



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **110096** (13) **C2**
(51) МПК (2015.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 31/4184 (2006.01)

A61P 35/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2012 02678**

(22) Дата подання заявки: **12.08.2010**

(24) Дата, з якої є чинними
права на винахід: **25.11.2015**

(31) Номер попередньої
заявки відповідно до
Паризької конвенції: **09010489.4**

(32) Дата подання
попередньої заявки
відповідно до
Паризької конвенції: **14.08.2009**

(33) Код держави-учасниці
Паризької конвенції,
до якої подано
попередню заявку: **EP**

(41) Публікація відомостей
про заявку: **11.06.2012, Бюл.№ 11**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **25.11.2015, Бюл.№ 22**

(86) Номер та дата
подання міжнародної
заявки, поданої
відповідно до
Договору РСТ **РСТ/EP2010/004939,
12.08.2010**

(72) Винахідник(и):

**Хертінг Франк (DE),
Кляйн Крістіан (DE/CH)**

(73) Власник(и):

**РОШ ГЛІКАРТ АГ,
Wagistrasse 18, CH-8952 Schlieren,
Switzerland (CH)**

(74) Представник:

**Петров Андрій Володимирович, реєстр.
№139**

(56) Перелік документів, взятих до уваги
експертизою:

WO 2009053038 A2, 30.04.2009
DATABASE BIOSIS [Online] BIOSCIENCES
INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA,
PA, US; November 2008 (2008-11), FISCHER
KIRSTEN ET AL: "Bendamustine in
Combination with Rituximab (BR) for Patients
with Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia
(CLL): A Multicentre Phase II Trial of the
German CLL Study Group (GCLLSG)",
XP002559057, Database accession no.
PREV200900257032 & BLOOD, vol. 112, no.
11, November 2008 (2008-11), page 128,
50TH ANNUAL MEETING OF THE
AMERICAN- SOCIETY-OF-HEMATOLOGY;
SAN FRANCISCO, CA, USA; DECEMBER 06
-09, 2008

UMANA PABLO ET AL.: "GA101, a novel
humanized type IICD20 antibody with
glycoengineered Fc and enhanced cell death
induction, exhibits superior anti-tumour
efficacy and superior tissue B-cell depletion in
vivo", BLOOD, AMERICAN SOCIETY OF
HEMATOLOGY, US, vol. 110, no. 11,
abstract:2348, 2007

UMANA P ET AL: "Novel 3(rd) generation
humanized type IICD20 antibody with
glycoengineered fc and modified elbow hinge
for enhanced ADCC and superior apoptosis
induction", BLOOD, AMERICAN SOCIETY OF
HEMATOLOGY, US, vol. 108, no. 11, PART 1,
9 December 2006 (2006-12-09), page 72A

(54) КОМБІНОВАНА ТЕРАПІЯ НЕФУКОЗИЛЬОВАНИМ АНТИ-CD20 АНТИТІЛОМ З БЕНДАМУСТИНОМ

UA 110096 C2

(57) Реферат:

Винахід належить до застосування нефукозильованого анти-CD20 антитіла з кількістю фукози 60 % або менше від загальної кількості олігосахаридів (цукрів) у положенні Asn297 для одержання лікарського засобу для лікування раку у комбінації з бендамустином, де зазначеним раком є рак, який експресує CD20.

Даний винахід відноситься до комбінованої терапії нефукозильованим анти-CD20 антитілом з бендамустином для лікування раку.

