного изделия для подкожного введения, такого как изделия, раскрытые в патентах США под номерами 5399163, 5383851, 5312335, 5064413, 4941880, 4790824 или 4596556. Примеры хорошо известных имплантатов и модулей описаны, например, в патенте США № 4487603, в котором описан имплантируемый микроинфузионный насос для дозирования лекарственных препаратов с контролируемой скоростью; в патенте США № 4486194, в котором описано терапевтическое изделие для введения лекарственных препаратов через кожу; в патенте США № 4447233, в котором описан медицинский инфузионный насос для доставки лекарственных препаратов при определенной скорости инфузии; в патенте США № 4447224, в котором описаны имплантируемые инфузионные аппараты с регулируемым потоком для непрерывной доставки лекарственного средства; в патенте США № 4439196, в котором описана осмотическая система доставки лекарственных средств с многокамерными отделениями; и в патенте США № 4475196, в котором описана осмотическая система доставки лекарственных средств. Терапевтическая композиция также может находиться в виде биodeградируемой или бионедegradiруемой лекарственной формы пролонгированного действия для подкожного или внутримышечного введения. Способы получения таких композиций известны специалистам в данной области техники. Непрерывное введение также может достигаться с помощью имплантируемой или внешней помпы. Введение также можно проводить периодически, например, путем одной ежедневной инъекции, или непрерывно при низкой дозе, например, в виде лекарственной формы пролонгированного действия. Устройство доставки может быть модифицировано таким образом, чтобы оптимально подходить для введения антитела, связывающегося с  $\alpha 4$ . Например, шприц можно силиконизировать в такой степени, чтобы он оптимально подходил для хранения и введения антитела. Несомненно, известно множество других подобных имплантатов, систем доставки и модулей.

Настоящее изобретение также предлагает устройство для введения первого и второго агента (например, антитела и второго агента). Устройство может включать, например, одно или более отделений для хранения фармацевтических препаратов и может быть сконфигурировано таким образом, чтобы высвободить унифицированные дозы первого и второго агентов. Первый и второй агенты могут храниться в одном и том же или в разных отделениях. В одном из вариантов воплощения устройство объединяет агенты перед введением. В некоторых вариантах воплощения первый и второй агенты вводят с применением разных устройств.

Антитело, связывающееся с  $\alpha 4$ , может поставляться в наборе. В одном из вариантов воплощения набор включает (а) контейнер, в котором содержится композиция, включающая высокую концентрацию антитела, связывающегося с VLA-4, необязательно, (б) контейнер, в котором содержится композиция, включающая второй агент, и, необязательно, (в) информационный материал. Информационный материал может являться описанием, инструкцией, рекламным или иным материалом, который имеет отношение к способам, описанным здесь, и/или к применению агентов с терапевтическими целями. В одном из вариантов воплощения набор также включает второй агент. Например, набор включает первый контейнер, в котором содержится композиция, включающая антитело, связывающееся с  $\alpha 4$ , и второй контейнер, в котором содержится второй агент.

Информационный материал набора не ограничен по форме. В одном из вариантов воплощения информационный материал может включать информацию о получении антитела, концентрации, дате истечения срока годности, серии или информации о месте производства и т.п. В одном из вариантов воплощения информационный материал имеет отношение к способам введения антитела, связывающегося с  $\alpha 4$ , например, в пригодной дозе, лекарственной форме или пригодным способом введения (например, в дозе, лекарственной форме или способом введения, описанными здесь) с целью лечения субъекта, страдающего от острого нарушения, такого как повреждение спинного мозга или травматическое поврежде-

ние головного мозга, или от воспалительного заболевания (например, рассеянного склероза), или субъекта, у которого имеется риск возникновения эпизода, связанного с воспалительным заболеванием. Информация может быть представлена в различных форматах, включая напечатанный текст, материал для чтения на компьютере, видеозапись или аудиозапись, или информация, указывающая ссылку или отсылающая к существенному материалу.

В дополнение к агенту композиция в наборе может включать другие ингредиенты, такие как растворитель или буферный раствор, стабилизирующий агент или консервант. Агент может быть представлен в любой форме, например, в виде жидкости, сухой или лиофилизированной форме, и в существенной степени чистым и/или стерильным. Если агенты представлены в виде жидкого раствора, то жидкий раствор в типичном случае является водным раствором. Если агенты представлены в виде сухой формы, восстановление в общем случае проводят добавлением подходящего растворителя. Растворитель, например, стерильная вода или буферный раствор, может, необязательно, поставляться в наборе.

Набор может включать один или более контейнеров для композиции или композиций, содержащих агенты. В некоторых вариантах воплощения набор содержит отдельные контейнеры, разделители или отделения для композиции и информационного материала. Например, композиция может содержаться в бутылки, флаконе или шприце, а информационный материал может находиться в пластиковом кармане или пакете. В других вариантах воплощения отдельные элементы набора содержатся в едином неразделенном контейнере. Например, композиция находится в бутылки, флаконе или шприце, к которым прикреплен информационный материал в форме этикетки. В некоторых вариантах воплощения набор включает множество (например, упаковку) единичных контейнеров, каждый из которых содержит одну или более унифицированных лекарственных форм (например, лекарственную форму, описанную здесь) агентов. Контейнер может включать комбинированную единицу дозирования, например, единицу, которая включает как антитело, связывающееся с  $\alpha 4$ , так и второй агент, например, в требуемом соотношении. Например, набор может включать множество шприцов, ампул, пакетов из фольги, блистерных упаковок или медицинских устройств, каждое из которых содержит, например, единичную комбинированную унифицированную дозу. Контейнеры набора могут быть воздухонепроницаемыми, водонепроницаемыми (например, непроницаемыми для изменения влажности или испарения) и/или непроницаемыми для света.

Набор, необязательно, включает устройство, пригодное для введения композиции, например, шприц или другое подходящее устройство для доставки. Устройство может предоставляться предварительно заполненным одним или обоими агентами или может быть пустым, но подходящим для наполнения.

### Онкология

Антитела, связывающиеся с  $\alpha 4$ , и способы, описанные здесь, можно применять для лечения онкологического заболевания, включая солидные раковые опухоли и гемобластозы. Примеры солидных раковых опухолей включают саркомы и карциномы, например, легких, груди, поджелудочной железы, толстой кишки, простаты, мочевого пузыря и головного мозга. Гемобластозы включают такие онкологические заболевания, как множественная миелома, лейкемия и лимфома.

Предложены способы лечения пациентов с гемобластозом с применением композиции, содержащей антитело, связывающееся с  $\alpha 4$ , такое как антитело против VLA-4, описанное здесь. Гемобластозы представляют собой онкологические заболевания кроветворной и иммунной систем организма. Онкологические заболевания этого типа затрагивают кровь, костный мозг и/или лимфатические узлы. Гемобластозы включают лейкемии, такие как острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), острый миелогенный лейкоз (ОМЛ), хронический миелолейкоз (ХМЛ), хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), острый промиелоцитарный лейкоз, острый эритромиелоз и волосатоклеточный лейкоз (ВКЛ); лимфомы, такие как ходжкинская лимфома и неходжкинская лимфома; и множественные миеломы; макроглобулинемию Вальденстрема; миелодиспластический синдром (МДС) (который может привести к ОМЛ); миелопролиферативный синдром, такой как истинная полицитемия (также известная как первичная полицитемия, эритремия, болезнь Вакеза), идиопатический тромбоцитоз (ИТ), миелофиброз, болезнь тяжелых цепей; и амилоидоз, вызванный болезнью легких цепей.

Пациенты с гемобластозом могут быть выявлены при подсчете элементов крови и анализе мазка крови, например, с помощью световой микроскопии, которая пригодна для выявления злокачественных клеток. Биопсия, например, костного мозга, также может применяться для выявления злокачественных клеток, а биопсия лимфатического узла может быть полезна для выявления лимфаденопатии.

Антитело, связывающееся с  $\alpha 4$  (например, гуманизированное антитело против VLA-4, такое как NuNP1/2, H1L0, H1L1, H1L2 или H1L3), полезно для лечения лейкемии, такой как ОМЛ. Лейкемии - это онкологические заболевания, которые начинаются с костного мозга, при этом злокачественными клетками являются белые клетки крови (лейкоциты). ОМЛ (также называемый острым миелоцитарным лейкозом, острым миелобластным лейкозом, острым гранулоцитарным лейкозом и острым нелимфобластным лейкозом) является злокачественным заболеванием, которое возникает либо в гранулоцитах, либо в моноцитах. ОМЛ характеризуется неконтролируемым, чрезмерным ростом и накоплением клеток, назы-

ваемых лейкоблантами, которые не способны функционировать как нормальные клетки крови, и блокадой образования нормальных клеток костного мозга, что ведет к дефициту красных клеток (анемии) и тромбоцитов (тромбоцитопении), и нормальных белых клеток (особенно нейтрофилов, т.е. к нейтропении) в крови.

Все подтипы ОМЛ пригодны для лечения с применением антитела, связывающегося с VLA-4. Подтипы ОМЛ классифицируют на основании стадии развития, которой достигли миелобласты на момент постановки диагноза. Категории и подтипы позволяют врачу решать, какое лечение будет наиболее эффективным для конкретного типа клеток и как быстро может прогрессировать заболевание. Выделяют следующие подтипы: M0 - миелобластный, по результатам специального анализа; M1 миелобластный, без признаков созревания; M2 - миелобластный, с признаками созревания; M3 - промиелоцитарный; M4 - миеломоноцитарный; M5 - моноцитарный; M6 - эритролейкоз и M7 - мегакриобластный. Антитело против VLA-4 можно вводить вместе со вторым агентом, который подходит для конкретного подтипа ОМЛ. Например, острый промиелоцитарный лейкоз (ОПЛ) и острый моноцитарный лейкоз являются подтипами ОМЛ, которые требуют иного лечения, чем другие подтипы ОМЛ. Второй агент для лечения ОПЛ может включать полностью транс-ретиноевую кислоту (ПТРК) или антимиетаболит, такой как цитарабин. Второй агент для лечения острого моноцитарного лейкоза может включать аналог дезоксиаденозина, такой как 2-хлор-2'-дезоксаденозин (2-ХДА).

Факторы риска развития ОМЛ включают наличие определенных генетических нарушений, таких как синдром Дауна, анемия Фанкони, синдром Швахмана-Даймонда и др. Пациенту с ОМЛ и генетическим нарушением можно вводить антитело, связывающееся с VLA-4, и второй агент для лечения симптома генетического нарушения. Например, пациенту с ОМЛ и анемией Фанкони можно вводить антитело, связывающееся с VLA-4, и антибиотик.

Другие факторы риска развития ОМЛ включают химиотерапию или лучевую терапию при лечении различных типов раковых заболеваний, курение табака и воздействие больших количеств бензола.

Другие онкологические заболевания, подходящие для лечения с применением антитела, связывающегося с  $\alpha 4$ , включают солидные опухоли, такие как саркомы и карциномы (например, фибросаркома, миксосаркома, липосаркома, хондросаркома, остеогенная саркома, хордома, ангиосаркома, эндотелиосаркома, лимфангиосаркома, лимфангиоэндотелиосаркома, синовиома, мезотелиома, опухоль Юинга, лейомиосаркома, рабдомиосаркома, рак яичников, плоскоклеточная карцинома, базально-клеточная эпителиома, аденокарцинома, карцинома потовой железы, карцинома сальной железы, папиллярная карцинома, папиллярные аденокарциномы, цистаденокарцинома, медуллярная карцинома, бронхогенная карцинома, карцинома клеток почки, гепатома, карцинома желчного протока, хориокарцинома, семинома, эмбриональная карцинома, опухоль Вильма, рак шейки матки, рак матки, рак яичка, мелкоклеточный рак легкого, эпителиальная карцинома, глиома, астроцитомы, медуллобластома, краниофарингиома, эпендимома, пинеалома, гемангиобластома, невринома слухового нерва, олигодендроглиома, шваннома, менингиома, меланома, нейробластома и ретинобластома).

#### Другие нарушения

Композиции и способы, описанные здесь, также можно применять для лечения других воспалительных, иммунных или аутоиммунных нарушений, например, воспаления центральной нервной системы (например, помимо рассеянного склероза, менингита, нейромиеелита зрительного нерва, нейросаркоидоза, васкулита ЦНС, энцефалита и поперечного миелита); отторжения тканевого или органного трансплантата или реакции "трансплантат против хозяина", острого повреждения ЦНС, например, инсульта или повреждения спинного мозга (ПСМ); хронического заболевания почек; аллергии, например, аллергической астмы, от умеренных до тяжелых аллергических ринитов, аллергических заболеваний глаз; сахарного диабета I типа; воспалительных заболеваний кишечника, например, болезни Крона, неспецифического язвенного колита (например, для лечения или поддержания ремиссии); эозинофильного гастроэнтерита; миастении гравис; фибромиалгии; ревматоидных/иммунологических нарушений, таких как нарушения суставов, например, ревматоидный артрит, псориатический артрит; дерматологических нарушений, таких как воспалительные/иммунные кожные нарушения, например, псориаза, витилиго, дерматита (например, диффузного нейродермита), красного плоского лишая, от умеренной до тяжелой хронической крапивницы; системной красной волчанки (СКВ; например, волчаночного нефрита); склеродермы (например, прогрессирующего системного склероза (ПСС), такого как ПСС легкого); острой или хронической первичной эозинофильной пневмонии; синдрома Гужеро-Шегрена; острого коронарного синдрома (ОКС); острого инфаркта миокарда; атеросклероза; и фиброзных нарушений, например, легочного фиброза (например, идиопатического легочного фиброза), фиброза легких (например, индуцированного лучевой терапией), миелофиброза, цирроза печени, мезангиального пролиферативного гломерулонефрита, серповидного гломерулонефрита, диабетической невропатии и интерстициального фиброза почки.

Композиции и способы, описанные здесь, также можно применять для лечения неврологических нарушений, таких как церебральная ишемия, включая профилактику у пациентов с транзиторными ишемическими атаками и/или стенозом артерий. Другие примеры неврологических нарушений включают хроническую воспалительную демиелинизирующую полинейропатию (ХВДП); синдром Гийена-Барре

(СГБ); заболевания глаз, такие как макулярная дегенерация (например, влажная форма макулярной дегенерации) и передняя ишемическая нейропатия зрительного нерва; невропатическую боль (например, симптоматическую невропатическую боль); болезнь Альцгеймера; боковой амиотрофический склероз (БАС) (например, болезнь-модифицирующий БАС) и болезнь Паркинсона.

Композиции и способы, описанные здесь, также можно применять для лечения пациентов, которые перенесли трансплантацию, например, трансплантацию почки, сердца или костного мозга.

#### **Рассеянный склероз**

Композиции, содержащие антитело, связывающееся с альфа-4, описанное здесь, полезны для лечения воспалительных заболеваний, таких как рассеянный склероз (РС) Множественный склероз - это заболевание центральной нервной системы, которое характеризуется воспалением и потерей миелиновых оболочек.

Пациентов с РС можно выявить по критериям, на основании которых ставится диагноз клинически выраженного РС, как указано на семинаре по диагностике РС (Poser et al., Ann. Neurol. 13:227, 1983). Например, пациент с клинически выраженным РС перенес два обострения, и имеется либо клиническое доказательство наличия двух очагов, либо клиническое доказательство наличия одного очага и параклиническое доказательство наличия второго, отличного от первого, очага. Выраженный РС также можно диагностировать по доказательству двух обострений и наличию олигоклональных полос IgG в цереброспинальной жидкости или по сочетанию обострения, клинического доказательства наличия двух очагов и наличия олигоклональной полосы IgG в цереброспинальной жидкости. Для диагностики РС также можно применять критерии МакДональда. (McDonald et al., 2001, "Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the Diagnosis of Multiple Sclerosis," Ann. Neurol. 50:121-127). Критерии МакДональда включают применение полученных с помощью МРТ доказательств ухудшения состояния ЦНС с течением времени, которые можно использовать для постановки диагноза РС в отсутствие множественных клинических обострений. Эффективность лечения рассеянного склероза может быть оценено несколькими различными способами. Для измерения эффективности лечения можно применять следующие параметры. Два примера критериев включают: EDSS (расширенная шкала инвалидизации) и выявление обострений при МРТ (магнитно-резонансной томографии). Расширенная шкала инвалидизации (EDSS) - это способ измерения клинического ухудшения, вызванного РС (Kurtzke, Neurology 33:1444, 1983). Проводят оценку восьми функциональных систем по типу и степени тяжести неврологического ухудшения. Кратко, перед началом лечения проводят оценку у пациента ухудшений в следующих системах: пирамидальной, мозжечка, ствола мозга, сенсорной, кишечника и мочевого пузыря, зрительной, церебральной и др. С заданными интервалами проводят последующее врачебное наблюдение. Размах шкалы составляет от 0 (норма) до 10 (смерть в результате РС). Уменьшение на один полный шаг шкалы свидетельствует об эффективности лечения (Kurtzke, Ann. Neurol. 36:573-79, 1994). Также можно проводить диагностику у пациентов с применением других критериев, известных специалистам в данной области техники.

Обострения определяют как появление нового симптома, который характерен для РС и сопровождается соответствующим новым неврологическим нарушением (IFNB MS Study Group, см. ранее). Кроме того, обострение должно длиться по меньшей мере 24 ч, и ему должны предшествовать стабильное состояние или улучшение по меньшей мере в течение 30 дней. Кратко, пациенты проходят стандартный неврологический осмотр у клинициста. Обострения могут быть легкими, умеренными или тяжелыми, в соответствии с изменениями оценки по шкале оценки неврологического статуса (Sipe et al., Neurology 34:1368, 1984). Определяют годовую частоту обострений и долю пациентов, у которых не наблюдалось обострений.

Терапию можно считать эффективной, если имеется статистически значимое различие в частоте или доле пациентов без обострений или пациентов без рецидивов между группой, получавшей лечение, и группой, получавшей плацебо, для любого из этих показателей. Кроме того, также можно измерять время до первого обострения и длительность, и степень тяжести обострения. В этом случае мерой эффективности лечения является статистически значимое различие во времени до первого обострения или длительности и степени тяжести обострения между группой, получавшей лечение, и контрольной группой. Особое внимание следует обращать на период без обострения или без рецидива более чем один год, 18 месяцев или 20 месяцев. Эффективность также можно оценить с применением любого способа, известного специалистам в данной области техники, например, путем оценки симптомов РС, включая улучшение подвижности, с помощью теста с ходьбой в течение заданного времени - самого по себе или в сочетании с другими критериями.

Также можно оценить эффективность введения первого агента и, необязательно, второго агента, на основании одного или нескольких следующих критериев: частота ОБМ-реактивных Т-клеток, определенная ограниченным разведением, пролиферативный ответ линий и клонов ОБМ-реактивных Т-клеток, профиль цитокинов линий и клонов Т-клеток в ответ на ОБМ, полученный от пациентов. Об эффективности свидетельствует снижение частоты реактивных клеток, уменьшение включения тимидина с изменением пептида по сравнению с нативным и снижение уровня TNF и IFN- $\alpha$ .

Клинические показатели включают частоту рецидивов в одно- и двухгодичном интервалах и измене-



ние оценки по шкале EDSS, включая время до прогрессирования заболевания от исходного уровня до 1,0 единицы по шкале EDSS, которое длилось в течение шести месяцев. По кривой выживаемости по Каплану-Мейеру на эффективность указывает задержка непрерывного прогрессирования недееспособности. Другие критерии включают изменение площади и объема T<sub>2</sub>-взвешенного изображения при МРТ и количество, и объем очагов, определенных по изображениям с контрастным усилением гадолинием.

МРТ можно применять для измерения активных очагов с использованием контрастно-усиленной томографии с гадолинием-ДТПА (McDonald et al. *Ann. Neurol.* 36:14, 1994) или для определения расположения и степени развития очагов, применяя методики T<sub>2</sub>-взвешивания. Кратко, получают МРТ-изображение на исходном уровне. При каждом последующем исследовании используют такие же плоскость получения изображения и положение пациента. Можно выбрать положение и последовательности получения изображений так, чтобы максимизировать вероятность выявления очага и облегчить слежение за очагом. При каждом последующем исследовании можно использовать такие же положение и последовательность получения изображений. Наличие, расположение и степень развития очагов РС могут определить радиологи. Можно очертить площадь очагов и суммировать, слой за слоем, для определения суммарной площади очагов. Можно провести три анализа: доказательство нового очага, частота появления активных очагов, процентное изменение площади очага (Paty et al., *Neurology* 43:665, 1993). Улучшение, наступившее в результате терапии, можно установить по статистически значимому улучшению у отдельного пациента по сравнению с исходным уровнем или в группе, получавшей лечение, по сравнению с группой, получавшей плацебо.

К примерам симптомов, связанных с рассеянным склерозом, которые можно лечить способами, описанными здесь, относятся: неврит зрительного нерва, диплопия, нистагм, глазные дисметрии, внутренняя офтальмоплегия, фосфены, вызванные движением и звуком, афферентный дефект зрачка, парезы, монопарез, парапарез, гемипарез, квадрапарез, плегия, параплегия, гемиплегия, тетраплегия, квадраплегия, спастичность, дизартрия, атрофия мышц, спазмы, судороги, гипотония, подергивание мышц, миоклонус, миокимия, синдром беспокойных ног, отвислая стопа, расстройства рефлекторной деятельности, парестезии, анестезия, невралгии, нейропатическая и нейрогенная боль, симптом Лермитта, проприоцептивная дисфункция, невралгии тройничного нерва, атаксия, тремор намерения, дисметрии, вестибулярная атаксия, головокружение, речевая атаксия, дистония, дисдиадохокинезия, частые мочеиспускания, спастичность мочевого пузыря, снижение тонуса мочевого пузыря, детрузорно-сфинктерная диссинергия, эректильная дисфункция, аноргазмия, фригидность, запоры, императивные позывы к дефекации, недержание кала, депрессия, когнитивные расстройства, слабоумие, колебания настроения, эмоциональная лабильность, эйфория, биполярный синдром, тревога, афазия, дисплазии, утомляемость, симптом Утхоффа, гастроэзофагеальный рефлюкс и нарушения сна.

Каждый случай РС представляет собой одну из нескольких схем проявлений и последующего течения заболевания. Наиболее часто РС сперва проявляется в виде серии обострений, за которыми следуют полные или частичные ремиссии, при которых степень тяжести симптомов по непонятной причине снижается только для того, чтобы вернуться после периода стабильного состояния. Такую форму называют возвратно-ремиттирующим (ВР) РС. Первично-прогрессирующий (ПП) РС характеризуется постепенным клиническим ухудшением без выраженных ремиссий, хотя могут наблюдаться временная стабилизация или незначительное снижение степени тяжести симптомов. Вторично-прогрессирующий (ВП) РС начинается с возвратно-ремиттирующего течения, за которым следует более поздний переход к первично-прогрессирующему течению. Редко наблюдается прогрессирующе-рецидивирующее (ПР) течение, при котором заболевание имеет прогрессирующий путь развития, прерываемый острыми обострениями. ПП, ВП и ПР формы иногда объединяют и называют хроническим прогрессирующим РС.