Передумови створення винаходу

Нефукозильовані антитіла

Опосередковані клітинами ефекторні функції моноклональних антитіл можуть бути посилені за рахунок конструювання їх олігосахаридного компонента згідно з описом у роботі Umeta P. та ін., Nature Biotechnol., 17, 1999, сс. 176-180, і у патенті US 6602684. Антитіла типу IgG1, які найбільше часто застосовуються в імунотерапії раку, є глікопротеїнами з консервативним сайтом N-зв'язаного глікозидування за положенням Asn297 у кожному домені CH2. Два складних біантених олігосахариди, приєднаних до Asn297, сховані між доменами CH2, формуючи просторові контакти з поліпептидним каркасом, і їх наявність важлива для опосередкування антитілом ефекторних функцій, наприклад, антитіло-залежної клітинної цитотоксичності (antibody dependent cellular cytotoxicity – ADCC) (Lifely M.R. та ін., Glycobiology, 5, 1995, сс. 813-822; Jefferis R. та ін., Immunol. Rev., 163, 1998, сс. 59-76; Wright A., Morrison S.L., Trends Biotechnol., 15, 1997, сс. 26-32). У публікації Umeta P. та ін., Nature Biotechnol., 17, 1999, сс. 176-180, і у WO 99/154342 показано, що надекспресія у клітинах яєчника китайського хом'ячка (Chinese hamster ovary – CHO) ферменту β (1,4)-N-ацетилглюкозамінілтрансферази III (acetylglucosaminyltransferase III – GntIII), глікозилтрансферази, що каталізує формування роздвоєних олігосахаридів, суттєво підвищує in vitro ADCC-дію антитіл. Зміна у композиції вуглеводу N297 або його елімінація також впливає на Fc-зв'язування з Fc γ і C1q (Umeta P. та ін., Nature Biotechnol., 17, 1999, сс. 176-180; Davies J. та ін., Biotechnol. Bioeng., 74, 2001, сс. 288-294; Mimura Y. та ін., J. Biol. Chem., 276, 2001, сс. 45539-45547; Radaev S. та ін., J. Biol. Chem., 276, 2001, сс. 16478-16483; Shields R.L. та ін., J. Biol. Chem., 276, 2001, сс. 6591-6604; Shields R.L. та ін., J. Biol. Chem., 277, 2002, сс. 26733-26740; Simmons L.C. та ін., J. Immunol. Methods, 263, 2002, сс. 133-147).

Обговорення досліджень дії нефукозильованих і фукозильованих антитіл, у тому числі анти-CD20 антитіл, опубліковане, наприклад, у наступних роботах: Iida S. та ін., Clin. Cancer Res., 12, 2006, сс. 2879-2887; Natsume A. та ін., J. Immunol. Methods, 306, 2005, сс. 93-103; Satoh M. та ін., Expert Opin. Biol. Ther., 6, 2006, сс. 1161-1173; Kanda Y. та ін., Biotechnol. Bioeng., 94, 2004, сс. 680-688; Davies J. та ін., Biotechnol. Bioeng., 74, 2001, сс. 288-294.

CD20 і анти-CD20 антитіла

Інтенсивно досліджують молекулу CD20 (яку також називають антигеном диференціації, специфічним для В-лімфоцитів людини, або Bp35), яка є гідрофобним трансмембранним білком, локалізованим на попередниках В-лімфоцитів і на зрілих В-лімфоцитах (Valentine M.A. та ін., J. Biol. Chem., 264, 1989, сс. 11282-11287; Einfeld D.A. та ін., EMBO J., 7, 1988, сс. 711-717; Tedder T.F. та ін., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85, 1988, сс. 208-212; Stamenkovic I. та ін., J. Exp. Med., 167, 1988, сс. 1975-80; Tedder T.F. та ін., J. Immunol. 142, 1989, сс. 2560-2568). CD20 експресується на більше ніж 90 % В-клітин неходжкінської лімфоми (НХЛ) (Anderson K.C. та ін., Blood 63, 1984, сс. 1424-1433), але він не виявлений на кровотворних стовбурних клітинах, попередниках В-клітин, нормальних плазматичних клітинах або на інших здорових тканинах (Tedder T.F. та ін., J. Immunol. 135(2), 1985, сс. 973-979).

Існує два різні типи анти-CD20 антитіл, що суттєво відрізняються за способом зв'язування CD20 і за біологічними діями (Cragg M.S. та ін., Blood, 103, 2004, сс. 2738-2743; Cragg M.S. та ін., Blood, 101, 2003, сс. 1045-1051). Антитіла I типу, наприклад, ритуксимаб, активно діють у комплемент-опосередкованій цитотоксичності, а антитіла II типу, наприклад, тоситумомаб (B1), 11B8, AT80 або гуманізовані антитіла B-Ly1, ефективно ініціюють загибель клітин-мішеней через каспаза-незалежний апоптоз із супутньою експозицією фосфатидилсерину.

Загальні відмітні властивості анти-CD20 антитіл типу I і типу II підсумовані у табл. 1.

Таблиця 1

Властивості анти-CD20 антитіл I і II типу

| Анти-CD20 антитіла I типу | Анти-CD20 антитіла II типу |
|--|--|
| Епітоп CD20 I типу | Епітоп CD20 II типу |
| Локалізують CD20 на ліпідних рафтах | Не локалізують CD20 на ліпідних рафтах |
| Підвищена CDC (у випадку ізотипу IgG1) | Знижена CDC (у випадку ізотипу IgG1) |
| Дія ADCC (у випадку ізотипу IgG1) | Дія ADCC (у випадку ізотипу IgG1) |

Властивості анти-CD20 антитіл I і II типу

| | |
|--|---|
| Повною мірою мають з'єднувальну здатність | Знижена з'єднувальна здатність |
| Гомотипове агрегування | Посилене гомотипове агрегування |
| Індукція апоптозу при перехресному зв'язуванні | Сильна індукція загибелі клітин із перехресним зв'язуванням |

Бендамустин

Бендамустином (торговельні назви рибомустин і трианда, а також SDX-105) є азотистим іпритом, який застосовують для лікування хронічного лімфолейкозу (ХЛЛ) (Kath R. та ін., Cancer Res. Clin. Oncol., 127, 2001, сс. 48-54) і В-клітинної неходжкінської лімфоми (НХЛ). Він належить до групи лікарських засобів, які називають алкілюючими агентами. Бендамустин у цей час також досліджують в якості засобу лікування саркоми (Bagchi S., Lancet Oncol., 8, 2007, с. 674).

Бендамустин застосовують в якості терапевтичного агента разом із іншими агентами, включаючи ритуксимаб (Cheson B.D. та ін., J Clin Oncol., 27(9), 2009, сс. 1492-501; Knauf W., Expert Rev Anticancer Ther., (2)9, 2009, сс. 165-174; Plosker G.L. та ін., Drugs. 68(18), 2008, сс. 2645-2660).

Короткий опис винаходу

Зненацька було встановлено, що комбінація бендамустину з нефукозильованим анти-CD20 антитілом проявляє синергетичне (наприклад, навіть більше ніж адитивні) антипроліферативні дії у порівнянні з комбінацією з ритуксимабом, що не є нефукозильованим анти-CD20 антитілом.

Даний винахід включає застосування нефукозильованого анти-CD20 антитіла з кількістю фукози 60 % або менше від загальної кількості олігосахаридів (цукрів) за положенням Asn297 для одержання лікарського засобу для лікування раку у комбінації з бендамустином.

Іншим об'єктом за даним винаходом є спосіб лікування хворого раком пацієнта шляхом введення нефукозильованого анти-CD20 антитіла з кількістю фукози 60 % або менше від загальної кількості олігосахаридів (цукрів) за положенням Asn297 у комбінації з бендамустином пацієнтові, що потребує такого лікування.

Іншим об'єктом за даним винаходом є нефукозильоване анти-CD20 антитіло з кількістю фукози 60 % або менше від загальної кількості олігосахаридів (цукрів) за положенням Asn297 для лікування раку у комбінації з бендамустином.

В одному з варіантів здійснення даного винаходу кількість фукози становить від 40 % до 60 % від загальної кількості олігосахаридів (цукрів) за положенням Asn297.

В іншому варіанті здійснення даного винаходу кількість фукози становить 0 % від загальної кількості олігосахаридів за положенням Asn297.

В одному з варіантів здійснення даного винаходу нефукозильованим анти-CD20 антитілом є антитіло IgG1.

В іншому варіанті здійснення даного винаходу зазначене нефукозильоване анти-CD20 антитіло є гуманізованим антитілом B-Ly1 і зазначеним раком є рак, який експресує CD20, який в одному з варіантів здійснення даного винаходу є В-клітинною неходжкінською лімфомою (НХЛ).

В одному з варіантів здійснення даного винаходу гуманізоване антитіло B-Ly1 вводять у дозі від 800 до 1200 мг на 1, 8, 15 добу 6-тижневого циклу дозування та потім у дозі від 800 до 1200 мг на 1 добу до п'яти 4-тижневих циклів дозування, і бендамустин вводять у дозі від 80 мг/м² до 110 мг/м² на 1 і 2 добу до шести 4-тижневих циклів дозування.

В одному з варіантів здійснення даного винаходу передбачена композиція, що включає анти-CD20 нефукозильоване антитіло з кількістю фукози 60 % або менше і бендамустин, для лікування раку.

Докладний опис винаходу

Даний винахід включає застосування нефукозильованого анти-CD20 антитіла ізотипу IgG1 або IgG3 (переважно ізотипу IgG1) з кількістю фукози 60 % або менше від загальної кількості олігосахаридів (цукрів) за положенням Asn297 для одержання лікарського засобу для лікування раку у комбінації з бендамустином. В одному з варіантів здійснення даного винаходу нефукозильоване анти-CD20 антитіло зв'язує CD20 з величиною KD от 10-9 до 10-13 молей/л.