У нескольких пациентов отмечен злокачественный РС, определяемый как быстрое и неослабевающее ухудшение, приводящее к существенной потере дееспособности или даже к смерти вскоре после начала заболевания. Это ухудшение можно остановить или замедлить введением комбинированного терапевтического средства, описанного здесь.

Введение антитела против  $\alpha 4$ , предложенного здесь, может быть эффективно для ослабления одного или нескольких симптомов РС, такого как один или более из симптомов, описанных выше. Например, введение антитела против  $\alpha 4$ , описанного здесь, можно применять для лечения первичного или вторичного прогрессирующего рассеянного склероза (ППРС или ВПРС, соответственно), и лечение с применением антитела против  $\alpha 4$  может быть эффективным для предотвращения рецидива.

В дополнение или перед проведением исследований с участием людей для оценки эффективности применения двух агентов можно использовать модель на животных. Примером модели рассеянного склероза у животных является модель экспериментального аутоиммунного энцефалита (ЭАЭ) у мышей, например, как описано в публикациях (Tuohy et al. (*J. Immunol.* (1988) 141: 1126-1130), Sobel et al. (*J. Immunol.* (1984) 132: 2393-2401) и Traugott (*Cell Immunol.* (1989) 119: 114-129). Мышам можно ввести первый и второй агент, описанные здесь, перед индукцией ЭАЭ. Затем мышам оценивают по характерным критериям с целью определения эффективности применения двух агентов в модели.

### Создание антител

Рекомбинантные антитела, которые связываются с альфа-4, можно создать с применением способов *in vivo* или *in vitro*, таких как фаговый дисплей. Способы могут применяться для получения CDR против  $\alpha 4$  для применения в антителах с пересаженными CDR, описанных здесь. Дополнительно такие способы как фаговый дисплей, можно применять для выбора таких CDR в контексте каркасных областей эмбрионального типа, раскрытых здесь, например, с помощью библиотеки, в которой каркасная область является каркасной областью эмбрионального типа.

В заявке EP 239400 (Winter et al.) описан способ изменения антител путем замены (в пределах данной вариабельной области) их областей, определяющих комплементарность (CDR), принадлежащих одному биологическому виду, на области, принадлежащие другому виду. Антитела с замещенными CDR с меньшей вероятностью способны вызывать иммунный ответ у человека по сравнению с истинно химерными антителами, так как антитела с замещенными CDR содержат существенно меньше не принадлежащих человеку компонентов. (Riechmann et al., 1988, Nature 332, 323-327; Verhoeyen et al., 1988, Science 239, 1534-1536). В типичном случае CDR антитела мыши замещают соответствующие области в антителе человека, применяя технологию рекомбинантных нуклеиновых кислот, с получением последовательностей, кодирующих требуемое замещенное антитело. Можно добавить сегменты генов консервативных областей антитела человека требуемого изотипа (обычно гамма I - для CH, и капша - для CL) и совместно экспрессировать гены тяжелой и легкой цепей в клетках млекопитающих с получением растворимого антитела. Большие неиммунизированные библиотеки в формате фагового дисплея также можно применять для выделения высокоаффинных антител, которые можно применять для разработки терапевтических средств для человека, используя стандартную фаговую технологию (см., например, Hoogenboom et al. (1998) Immunotechnology 4:1-20, и Hoogenboom et al. (2000) Immunol Today 2:371-8; U.S. 2003-0232333).

Антитело против  $\alpha 4$  или фрагмент такого антитела, описанные здесь, могут узнавать эпитопы субъединицы  $\alpha 4$ , которые вовлечены в связывание с собственным лигандом, например, с VCAM-1 или фибронектином. Антитела, описанные здесь, могут ингибировать один или более из этих собственных лигандов (например, VCAM-1 и фибронектин).

В некоторых вариантах воплощения антитела, предложенные здесь, могут взаимодействовать с VLA-4 на поверхности клеток, например, лимфоцитов, но не вызывают агрегации клеток.

Пример антитела, связывающегося с  $\alpha 4$ , содержит одну или более CDR, например, все три CDR тяжелой цепи (HC) и/или все три CDR легкой цепи (LC) конкретного антитела, раскрытого здесь, или CDR, которые в сумме по меньшей мере на 80, 85, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98, 99% идентичны такому антителу. В одном из вариантов воплощения гипервариабельные петли H1 и H2 имеют ту же самую каноническую структуру, что и соответствующие петли антитела, описанного здесь. В одном из вариантов воплощения гипервариабельные петли L1 и L2 имеют ту же самую каноническую структуру, что и соответствующие петли антитела, описанного здесь.

В одном из вариантов воплощения аминокислотная последовательность последовательности вариабельного домена в составе HC и/или LC по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 92, 95, 97, 98, 99 или 100% идентична аминокислотной последовательности вариабельного домена в составе HC и/или LC антитела, описанного здесь. Аминокислотная последовательность последовательности вариабельного домена в составе HC и/или LC может отличаться по меньшей мере по одной аминокислоте, но не более чем по десяти, восьми, шести, пяти, четырем, трем или двум аминокислотам, от соответствующей последовательности антитела, описанного здесь. Например, различия могут в основном или полностью располагаться в каркасных областях.

Аминокислотные последовательности последовательностей вариабельных доменов HC и LC могут кодироваться последовательностью нуклеиновой кислоты, которая гибридизуется в высокой степени жестких условиях с последовательностью нуклеиновой кислоты, описанной здесь, или с таковой, кодирующей вариабельный домен или аминокислотную последовательность, описанные здесь. В одном из вариантов воплощения аминокислотные последовательности одной или более каркасных областей, (например, FR1, FR2, FR3 и/или FR4) вариабельного домена в составе HC и/или LC по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 92, 95, 97, 98, 99 или 100% идентичны соответствующим каркасным областям вариабельных доменов в составе HC и LC антитела, описанного здесь. В одном из вариантов воплощения одна или более каркасных областей тяжелой или легкой цепей (например, HC FR1, FR2 и FR3) по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 100% идентичны последовательности соответствующих каркасных областей из антитела человека эмбрионального типа.

Вычисление "гомологии" или "идентичности последовательностей" между двумя последовательностями (эти термины используются здесь как взаимозаменяемые) проводят следующим образом. Для целей оптимального сравнения последовательности выравнивают (например, могут вноситься пропуски в одну или обе из первой и второй аминокислотных последовательностей или последовательностей нуклеиновых кислот для оптимального выравнивания, и негомологичные последовательности могут не учитываться при проведении сравнения). Оптимальное выравнивание определяют как получение наилучшей

оценки при применении программы GAP из пакета программного обеспечения GCG с матрицей замен Blossum 62 и штрафом за пропуск, равным 12, штрафом за удлинение пропуска, равным 4, и штрафом за пропуск со сдвигом рамки считывания, равным 5. После этого сравнивают аминокислотные остатки или нуклеотиды в соответствующих положениях аминокислот или положениях нуклеотидов. Если положение в первой последовательности занято тем же аминокислотным остатком или нуклеотидом, что находится в соответствующем положении во второй последовательности, то молекулы идентичны по этому положению (при использовании здесь термин "идентичность" аминокислоты или нуклеиновой кислоты эквивалентен термину "гомология" аминокислоты или нуклеиновой кислоты). Процент идентичности между двумя последовательностями является функцией от количества идентичных положений, которые делают эти последовательности.

При использовании здесь термин "гибридуется в высокой степени жестких условиях" описывает условия гибридизации и отмывки. Руководство по проведению реакций гибридизации можно найти в публикации *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6, содержание которой включено сюда в качестве ссылки. В этой публикации описаны как водные, так и неводные способы, и применяться могут любые из них. В высокой степени жесткие условия гибридизации включают гибридизацию в  $6\times\text{SSC}$  примерно при  $45^\circ\text{C}$ , а затем - одну или более отмывок в  $0,2\times\text{SSC}$  с  $0,1\%$  ДСН при  $65^\circ\text{C}$  или в существенной степени схожие условия.

#### Получение антител

Антитела можно получать в прокариотических и эукариотических клетках. В одном из вариантов воплощения антитела (например, scFvs) экспрессируют в клетке дрожжей, таких как *Pichia* (см., например, Powers et al. (2001) *J. Immunol. Methods* 251:123-35), *Hansenula* или *Saccharomyces*.

В одном из вариантов воплощения антитела, в частности, полноразмерные антитела, например, IgG, получают в клетках млекопитающих. Примеры клеток-хозяев, принадлежащих млекопитающим, для экспрессии рекомбинантных белков включают клетки яичника китайского хомячка (клетки CHO) (в том числе клетки dhfr- CHO, описанные в работе Urlaub and Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220, использованные с селективируемым маркером DHFR, например, как описано в работе Kaufman and Sharp (1982) *Mol. Biol.* 159:601-621), клеточные линии лимфоцитов, например, клетки миеломы NS0 и клетки SP2, клетки COS, клетки K562 и клетки, полученные от трансгенных животных, например, трансгенных млекопитающих. Например, клетка является эпителиальной клеткой млекопитающего.

Помимо последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей домен иммуноглобулина, рекомбинантные экспрессионные векторы могут нести дополнительные последовательности нуклеиновой кислоты, такие как последовательности, регулирующие репликацию вектора в клетках-хозяевах (например, ориджины репликации), и гены селективируемых маркеров. Ген селективируемого маркера облегчает проведение отбора клеток-хозяев, в которые был внедрен вектор (см., например, патенты США под номерами 4399216, 4634665 и 5179017). Примеры генов селективируемых маркеров включают ген дигидрофолатредуктазы (DHFR) (для применения в dhfr-клетках-хозяевах с селекцией/амплификацией в присутствии метотрексата) и ген neo (для селекции в присутствии G418).

Например, в системе для экспрессии рекомбинантного антитела (например, полноразмерного антитела или его антигенсвязывающей части) рекомбинантный экспрессионный вектор, кодирующий как тяжелую цепь, так и легкую цепь антитела, внедряют в клетки dhfr-CHO путем трансфекции, опосредованной фосфатом кальция. В составе рекомбинантного экспрессионного вектора каждый из генов тяжелой и легкой цепей антитела функционально соединен с энхансерными/промоторными регуляторными элементами (например, полученными от SV40, CMV, аденовируса и т.п., такими как энхансер CMV/промоторный регуляторный элемент AdMLP или энхансер SV40/промоторный регуляторный элемент AdMLP), с целью получения высоких уровней транскрипции генов. Рекомбинантный экспрессионный вектор также несет ген DHFR, который позволяет проводить отбор клеток CHO, которые были трансфицированы вектором, при помощи метотрексат-зависимого отбора/амплификации. Отобранные трансформированные клетки-хозяева культивируют, чтобы произошла экспрессия тяжелой и легкой цепей антитела, и извлекают интактное антитело из культуральной среды. Для приготовления рекомбинантного экспрессионного вектора, трансфекции клеток-хозяев, отбора трансформантов, культивирования клеток-хозяев и извлечения антитела из культуральной среды применяют стандартные молекулярно-биологические методики. Например, некоторые антитела можно выделить с помощью аффинной хроматографии с использованием белка A или белка G. Например, очищенные антитела, связывающиеся с  $\alpha 4$ , можно сконцентрировать до концентрации от примерно 100 мг/мл до примерно 200 мг/мл, применяя методики концентрирования белков, известные специалистам в данной области техники.