В одному з варіантів здійснення даного винаходу кількість фукози становить від 40 % до 60 % від загальної кількості олігосахаридів (цукрів) за положенням Asn297.

Поняття "антитіло" охоплює різні форми антитіл, включаючи, але ними не обмежуючись, цілі

антитіла, антитіла людини, гуманізовані антитіла й генетично сконструйовані антитіла, наприклад, моноклональні антитіла, химерні антитіла або рекомбінантні антитіла, а також фрагменти таких антитіл, довжина яких така, що зберігаються відмітні властивості за даним винаходом. Поняття "моноклональне антитіло" або "композиція моноклонального антитіла" у контексті даного винаходу відносяться до препарату молекул антитіла єдиного амінокислотного складу. Відповідно, поняття "моноклональне антитіло людини" відноситься до антитіл, що проявляють окрему з'єднувальну специфічність, і містить варіабельні й константні області, які походять від послідовностей імуноглобулінів зародкової лінії людини. В одному з варіантів здійснення даного винаходу моноклональні антитіла людини виробляються гібридомною, яка включає В-клітини, отримані від трансгенної тварини, але не від людини, наприклад, трансгенної миші з геномом, що включає трансген важкого ланцюга людини й трансген легкого ланцюга людини, гібридизовані з безсмертними клітинами.

Поняття "химерне антитіло" відноситься до моноклонального антитіла, що включає варіабельну область, наприклад, область зв'язування, від одного джерела або виду й щонайменше частину константної області, похідної від іншого джерела або виду, особливо отриману методами рекомбінації ДНК. Особливо кращі химерні антитіла, що включають варіабельну область миші й константну область людини. Такі химерні антитіла миші/людини є продуктом експресованих генів імуноглобуліну, що включають сегменти ДНК, які кодують варіабельні області імуноглобуліну миші, і сегменти ДНК, які кодують константні області імуноглобуліну людини. До інших форм "химерних антитіл", які охоплювані даним винаходом, відносяться ті, у яких клас або підклас модифікований або змінений у порівнянні з вихідним антитілом. Такі "химерні" антитіла також називаються "антитілами переключеного класу". До методів одержання химерних антитіл відносяться загальноприйняті методи рекомбінантної ДНК і генної трансфекції, відомі у даній галузі. Див., наприклад, Morrison S.L. та ін., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 1984, сс. 6851-6855; US 5202238 і US 5204244.

Поняття "гуманізоване антитіло" відноситься до антитіл, у яких каркасна ділянка або "комплементарність-детерміновані області (complementarity determining regions – CDR)" модифіковані для включення області CDR імуноглобуліну іншої специфічності у порівнянні зі специфічністю вихідного імуноглобуліну. У кращому варіанті здійснення даного винаходу CDR миші пересаджують у каркасну ділянку антитіла людини для одержання "гуманізованого антитіла". Див., наприклад, Riechmann L. та ін., Nature 332, 1988, сс. 323-327; Neuberger M.S. та ін., Nature 314, 1985, сс. 268-270.

У контексті даного винаходу поняття "антитіло людини" відноситься до антитіл, що містять варіабельні й константні області, похідні від послідовностей імуноглобуліну зародкової лінії людини. Антитіла людини відомі у даній галузі (van Dijk M.A., van de Winkel J.G., Curr. Opin. Pharmacol. 5, 2001, сс. 368-374). Ґрунтуючись на такому підході, можуть бути отримані антитіла людини проти великої кількості різноманітних мішеней. Приклади антитіл людини описані, наприклад, Kellermann S.A. та ін., Curr Opin Biotechnol. 13, 2002, сс. 593-597.

Поняття "рекомбінантне антитіло людини" у контексті даного винаходу охоплює всі антитіла людини, які отримані, експресовані, створені або виділені методами рекомбінації, наприклад, антитіла, виділені з клітини-хазяїна, наприклад, клітини NS0 або CHO, або від тварини (наприклад, миші), трансгенної за генами імуноглобуліну, або антитіла, експресовані з використанням вектора рекомбінантної експресії, трансфектованого у клітину-хазяїна. Такі рекомбінантні антитіла людини мають варіабельні й константні області, похідні від послідовностей імуноглобуліну зародкової лінії у перегрупованій формі. Рекомбінантні антитіла людини за даним винаходом були піддані соматичному гіпермутуванню *in vivo*. Відповідно амінокислотні послідовності областей VH і VL рекомбінантних антитіл є послідовностями, які хоча й походять від послідовностей, близьких до послідовностей VH і VL зародкової лінії людини, природно можуть бути відсутні у спектрі антитіл зародкової лінії людини *in vivo*.