Антитела также могут включать модификации, например, модификации, которые изменяют функции Fc, например, для снижения или прекращения взаимодействия с рецептором Fc или с C1q, или с ними обоими. Например, консервативная область IgG4 человека может содержать мутацию Ser на Pro в положении остатка 228 для фиксации шарнирной области. Аминокислотная последовательность IgG4 Fc (шарнир + домен CH2 + домен CH3) представлена на фиг. 5.

В еще одном примере консервативная область IgG1 человека может быть мутирована по одному

или нескольким остаткам, например, одному или нескольким из остатков 234 и 237, например, согласно нумерации, принятой в патенте США № 5648260. Другие примеры модификаций включают модификации, описанные в патенте США № 5648260.

В случае некоторых антител, которые содержат Fc-домен, система для получения антител может быть сконструирована таким образом, чтобы синтезировать антитела, у которых Fc-область гликозилирована. В еще одном примере Fc-домен молекул IgG гликозилирован по остатку аспарагина 297 в домене CH2 (см. фиг. 5). Этот остаток аспарагина является сайтом для модификации олигосахаридами с двумя ветвями. Это гликозилирование участвует в обеспечении эффекторных функций, опосредуемых рецепторами для Fc $\gamma$  и компонентом системы комплемента C1q (Burton and Woof (1992) Adv. Immunol. 51:1-84; Jefferis et al. (1998) Immunol. Rev. 163:59-76). Домен Fc можно получать в экспрессионной системе на основе клеток млекопитающих, которая обеспечивает правильное гликозилирование остатка, соответствующего остатку аспарагина 297. Домен Fc также может содержать другие пост-трансляционные модификации, характерные для эукариот.

Другие пригодные модификации Fc-домена включают модификации, описанные в WO 2004/029207. Например, Fc-домен может являться XmAb® Fc (Xencor, Монровия, Калифорния, США). Домен Fc или его фрагмент может содержать замену в области, связывающейся с Fc $\gamma$ -рецептором (Fc $\gamma$ R), такую, как в доменах и фрагментах, описанных в WO 05/063815. В некоторых вариантах воплощения Fc-домен или его фрагмент содержит замену в области, связывающейся с неонатальным Fc-рецептором (FcRn), такую, как в доменах и фрагментах, описанных в WO 05047327. В других вариантах воплощения Fc-домен является одиночной цепочкой или ее фрагментом, или ее модифицированным вариантом, такими, как описаны в WO 2008143954. Известны и описаны в данной области техники и другие пригодные модификации Fc.

Антитела также могут продуцироваться трансгенными животными. Например, в патенте США № 5849992 описан способ экспрессии антитела в молочной железе трансгенного млекопитающего. Сконструирован трансген, который содержит промотор, специфичный для генов белков молока, и последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие представляющее интерес антитело, например, антитело, описанное здесь, а также сигнальную последовательность для секреции. Молоко, продуцируемое самками таких трансгенных млекопитающих, содержит секреторируемое в него представляющее интерес антитело, например, антитело, описанное здесь. Антитело можно очистить из молока или, для некоторых приложений, применять непосредственно.

Антитела могут быть модифицированы, например, фрагментом, который улучшает их стабильность и/или удержание в системе циркуляции, например, в крови, сыворотке, лимфе, бронхоальвеолярных выделениях или других тканях, например, по меньшей мере в 1,5, 2, 5, 10 или 50 раз.

Например, антитело, связывающееся с VLA-4, может быть ассоциировано с полимером, например, в существенной степени неиммуногенным полимером, таким как полиалкиленоксид или полипропиленоксид. Пригодные полимеры будут существенно различаться по массе. Можно применять полимеры со среднечисловой молекулярной массой в диапазоне от примерно 200 до примерно 35000 дальтон (или от примерно 1000 до примерно 15000 и от примерно 2000 до примерно 12500).

Например, антитело, связывающееся с VLA-4, может быть конъюгировано с водорастворимым полимером, например, с гидрофильным поливинильным полимером, например, поливиниловым спиртом или поливинилпирролидоном. Неограничивающий список полимеров включает гомополимеры полиалкиленоксидов, такие как полиэтиленгликоль (ПЭГ) или полипропиленгликоли, полиэтиленированные полиолы, их сополимеры и их блок-сополимеры, при условии, что сохраняется водорастворимость блок-сополимеров. Дополнительные подходящие полимеры включают полиоксипропилены, такие как полиоксиэтилен, полиоксипропилен, и блок-сополимеры полиоксиэтилена и полиоксипропилена (Плюроники); полиметакрилаты; карбомеры; разветвленные и неразветвленные полисахариды, содержащие мономеры сахаридов D-маннозы, D- и L-галактозы, фукозы, фруктозы, D-ксилозы, L-арабинозы, D-глюкуроновой кислоты, сиаловой кислоты, D-галактуроновой кислоты, D-маннуровой кислоты (например, полиманнуровую кислоту или альгиновую кислоту), D-глюкозамин, D-галактозамин, D-глюкозу и нейраминную кислоту, включая гомополисахариды и гетерополисахариды, такие как лактоза, амилопектин, крахмал, гидроксипропилакрилат, амилоза, декстрансульфат, декстран, декстрины, гликоген, или полисахаридную субъединицу кислых мукополисахаридов, например, гиалуроновую кислоту; полимеры сахарных спиртов, такие как полисорбитол и полиманнитол; гепарин или гепарон.

#### **Примеры вторых агентов**

В некоторых случаях композиции, описанные здесь, например, композиции, содержащие антитело, связывающееся с альфа-4, включают второй агент или вводятся в сочетании с композицией, включающей второй агент.

В одном варианте воплощения антитело, связывающееся с  $\alpha 4$ , и второй агент предложены в виде комбинированной композиции, и субъекту вводят комбинированную композицию. Дополнительно можно, например, по меньшей мере за 24 ч до или через 24 ч после введения комбинированной композиции, отдельно ввести одну дозу композиции, содержащей антитело, связывающееся с  $\alpha 4$ , а затем - одну дозу

композиции, содержащей второй агент. В еще одном варианте воплощения антитело и второй агент предложены в виде отдельных композиций, и этап введения включает последовательное введение антитела и второго агента. Последовательное введение можно осуществлять в один и тот же день (например, с интервалом в один час между введениями или по меньшей мере 3, 6 или 12 ч между введениями), или в разные дни.

В общем случае каждый компонент - антитело и второй агент - вводят в виде множества доз, разделенных во времени. Каждый компонент - антитело и второй агент - в общем случае вводят согласно режиму. Режим для одного из них или для обоих может характеризоваться регулярной периодичностью. Режим для антитела может иметь периодичность, отличную от таковой режима для второго агента, например, один компонент можно вводить чаще, чем другой. В одном из вариантов воплощения либо антитело, либо второй агент вводят один раз в неделю, а другой - один раз в месяц. В еще одном варианте воплощения либо антитело, либо второй агент вводят непрерывно, например, в течение периода более 30 мин, но менее 1, 2, 4 или 12 ч, а второй вводят в виде ударной дозы. Антитело и второй агент можно вводить любым подходящим способом, например, подкожно, внутримышечно или внутривенно.

В некоторых вариантах воплощения каждый компонент - антитело и второй агент - вводят в той же дозе, что и при назначении каждого из них при монотерапии. В других вариантах воплощения антитело вводят в дозировке, которая равна или менее, чем количество, необходимое для эффективного лечения при введении без дополнительного агента. Схожим образом второй агент можно вводить в дозировке, которая равна или менее, чем количество, необходимое для эффективного лечения при введении без антитела.

Неограничивающие примеры вторых агентов для лечения рассеянного склероза в сочетании с антителом против  $\alpha 4$  включают:

- интерфероны, например, интерферон бета-1а человека (например, Авонекс (AVONEX®) или Ребиф (Rebif®)) и интерферон-1b человека (Бетасерон (BETASERON™);
- интерферон бета человека, замещенный по положению 17; компания Berlex/Chiron);
- глатирамера ацетат (также называемый сополимер 1, Cop-1; Копаксон (COPAXONE™); компания Teva Pharmaceutical Industries, Inc.);
- ритуксан (Rituxan®) (ритуксимаб) или другое антитело против CD20, например, антитело, которое конкурирует с ритуксимабом или связывается с эпитопом, перекрывающиеся с эпитопом ритуксимаба;
- митоксантрон (Новантрон (NOVANTRONE®), компания Lederle);
- химиотерапевтический агент, например, кладрибин (Лейстатин (LEUSTATIN®)), азатиоприн (Имуран (IMURAN®)), циклофосфамид (Цитоксан (CYTOXAN®)), циклоспорин-А, метотрексат, 4-аминопиридин и тизанидин;
- кортикостероид, например, метилпреднизолон (Медрон (MEDRONE®), компания Pfizer), преднизон;
- иммуноглобулин, например, Ритуксан (Rituxan®) (ритуксимаб);
- CTLA4 Ig; алемтузумаб (Мабкампат (MabCAMPATH®)) или даклизумаб (антитело, которое связывается с CD25);
- статины; и
- антагонисты TNF.

Глатирамера ацетат - это белок, образованный в результате случайного чередования в цепи аминокислот глутаминовой кислоты, лизина, аланина и тирозина (следовательно, GLAТирамер). Глатирамера ацетат можно синтезировать в растворе из этих аминокислот, находящихся в соотношении примерно 5 частей аланина на 3 части лизина, 1,5 части глутаминовой кислоты и 1 часть тирозина, используя ангидриды N-карбоксаминокислот.

Дополнительные вторые агенты включают антитела или антагонисты для других цитокинов или ростовых факторов человека, например, TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12 IL-15, IL-16, IL-18, EMAP-11, GM-CSF, FGF и PDGF. Другие примеры вторых агентов включают антитела к молекулам клеточной поверхности, таким как CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80, CD86, CD90 и другие лиганды. Например, даклизумаб - это антитело против CD25, которое способно уменьшать интенсивность течения рассеянного склероза.

Дополнительные примеры антител включают антитела, которые способствуют проявлению активности агента, описанного здесь, такие как антитела, которые контактируют с интерфероновым рецептором, например, рецептором интерферона бета. В типичном случае применения, в котором второй агент включает антитело, это антитело связывается с целевым белком, отличным от VLA-4 или отличным от  $\alpha 4$  -интегрина, или по меньшей мере с эпитопом на VLA-4, отличным от эпитопа, узнаваемого первым агентом.

Дополнительные примеры вторых агентов включают: FK506, рапамицин, микофенолата мофетил, лефлуноמיד, нестероидные противовоспалительные средства (НПВС), например, ингибиторы фосфодиэстеразы, агонисты аденозина, антитромботические агенты, ингибиторы комплемента, адренергические агенты, агенты, препятствующие сигналингу с участием провоспалительных цитокинов, как описано

здесь, ингибиторы IL-1 $\beta$ -конвертирующего фермента (например, Vx740), антитела против P7, гликопротеиновый лиганд Р-селектина (PSGL), ингибиторы TACE, ингибиторы сигналинга Т-клеток, такие как ингибиторы киназ, ингибиторы металлопротеиназ, сульфасалазин, азатлоприн, 6-меркаптопурины, ингибиторы ангиотензин-конвертирующего фермента, растворимые рецепторы цитокинов и их производные, как описано здесь, противовоспалительные цитокины (например, IL-4, IL-10, IL-13 и TGF).

В некоторых вариантах воплощения второй агент может применяться для лечения одного или более симптомов или побочных эффектов РС. Такие агенты включают, например, амантадин, баклофен, папаверин, меклизин, гидроксизин, сульфаметоксазол, ципрофлоксацин, докузат, пемолин, дантролен, десмопрессин, дексаметазон, толтеродин, фенитоин, оксибутинин, бисакодил, венлафаксин, амитриптилин, уротропин, клоназепам, изониазид, варденафил, нитрофурантоин, гидрофильные волокна из оболочки семян подорожника, алпростадил, габапентин, нортриптилин, пароксетин, пропантелинбромид, модафинил, флуоксетин, феназопиридин, метилпреднизолон, карбамазепин, имипрамин, диазепам, силденафил, бупропион и сертралин. Многие вторые агенты, являющиеся малыми молекулами, имеют молекулярную массу от 150 до 5000 дальтон.

Примеры антагонистов TNF включают химерные, гуманизированные, принадлежащие человеку или полученные *in vitro* антитела (или их антигенсвязывающие фрагменты) к TNF (например, TNF $\alpha$  человека), такие как D2E7, (антитело к TNF $\alpha$  человека, патент США № 6258562; BASF), CDP-571/CDP-870/BAY-10-3356 (гуманизированное антитело против TNF $\alpha$ ; Celltech/Pharmacia), сA2 (химерное антитело против TNF $\alpha$ ; Ремикейд (REMICADE™), Centocor); фрагменты антител против TNF (например, CPD870); растворимые фрагменты рецепторов для TNF, например, рецепторы человека р55 или р75 для TNF или их производные, например, 75 kDTNFR-IgG (химерный белок рецептора для TNF 75 кДа и IgG, Энбрел (ENBRELE™); Immunex; см. например, Arthritis & Rheumatism (1994) Vol. 37, S295; J. Invest. Med. (1996) Vol. 44, 235A), р55 kDTNFR-IgG (химерный белок рецептора для TNF 55 кДа и IgG, Ленерцепт (LENERCEPT™)); антагонисты ферментов, например, ингибиторы TNF $\alpha$  конвертирующего фермента (TACE) (например, производное альфа-сульфонилгидроксиаминовой кислоты, WO 01/55112, и N-гидроксиформамидный ингибитор TACE - GW 3333, -005, или -022); и TNF- $\beta$ /s-TNFR (растворимый белок, связывающийся с TNF; см., например, Arthritis & Rheumatism (1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S284; Amer. J. Physiol. - Heart and Circulatory Physiology (1995) Vol. 268, pp. 37-42).

Дополнительно ко второму агенту субъекту также можно вводить другие агенты. Однако, в некоторых вариантах воплощения субъекту в качестве фармацевтической композиции не вводят белки или биопрепараты, отличные от антитела, связывающегося с  $\alpha 4$ , и второго агента. Антитело, связывающееся с  $\alpha 4$ , и второй агент могут являться единственными агентами, которые вводят при инъекции. В вариантах воплощения, в которых второй агент является рекомбинантным белком, антитело, связывающееся с  $\alpha 4$ , и второй агент могут являться единственными рекомбинантными агентами, которые вводят субъекту, или по меньшей мере единственными рекомбинантными агентами, которые модулируют иммунный или воспалительный ответы. В дополнительных вариантах воплощения только антитело, связывающееся с  $\alpha 4$ , является единственным рекомбинантным агентом или единственным биопрепаратом, вводимым субъекту.

Если не указано иначе, все технические и научные термины, использованные в этом документе, имеют те же значения, что являются общепринятыми в области, к которой относится настоящее изобретение. Хотя при практическом осуществлении или тестировании настоящего изобретения возможно применение способов и материалов, схожих или эквивалентных описываемым здесь, пригодные способы и материалы описаны ниже. Все публикации, заявки на патент, патенты и другая упомянутая здесь справочная информация полностью включены сюда в качестве ссылок. В случае возникновения конфликтов в качестве контроля будет служить настоящее описание изобретения, включая определения. Кроме того, материалы, способы и примеры являются исключительно иллюстративными и не являются ограничивающими.

### Пример

Пример 1. Варианты антител против VLA-4 обладают большей эффективностью, чем гуманизированные HP1/2.

Антитела против VLA-4 сконструировали с применением каркасной области эмбрионального типа IGKV4-1 (для дизайнов L1 и L2) или созданной генно-инженерными методами последовательности эмбрионального типа AAN7033.1 (для дизайна L3) для цепи VL и каркасной области эмбрионального типа IGHV1-f для VH. Эти антитела содержат меньшее количество обратных мутаций, чем гуманизированное антитело HP1/2, описанное в патенте США № 6602503.

### Изменения тяжелой цепи

Последовательности трех вариантов тяжелой цепи показаны на фиг. 1 и обозначены как дизайн H0, дизайн H1 и дизайн H2. Каждый вариант дизайна содержит CDR антитела мыши HP1/2, пересаженные в каркасную область IGHV1-f. Дизайн H0 не содержит обратных мутаций в каркасных областях, тогда как дизайны H1 и H2 содержат различные количества обратных мутаций в последовательностях каркасных областей с целью оптимизации аффинности гуманизированного антитела.

### Изменения легкой цепи

Последовательности четырех вариантов легкой цепи показаны на фиг. 2 и обозначены как дизайн L0, дизайн L1, дизайн L2 и дизайн L3 (также называемые L0, L1, L2, L3). Каждый вариант дизайна содержит CDR антитела мыши HP1/2, пересекающиеся в каркасную область эмбрионального типа. Каркасную область эмбрионального типа IGKV4-1 применяли для вариантов дизайна L0, L1 и L2, а созданную генно-инженерными методами каркасную область эмбрионального типа AАН70335 применяли для дизайна L3. Дизайн L0 не содержит обратных мутаций в каркасных областях, тогда как дизайны L1, L2 и L3 содержат различные количества обратных мутаций в каркасных областях с целью оптимизации аффинности гуманизованного антитела.

Результаты конкурентного анализа с применением ELISA представлены в табл. 1 и на фиг. 3. В данном эксперименте  $\alpha 4\beta 1$  предварительно инкубировали с тестируемыми моноклональными антителами (mAb), а затем использовали антитела мыши HP1/2 в качестве конкурирующего реагента. Результаты этого эксперимента свидетельствуют, что антитела, содержащие легкие цепи L2 или L3, были более активны, чем гуманизованное антитело HuHP1/2, описанное в патенте США № 6602503. Результаты представлены в табл. 1 ниже и на фиг. 3. Тяжелая цепь (H1) антител, использованных для этого анализа, имела последовательность согласно "дизайну H1", показанную на фиг. 1, тогда как L1 относится к дизайну L1 на фиг. 2.

Таблица 1  
Конкурентный анализ с применением ELISA

Моноклональное антитело	IC50, нМ
Химерное HP1/2	1,06
H1L0	1,87
H1L1	1,67
H1L2	0,9
H1L3	0,49
HuHP1/2	1,05

В табл. 1 химерное моноклональное антитело является химерным антителом HP1/2, в котором варибельные области тяжелой и легкой цепей, принадлежащие мыши, генетическими методами слиты с консервативными областями IgG1 человека. Это антитело в существенной степени идентично по аффинности связывания исходному антителу мыши HP1/2 (Sanchez-Madrid et al., Eur. J. Immunol. 16:1343-1349, 1996). Результаты эксперимента свидетельствуют, что можно улучшать аффинность моноклонального антитела относительно использованной для его создания последовательности исходного антитела мыши путем гуманизации на основе акцепторной каркасной области эмбрионального типа, созданной генно-инженерными методами.

В другом эксперименте по конкурентному анализу проводится сравнение аффинности связывания новых антител с гуманизованным антителом 21.6 против  $\alpha 4$  (Тизабри® (натализумабом)), описанным в патенте США № 5840299. В этом эксперименте исследовали связывание смеси антитела мыши HP1/2 и тестируемого моноклонального антитела с белком  $\alpha 4\beta 1$ . Результаты данного эксперимента показаны на фиг. 4 и в табл. 2 ниже и свидетельствуют, что новые сконструированные антитела примерно в 10 раз более эффективны, чем натализумаб.

Таблица 2  
Конкурентный анализ с применением ELISA

Моноклональное антитело	IC50, нМ
Химерное HP1/2	1,64
H1L0	4,46
H1L1	4,55
H1L2	1,34 10
HuHP1/2	1,41
Тизабри®	10,9

Пример 2. Гуманизованное антитело HP1/2 (HuHP1/2) связывается с VLA-4 на поверхности опухолевых клеток.

Связывание антитела против VLA-4 - HuHP1/2 - с различными клеточными линиями исследовали с применением проточной цитометрии. Связывание исследовали с применением клеточных линий ХЛЛ

(хронического лимфоцитарного лейкоза) Мес1 и JM1; клеточных линий ММ (множественной миеломы) U266 и H929; и клеточных линий ОМЛ (острого миелогенного лейкоза) HL60 и KG1. Антитела NuHP1/2 связывались с клетками всех исследованных линий опухолевых клеток (фиг. 6). Данные проточной цитометрии использовали для расчета значений  $EC_{50}$  для связывания антитела с каждой из линий клеток. Эта информация представлена ниже в табл. 3.

Также было обнаружено, что NuHP1/2 блокирует прикрепление клеточных линий ОМЛ к фибронектину и химерному белку VCAM1-Ig. Для того чтобы проверить, способно ли антитело блокировать присоединение, клеточным линиям ОМЛ - HL60 или KG1 - давали прикрепиться к покрытым фибронектином лункам (фиг. 7А) или к покрытым VCAM1-Ig лункам (фиг. 7В) в присутствии возрастающих концентраций HP1/2 или антитела, служащего контролем изотипа. Антитело NuHP1/2 блокировало присоединение клеток обоих типов к лункам, покрытым фибронектином, и к лункам, покрытым VCAM1-Ig. Максимальное ингибирование связывания клеток HL60 с обоими лигандами достигалось при 20 мкг/мл NuHP1/2 (фиг. 1С).

Также было обнаружено, что NuHP1/2 блокирует прикрепление клеточных линий ММ к фибронектину и химерному белку VCAM1-Ig. Клеточным линиям ММ - U266 и H929 - давали прикрепиться к покрытым фибронектином лункам (фиг. 8А) или к покрытым VCAM1-Ig лункам (фиг. 8В) в присутствии возрастающих концентраций HP1/2 или антитела, служащего контролем изотипа. Антитело NuHP1/2 блокировало присоединение клеточных линий обоих типов к лункам, покрытым фибронектином и VCAM1-Ig. Максимальное ингибирование связывания клеток U266 с обоими лигандами достигалось при 20 мкг/мл NuHP1/2 (фиг. 8С).

Также было обнаружено, что NuHP1/2 блокирует прикрепление клеточных линий ХЛЛ к фибронектину и химерному белку VCAM1-Ig. Клеточным линиям ХЛЛ - Мес1 и JM1 - давали прикрепиться к покрытым фибронектином лункам (фиг. 9А) или к покрытым VCAM1-Ig лункам (фиг. 9В) в присутствии возрастающих концентраций HP1/2 или антитела, служащего контролем изотипа. Антитело NuHP1/2 блокировало присоединение клеточных линий обоих типов к лункам, покрытым фибронектином и VCAM1-Ig. Максимальное ингибирование связывания клеток Мес1 с обоими лигандами достигалось при 20 мкг/мл NuHP1/2 (фиг. 9С).