У контексті даного винаходу поняття "зв'язування" або "специфічне зв'язування" відносяться до специфічного зв'язування антитіла з епітопом пухлинного антитіла у дослідженні *in vitro*, переважно у дослідженні методом плазмонного резонансу (фірма BIAcore, GE-Healthcare Упсала, Швеція) з очищеним антигеном дикого типу. Спорідненість зв'язування виражається у термінах " k_a " (константа швидкості асоціації антитіла з комплексу антитіло/антиген), " k_D " (константа дисоціації) і " K_D " (k_D/k_a). Зв'язування або специфічне зв'язування означає з'єднувальну спорідненість (K_D) 10^{-8} молей/л або менше, переважно від 10^{-9} М до 10^{-13} молей/л. Відповідно нефукозилзоване антитіло за даним винаходом специфічно зв'язується з пухлинним антигеном з з'єднувальною спорідненістю (K_D) 10^{-8} молей/л або менше, переважно від 10^{-9} до 10^{-13} молей/л.

Поняття "молекула нуклеїнової кислоти" у контексті даного винаходу відноситься до

молекул ДНК і молекул РНК. Молекула нуклеїнової кислоти може бути одноланцюговою або дволанцюговою, але переважно дволанцюговою ДНК.

Поняття "константні домени" означає, що вони не залучені безпосередньо у зв'язування антитіла з антигеном, але беруть участь у прояві ефекторних функцій (ADCC, зв'язування комплементу та CDC).

Поняття "варіабельна область" (варіабельна область легкого ланцюга (VL), варіабельна область важкого ланцюга (VH)), яке застосовується у даному винаході, означає кожен з пар легкого та важкого ланцюгів, залучену безпосередньо у зв'язування антитіла з антигеном.

Домени варіабельних легкого та важкого ланцюгів людини мають одну загальну структуру, і кожний домен включає чотири каркасні ділянки (framework region – FR), послідовності яких у високому ступені консервативні, які сусідствують з трьома "гіперваріабельними областями" (або комплементарність-детермінуючими областями—complementarity determining regions, CDR). Каркасні ділянки приймають конформацію бета-шару і області CDR можуть формувати петлі, що поєднують структуру бета-шару. Области CDR у кожному ланцюзі підтримуються в їхній тривимірній структурі каркасними ділянками й формують разом із областями CDR з сайту зв'язування антигена іншого ланцюга.

У контексті даного винаходу поняття "гіперваріабельна область" або "антигензв'язуюча частина антитіла" відноситься до амінокислотних залишків антитіла, які відповідальні за зв'язування антигену. Гіперваріабельна область включає амінокислотні залишки з «комплементарність-детермінуючих областей (complementarity determining regions – CDR)». Поняття "каркасна ділянка (framework region – FR)" відноситься до тих варіабельних доменних областей, які відмінні від залишків гіперваріабельних областей, відповідно описаному у даному винаході. Таким чином, легкі та важкі ланцюги антитіла включають у напрямку від N- до C-кінця домени FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 і FR4. Особливо CDR3 важкого ланцюга є областю, яка найбільшою мірою впливає на зв'язування антигена. Области CDR і FR визначають за стандартом, описаним у кн.: Kabat та ін. "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 1991, 5-е вид., Міністерство охорони здоров'я й соціального забезпечення США, Національний інститут здоров'я, Бетесда, Меріленд, і/або за тими залишками, які походять з "гіперваріабельної петлі".

Бендамустин є 4-[5-[біс(2-хлоретил)аміно]-1-метилбензімідазол-2-іл]бутановою кислотою. Торговельні назви цієї сполуки "рибомустин" і "треанда"; бендамустин також відомий за назвою SDX-105. Бендамустин являє собою азотистий іприт, який застосовують для лікування хронічного лімфолейкозу (ХЛЛ) (Kath R. та ін., J. Cancer Res. Clin. Oncol., 127, 2001, сс. 48-54) і В-клітинної неходжкінської лімфоми (НХЛ). Він належить до групи ліків, які називають алкілюючими агентами, і також досліджується для лікування саркоми (Bagchi S., Lancet Oncol., 8, 2007, с. 674).