Значения  $IC_{50}$  для связывания антитела NuHP1/2 с линиями опухолевых клеток вычисляли на основании данных, представленных на фиг. 7-9. Эти данные представлены в табл. 3.

Таблица 3

Расчеты для связывания NuHP1/2 с линиями опухолевых клеток

		$EC_{50}$ (нМ)	$IC_{50}$ (нМ)	
			Фибронектин	VCAM
<b>ХЛЛ</b>	Мес1	0,11	0,10	0,07
	JM1	0,21	-	0,12
<b>ММ</b>	U266	0,46	0,14	0,13
	H929	0,91	0,21	1,35
<b>ОМЛ</b>	HL60	0,11	0,16	0,91
	KG1	0,19	0,05	0,1

Другие варианты воплощения указаны в формуле изобретения.



## Перечень последовательностей

<110> BIOGEN IDEC MA INC.

<120> АНТИТЕЛА ПРОТИВ VLA-4

<130> B2047-7046W0

<140> PCT/US11/32641

<141> 2011-04-15

<150> 61/324,944

<151> 2010-04-16

<160> 15

<170> Патентная версия 3.5

<210> 1

<211> 121

<212> белок

<213> Mus sp.

<400> 1

Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Leu	Ser	Cys	Thr	Ala	Ser	Gly	Phe	Asn	Ile	Lys	Asp	Thr
			20					25						30	
Tyr	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Glu	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
		35					40					45			
Gly	Arg	Ile	Asp	Pro	Ala	Ser	Gly	Asp	Thr	Lys	Tyr	Asp	Pro	Lys	Phe
	50					55					60				
Gln	Val	Lys	Ala	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Thr	Ser	Ser	Asn	Thr	Ala	Trp
65					70					75					80
Leu	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Asp	Gly	Met	Trp	Val	Ser	Thr	Gly	Tyr	Ala	Leu	Asp	Phe	Trp	Gly
			100					105					110		
Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser							
		115					120								

<210> 2

<211> 98

<212> белок

<213> Homo sapiens

<400> 2

046416

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

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
20 25 30

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

Gly Leu Val Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Glu Lys Phe  
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Thr

<210> 3

<211> 121

<212> белок

<213> искусственная последовательность

<220>

<221> источник

<223> /Заметьте ="Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид"

<400> 3

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

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr  
20 25 30

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

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Ser Gly Asp Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe  
50 55 60

Gln Val Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

046416

Ala Thr Gly Met Trp Val Ser Thr Gly Tyr Ala Leu Asp Phe Trp Gly  
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 4  
<211> 121  
<212> белок  
<213> искусственная последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /Заметьте ="Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид"

<400> 4  
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr  
20 25 30

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

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Ser Gly Asp Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe  
50 55 60

Gln Val Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Asp Gly Met Trp Val Ser Thr Gly Tyr Ala Leu Asp Phe Trp Gly  
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 5  
<211> 121  
<212> белок  
<213> искусственная последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /Заметьте ="Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид"

<400> 5

## 046416

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

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr  
20 25 30

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

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Ser Gly Asp Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe  
50 55 60

Gln Val Arg Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Asp Gly Met Trp Val Ser Thr Gly Tyr Ala Leu Asp Phe Trp Gly  
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 6

<211> 107

<212> белок

<213> Mus sp.

<400> 6

Ser Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Lys Phe Leu Leu Val Ser Ala Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Thr Asn Asp  
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly  
50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Thr Val Gln Ala  
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Tyr  
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105

046416

<210> 7  
<211> 101  
<212> белок  
<213> Homo sapiens

<400> 7  
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
1 5 10 15  
  
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser  
20 25 30  
  
Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
35 40 45  
  
Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
50 55 60  
  
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
65 70 75 80  
  
Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln  
85 90 95  
  
Tyr Tyr Ser Thr Pro  
100

<210> 8  
<211> 107  
<212> белок  
<213> искусственная последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /Заметьте ="Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид"

<400> 8  
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
1 5 10 15  
  
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Thr Asn Asp  
20 25 30  
  
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45  
  
Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly  
50 55 60  
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala  
65 70 75 80

046416

Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Tyr  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

<210> 9  
<211> 107  
<212> белок  
<213> искусственная последовательность  
  
<220>  
<221> источник  
<223> /Заметьте ="Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид"

<400> 9  
Ser Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Thr Asn Asp  
20 25 30

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

Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala  
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Tyr  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

<210> 10  
<211> 107  
<212> белок  
<213> искусственная последовательность  
  
<220>  
<221> источник  
<223> /Заметьте ="Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид"

<400> 10  
Ser Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
1 5 10 15

046416

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Thr Asn Asp  
20 25 30

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

Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala  
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Tyr  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

<210> 11

<211> 107

<212> белок

<213> искусственная последовательность

<220>

<221> источник

<223> /Заметьте ="Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид"

<400> 11

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Thr Asn Asp  
20 25 30

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

Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala  
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Tyr  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

<210> 12

046416

<211> 107  
<212> белок  
<213> Homo sapiens

<400> 12  
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15  
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Lys Thr Tyr  
20 25 30  
Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Pro Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45  
Ser Asp Ala Ser Gly Phe Gln Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60  
Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Ser Phe Thr Ile Thr Ser Leu Arg Pro  
65 70 75 80  
Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Glu Lys Val Pro Phe  
85 90 95  
Thr Phe Gly Pro Gly Lys Val Gly Phe Asn Arg  
100 105

<210> 13  
<211> 107  
<212> белок  
<213> искусственная последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /Заметьте ="Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид"

<400> 13  
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
1 5 10 15  
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Lys Thr Tyr  
20 25 30  
Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45  
Tyr Asp Ala Ser Gly Phe Gln Pro Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly  
50 55 60  
Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala  
65 70 75 80  
Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Glu Lys Val Pro Tyr  
85 90 95



## 046416

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 14

<211> 228

<212> белок

<213> искусственная последовательность

<220>

<221> источник

<223> /Заметьте ="Описание искусственной последовательности: синтетический полипептид"

<400> 14

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe  
 1 5 10 15

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr  
 20 25 30

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val  
 35 40 45

Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val  
 50 55 60

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser  
 65 70 75 80

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu  
 85 90 95

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser  
 100 105 110

Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro  
 115 120 125

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln  
 130 135 140

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala  
 145 150 155 160

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr  
 165 170 175

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu  
 180 185 190

046416

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
 195 200 205

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser  
 210 215 220

Leu Ser Leu Gly  
 225

<210> 15  
 <211> 236  
 <212> белок  
 <213> Homo sapiens

<400> 15  
 Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Trp  
 1 5 10 15

Leu Ser Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser  
 20 25 30

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser  
 35 40 45

Gln Asp Ile Lys Thr Tyr Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys  
 50 55 60

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Ser Asp Ala Ser Gly Phe Gln Pro Gly Val  
 65 70 75 80

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

Ile Thr Ser Leu Arg Pro Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln  
 100 105 110

Tyr Glu Lys Val Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Gly Phe  
 115 120 125

Asn Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp  
 130 135 140

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn  
 145 150 155 160

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

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp  
 180 185 190

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

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser  
 210 215 220

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 225 230 235

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантная молекула антитела или её антигенсвязывающий фрагмент, содержащие вариабельный домен легкой цепи и вариабельный домен тяжелой цепи, где:

(а) вариабельный домен легкой цепи содержит последовательность каркасной области вариабельного домена легкой цепи из IGKV4-1 (SEQ ID NO: 7) и CDR из VL-цепи антитела мыши HP1/2 (SEQ ID NO: 6), где CDR1 содержит последовательность KASQSVTNDVA, CDR2 содержит последовательность YASNRYT и CDR3 содержит последовательность QQDYSSPYT, и последовательность каркасной области вариабельного домена легкой цепи содержит аминокислотные замены в одном или более из положений 1, 67, 73, 85 и 87 каркасной области согласно схеме нумерации по Кабату, причем замененная аминокислота в положении 1 каркасной области представляет собой серин (S), замененная аминокислота в положении 67 каркасной области представляет собой тирозин (Y), замененная аминокислота в положении 73 представляет собой фенилаланин (F), замененная аминокислота в положении 85 представляет собой треонин (T), и замененная аминокислота в положении 87 представляет собой фенилаланин (F); и

(b) вариабельный домен тяжелой цепи содержит последовательность каркасной области вариабельного домена тяжелой цепи из IGHV1-f (SEQ ID NO: 2) и CDR из VH-цепи антитела мыши HP1/2 (SEQ ID NO: 1), где CDR1 содержит последовательность NIKDTYM, CDR2 содержит последовательность ID-PASGDTKYDPKFQ и CDR3 содержит последовательность WVSTGYALDF, и последовательность каркасной области вариабельного домена тяжелой цепи содержит аминокислотные замены в одном или более из положений 24 и 94 каркасной области согласно схеме нумерации по Кабату, причем в случае замены замененная аминокислота в положении 24 каркасной области представляет собой аланин (A), замененная аминокислота в положении 94 каркасной области представляет собой аспарагиновую кислоту (D);

где молекула рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающий фрагмент связывают  $\alpha$ 4-цепь белка VLA-4.

2. Рекомбинантная молекула антитела или её антигенсвязывающий фрагмент, содержащие вариабельный домен легкой цепи и вариабельный домен тяжелой цепи, где:

(а) вариабельный домен легкой цепи содержит последовательность каркасной области вариабельного домена легкой цепи из IGKV4-1 (SEQ ID NO: 7) и CDR из VL-цепи антитела мыши HP1/2 (SEQ ID NO: 6), где CDR1 содержит последовательность KASQSVTNDVA, CDR2 содержит последовательность YASNRYT и CDR3 содержит последовательность QQDYSSPYT, и последовательность каркасной области вариабельного домена легкой цепи содержит аминокислотные замены в одном или более из положений 1, 67, 73, 85 и 87 каркасной области согласно схеме нумерации по Кабату, причем замененная аминокислота в положении 1 каркасной области представляет собой серин (S), замененная аминокислота в положении 67 каркасной области представляет собой тирозин (Y), замененная аминокислота в положении 73 представляет собой фенилаланин (F), замененная аминокислота в положении 85 представляет собой треонин (T), и замененная аминокислота в положении 87 представляет собой фенилаланин (F); и

(b) вариабельный домен тяжелой цепи содержит последовательность каркасной области вариабельного домена тяжелой цепи из дизайна H0 (SEQ ID NO: 3) и CDR из VH-цепи антитела мыши HP1/2 (SEQ ID NO: 1), где CDR1 содержит последовательность NIKDTYM, CDR2 содержит последовательность ID-PASGDTKYDPKFQ и CDR3 содержит последовательность WVSTGYALDF, и последовательность каркасной области вариабельного домена тяжелой цепи содержит аминокислотные замены в одном или более из положений 24 и 94 каркасной области согласно схеме нумерации по Кабату, причем в случае замены замененная аминокислота в положении 24 каркасной области представляет собой аланин (A), замененная аминокислота в положении 94 каркасной области представляет собой аспарагиновую кислоту (D);

где молекула рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающий фрагмент связывают  $\alpha$ 4-цепь белка VLA-4.

3. Рекомбинантная молекула антитела или её антигенсвязывающий фрагмент, содержащие вариабельный домен легкой цепи и вариабельный домен тяжелой цепи, где:

(а) вариабельный домен легкой цепи содержит последовательность каркасной области вариабельного домена легкой цепи, из созданной генно-инженерными методами последовательности эмбрионального типа ААН70335.1 (SEQ ID NO: 12) и CDR из VL-цепи антитела мыши HP1/2 (SEQ ID NO: 6), где CDR1 содержит последовательность KASQSVTNDVA, CDR2 содержит последовательность YASNRYT и CDR3 содержит последовательность QQDYSSPYT; и последовательность каркасной области вариабельного домена легкой цепи содержит аминокислотные замены в одном или более из положений 1 и 87 каркасной области согласно схеме нумерации по Кабату, причем замененная аминокислота в положении 1 каркасной области представляет собой серин (S) и замененная аминокислота в положении 87 представляет собой фенилаланин (F); и

(b) вариабельный домен тяжелой цепи содержит последовательность каркасной области вариабельного домена тяжелой цепи из IGHV1-f (SEQ ID NO: 2) и CDR из VH-цепи антитела мыши HP1/2 (SEQ ID

NO: 1), где CDR1 содержит последовательность NIKDTYM, CDR2 содержит последовательность ID-PASGDTKYDPKFKQ и CDR3 содержит последовательность WVSTGYALDF, и последовательность каркасной области переменного домена тяжелой цепи содержит аминокислотные замены в одном или более из положений 24 и 94 каркасной области, согласно схеме нумерации по Кабату, причем в случае замены замененная аминокислота в положении 24 каркасной области представляет собой аланин (A), замененная аминокислота в положении 94 каркасной области представляет собой аспарагиновую кислоту (D);

где молекула рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающий фрагмент связывают  $\alpha$ 4-цепь белка VLA-4.

4. Рекомбинантная молекула антитела или её антигенсвязывающий фрагмент, содержащие переменный домен легкой цепи и переменный домен тяжелой цепи, где:

(a) переменный домен легкой цепи содержит последовательность каркасной области переменного домена легкой цепи, из созданной генно-инженерными методами последовательности эмбрионального типа ААН70335.1 (SEQ ID NO: 12) и CDR из VL-цепи антитела мыши HP1/2 (SEQ ID NO: 6), где CDR1 содержит последовательность KASQSVTNDVA, CDR2 содержит последовательность YASNRYT и CDR3 содержит последовательность QQDYSSPYT; и последовательность каркасной области переменного домена легкой цепи содержит аминокислотные замены в одном или более из положений 1 и 87 каркасной области согласно схеме нумерации по Кабату, причем замененная аминокислота в положении 1 каркасной области представляет собой серин (S) и замененная аминокислота в положении 87 представляет собой фенилаланин (F); и

(b) переменный домен тяжелой цепи содержит последовательность каркасной области переменного домена тяжелой цепи из дизайна H0 (SEQ ID NO: 3) и CDR из VH-цепи антитела мыши HP1/2 (SEQ ID NO: 1), где CDR1 содержит последовательность NIKDTYM, CDR2 содержит последовательность ID-PASGDTKYDPKFKQ и CDR3 содержит последовательность WVSTGYALDF, и последовательность каркасной области переменного домена тяжелой цепи содержит аминокислотные замены в одном или более из положений 24 и 94 каркасной области, согласно схеме нумерации по Кабату, причем в случае замены замененная аминокислота в положении 24 каркасной области представляет собой аланин (A), замененная аминокислота в положении 94 каркасной области представляет собой аспарагиновую кислоту (D);

где молекула рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающий фрагмент связывают  $\alpha$ 4-цепь белка VLA-4.

5. Рекомбинантная молекула антитела или её антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1, 2, 3 или 4, где переменная область тяжелой цепи состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5.

6. Рекомбинантная молекула антитела или её антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1, 2, 3 или 4, где переменная область легкой цепи состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11.

7. Рекомбинантная молекула антитела или её антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1, 2, 3 или 4, отличающиеся тем, что переменная область тяжелой цепи состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4.

8. Рекомбинантная молекула антитела или её антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1, 2, 3 или 4, отличающиеся тем, что переменная область легкой цепи состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 11.

9. Рекомбинантная молекула антитела или её антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1, 2, 3 или 4, отличающиеся тем, что переменная область тяжелой цепи состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4, и переменная область легкой цепи состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 11.

10. Вектор, содержащий ДНК, кодирующую переменную область тяжелой цепи рекомбинантной молекулы антитела или её антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1, 2, 3 или 4.

11. Вектор, содержащий ДНК, кодирующую переменную область легкой цепи рекомбинантной молекулы антитела или её антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1, 2, 3 или 4.

12. Вектор, содержащий ДНК, кодирующую переменную область легкой цепи рекомбинантной молекулы антитела или её антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1, 2, 3 или 4, где переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

13. Вектор, содержащий ДНК, кодирующую переменную область легкой цепи рекомбинантной молекулы антитела или её антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1, 2, 3, или 4, где переменная область легкой цепи содержит SEQ ID NO: 11.

14. Вектор, содержащий ДНК, кодирующую переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи рекомбинантной молекулы антитела или её антигенсвязывающего фрагмента по п.1, 2, 3 или 4, где переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 и переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID

NO: 11.

15. Способ получения рекомбинантной молекулы антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, связывающих  $\alpha 4$ -цепь белка VLA-4, включающий:

а) получение клетки-хозяина, содержащей (i) последовательность ДНК, кодирующую рекомбинантную молекулу антитела или её антигенсвязывающий фрагмент, связывающийся с  $\alpha 4$ , по любому из пп.1, 2, 3 или 4; и

б) культивирование клетки с получением рекомбинантной молекулы антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

16. Способ лечения пациента, включающий введение указанному пациенту рекомбинантной молекулы антитела или её антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1, 2, 3 или 4, где пациент страдает от заболевания или нарушения, выбранного из рака, воспалительного заболевания, неврологического заболевания или острого нарушения.

17. Способ по п.16, отличающийся тем, что рак включает солидную опухоль.

18. Способ по п.16, отличающийся тем, что рак включает гемобластоз.

19. Способ по п.16, отличающийся тем, что рак включает множественную миелому или острый миелогенный лейкоз (ОМЛ).

20. Способ по п.16, отличающийся тем, что воспалительное нарушение включает рассеянный склероз, астму, ревматоидный артрит, диабет, неврит зрительного нерва или болезнь Крона.

21. Способ по п.16, где воспалительное нарушение включает рассеянный склероз или болезнь Крона.

22. Способ по п.16, отличающийся тем, что острое нарушение включает повреждение спинного мозга или травматическое повреждение головного мозга.

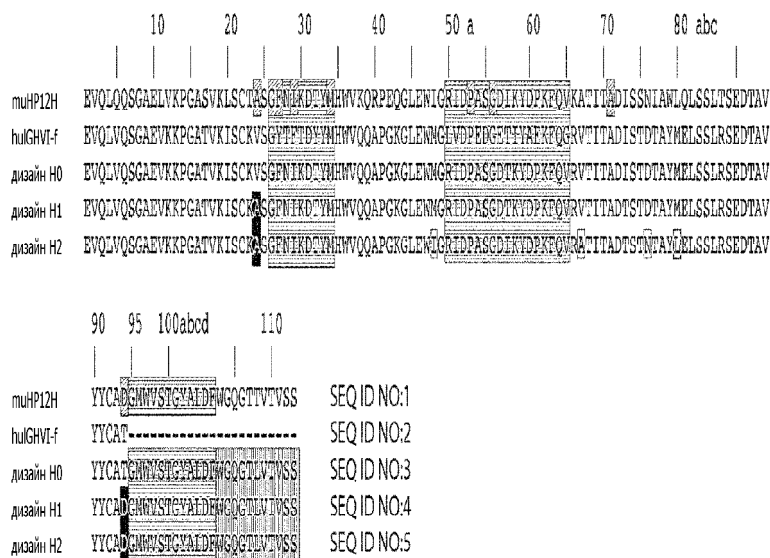
23. Способ по п.16, отличающийся тем, что рекомбинантную молекулу антитела или её фрагмент, связывающийся с  $\alpha 4$ , вводят в соответствии с определенным режимом, выбранным из одного раза в день, одного раза в месяц, одного раза в неделю, двух раз в неделю, трех раз в неделю, четырех раз в неделю, одного раза каждые две недели или одного раза каждые три недели.

24. Способ по п.16, отличающийся тем, что дополнительно включает введение пациенту второго терапевтического агента, выбранного из тромболитического агента, химиотерапевтического агента, нейротропного агента, противовоспалительного агента, стероида, цитокина или фактора роста.

25. Рекомбинантная молекула антитела или её антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-9 или 15-24, где рекомбинантная молекула антитела или её антигенсвязывающий фрагмент связываются с VLA-4 с  $K_d$  менее чем  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-10}$  или  $10^{-11}$  М.

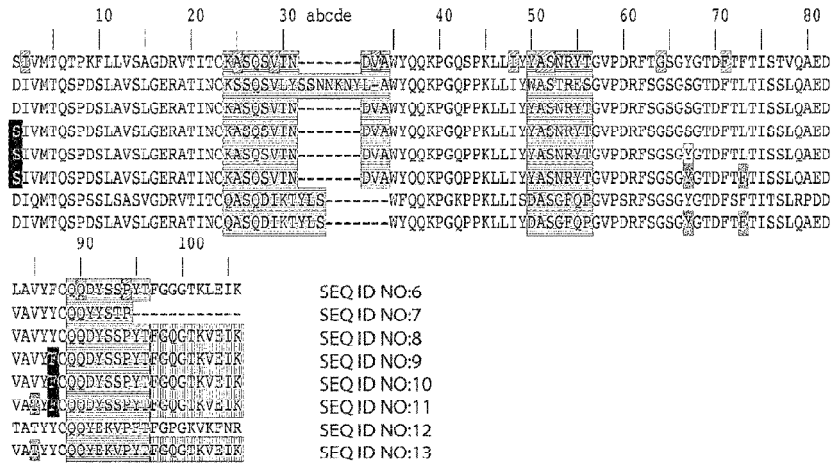
26. Вектор по п.10, где переменная область тяжелой цепи состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, 4 или 5.

27. Вектор по п.11, где переменная область легкой цепи состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8, 9, 10 или 11.



Фиг. 1

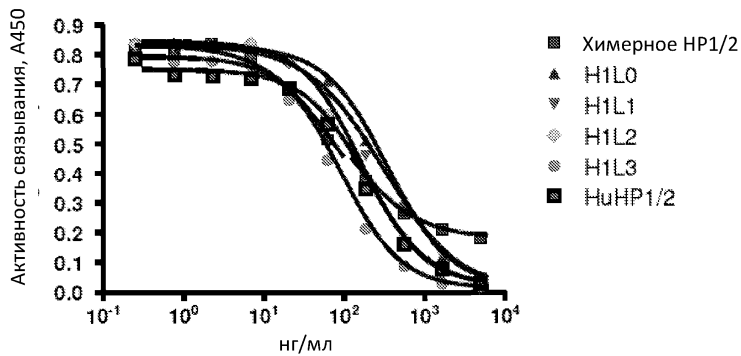
CDR  
(горизонтальная  
штриховка)  
Консервативные  
остатки (наклонная  
штриховка)  
Обратные мутации  
2 (черный фон) -  
присутствуют в  
дизайне H1 и  
дизайне H2 (V24A;  
194D)  
Обратные мутации  
3 (рамка с белым  
фоном) -  
присутствуют  
только в дизайне  
H2 (M48I; V67A;  
D76N; M80L)  
Каркасная  
последовательность  
в 4 взята из  
консенсусной  
последовательности  
и человека  
(вертикальная  
штриховка)  
muHP12L  
IGKV4-1  
L0  
L1  
L2  
L3  
AAH70335.1  
geAAH70335.1



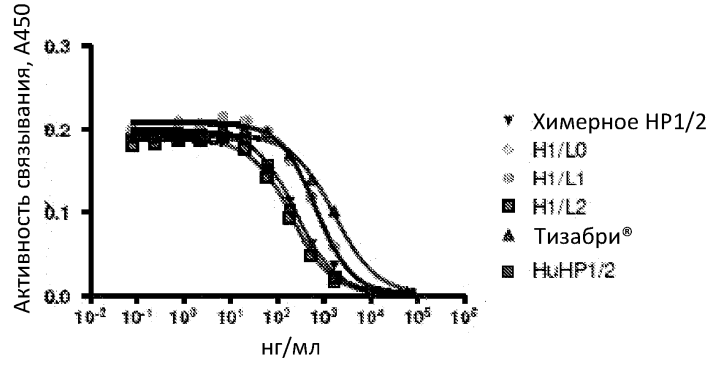
muHP12L  
IGKV4-1  
L0  
L1  
L2  
L3  
AAH70335.1  
geAAH70335.1

CDR (горизонтальная штриховка): Консервативные остатки (наклонная штриховка)  
Обратные мутации 2 (черный фон) - присутствуют в дизайне H1, дизайне H2 и дизайне H3 (D1S; Y87F)  
Обратные мутации 3 (рамка с белым фоном) - присутствуют в дизайне L2 (S67Y)  
Внесенные генно-инженерными методами мутации эмбрионального типа (серые точки) - присутствуют только в дизайне L3 (происходят от созданной генно-инженерными методами каркасной области эмбрионального типа geAAH70335.1)  
Каркасная последовательность 4 взята из консенсусной последовательности человека (вертикальная штриховка)

Фиг. 2



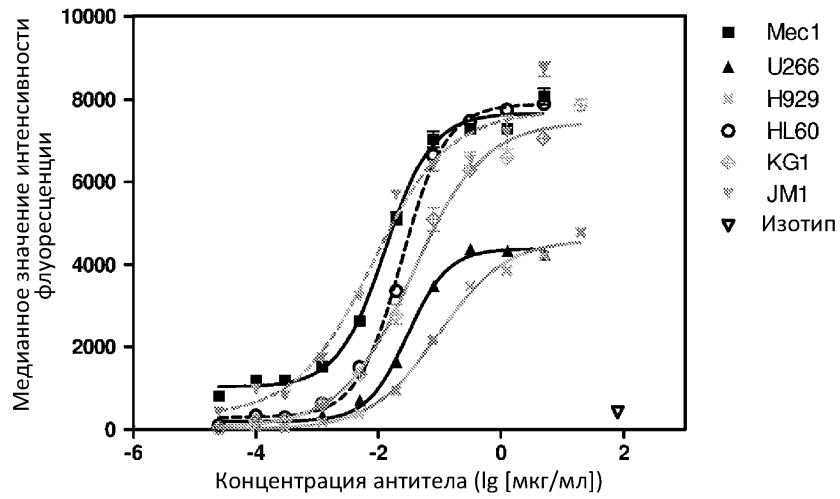
Фиг. 3



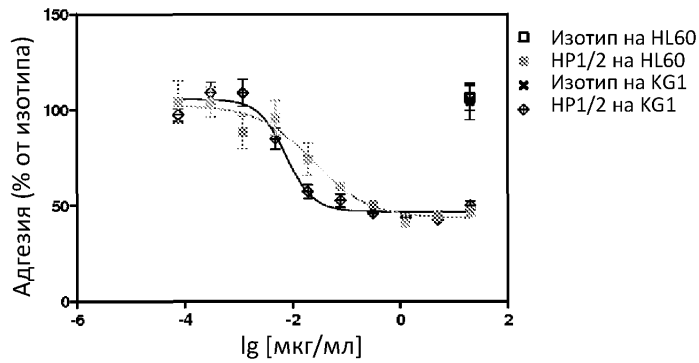
Фиг. 4

ESKYGPPCPSPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKD  
 TLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV  
 DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH  
 QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKISKAKG  
 QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKG  
 FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD  
 GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEA  
 LHNHYTQKLSLSLGLG

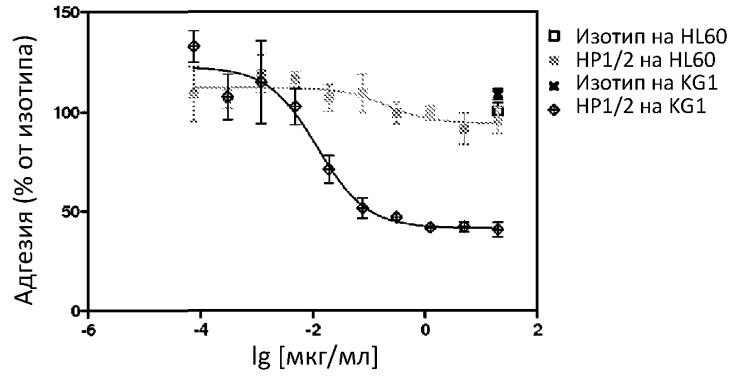
Фиг. 5



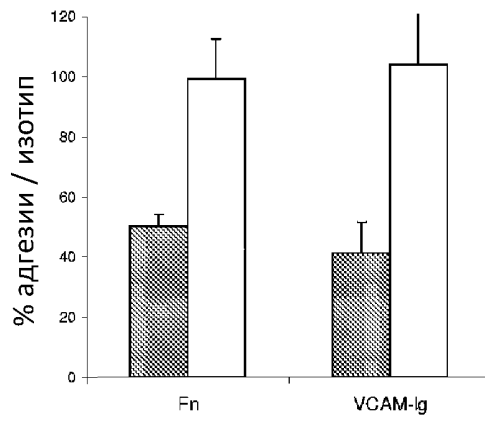
Фиг. 6



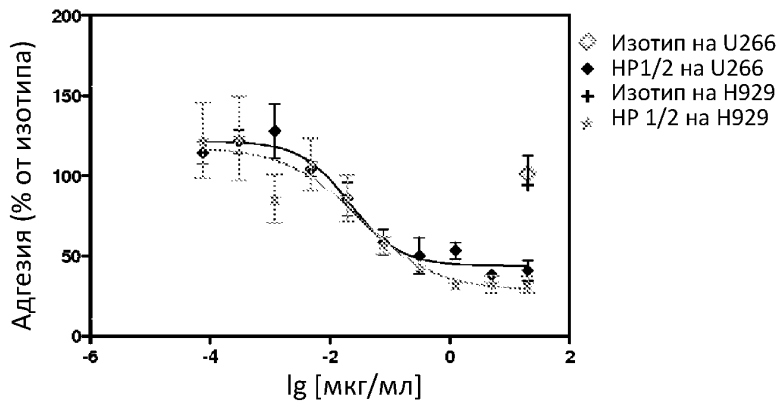
Фиг. 7А



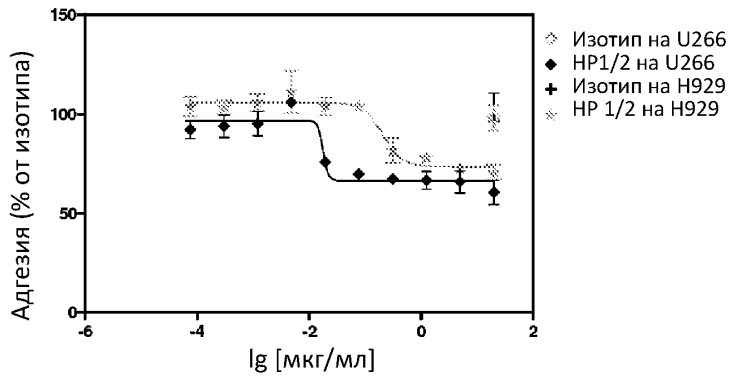
Фиг. 7В



Фиг. 7С

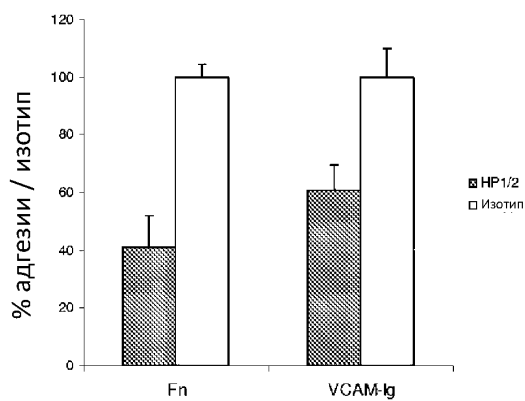


Фиг. 8А

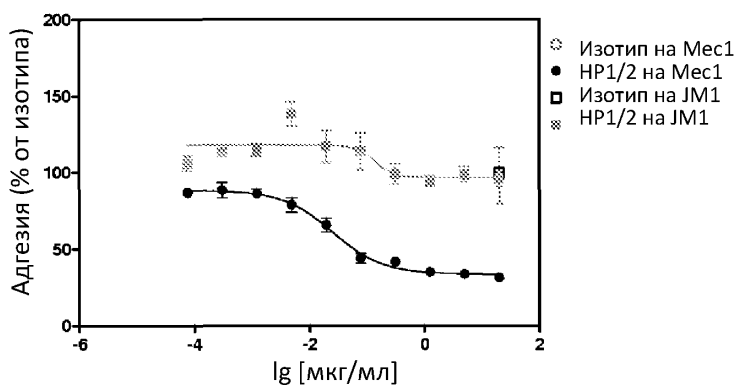


Фиг. 8В

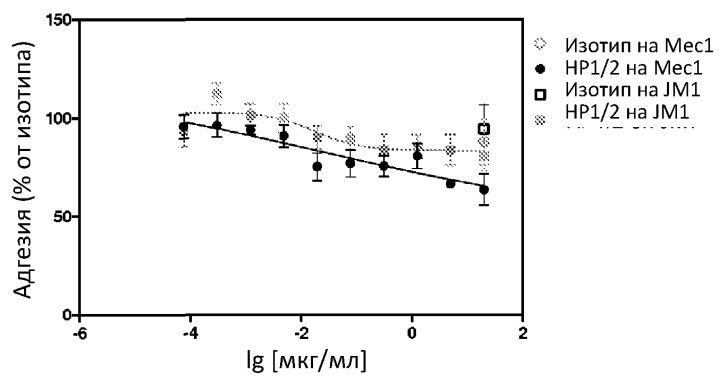




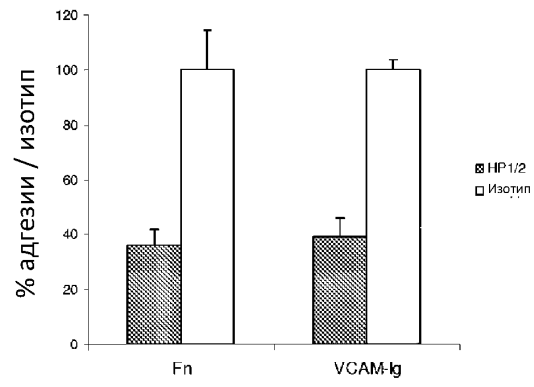
Фиг. 8С



Фиг. 9А



Фиг. 9В



Фиг. 9С