Поняття "нефукозильоване антитіло" відноситься до антитіла ізо типу IgG1 або IgG3 (переважно ізо типу IgG1) зі зміненим типом глікозилювання в області Fc у положенні Asn297, що має знижений рівень залишків фукози. Глікозилювання IgG1 або IgG3 людини локалізоване у положенні Asn297 у вигляді корового біантенного складного олігосахаридного глікозилювання, що закінчується двома залишками Gal. Ці структури позначають як залишки гліканів G0, G1 (α 1,6 або α 1,3) або G2 залежно від кількості кінцевих залишків Gal (Raju T.S., Bioprocess Int., 1 2003, сс. 44-53). Тип глікозилювання CHO частин антитіла Fc описаний, наприклад, у роботі Routier F.H., Glycoconjugate J., 14, 1997, сс. 201-207. Антитіла, які рекомбінантно експресуються у клітинах-хазяїнах CHO без глікомодифікації, звичайно фукозильовані за положенням Asn297 у кількості щонайменше 85 %. Слід урахувати, що у контексті даного винаходу поняття нефукозильованого антитіла передбачає антитіло, в якого немає фукози у властивому йому характері глікозилювання. У більшості випадків відомо, що типове положення глікозилюваного залишку в антитілі займає аспарагін за положенням 297 у системі нумерації EU ("Asn297").

Поняття "система нумерації EU" або "індекс EU" звичайно застосовують стосовно залишку у константній області важкого ланцюга імуноглобуліну (наприклад, індекс EU представлений у кн.: Kabat та ін. "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 1991, 5-е вид., Міністерство охорони здоров'я й соціального забезпечення США, Національний інститут здоров'я, Бетесда, Меріленд).

Таким чином, нефукозильоване антитіло за даним винаходом означає антитіло ізо типу IgG1 або IgG3 (переважно ізо типу IgG1), в якому кількість фукози становить 60 % або менше від загальної кількості олігосахаридів (цукрів) за положенням Asn297 (це означає, що щонайменше 40 % або більше олігосахаридів в області Fc за положенням Asn297 фукозильовано). В одному з варіантів здійснення даного винаходу кількість фукози становить від 40 % до 60 % олігосахаридів в області Fc за положенням Asn297. В іншому варіанті здійснення даного

винаходу кількість фукози становить 50 % або менше, і в ще одному варіанті здійснення даного винаходу кількість фукози становить 30 % або менше від кількості олігосахаридів в області Fc за положенням Asn297. В іншому варіанті здійснення даного винаходу кількість фукози становить 0 % від кількості олігосахаридів в області Fc за положенням Asn297. Відповідно до даного винаходу поняття "кількість фукози" означає кількість зазначеного олігосахариду (фукози) в олігосахаридному ланцюжку (ланцюжку цукру) за положенням Asn297 щодо суми всіх олігосахаридів (цукрів), приєднаних до Asn 297 (наприклад, комплексних, гібридних і утримуючих велику кількість манози структур), вимірюване методом MALDI-TOF спектrometerії й розраховане в якості середньої величини (докладний метод визначення кількості фукози описаний, наприклад, у WO 2008/077546). Крім того, в одному з варіантів здійснення даного винаходу олігосахариди області Fc роздвоєні. Нефукозильоване антитіло за даним винаходом може експресуватися у глікомодифікованій клітині-хазяїні, сконструйованій для експресії щонайменше однієї нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид, який має дію GnTIII, у кількості, достатній для часткового фукозилювання олігосахаридів в області Fc. В одному з варіантів здійснення даного винаходу поліпептид, який має дію GnTIII, є гібридним поліпептидом. В іншому варіанті дія α 1,6-фукозилтрансферази клітини-хазяїна може бути знижена або елімінована згідно з US 6946292 для одержання глікомодифікованих клітин-хазяїнів. Ступінь фукозилювання антитіла може бути визначена, наприклад, або умовами ферментації (наприклад, часом ферментації), або комбінуванням щонайменше двох антитіл з різним ступенем фукозилювання. Такі нефукозильовані антитіла й відповідні способи глікоінженірингу описані у WO 2005/044859, WO 2004/065540, WO 2007/031875, Umana P. та ін., Nature Biotechnol. 17, 1999, сс. 176-180; WO 99/154342, WO 2005/018572, WO 2006/116260, WO 2006/114700, WO 2005/011735, WO 2005/027966, WO 97/028267, US2006/0134709, US2005/0054048, US2005/0152894, WO 2003/035835, WO 2000/061739. Такі глікоінженерні антитіла мають підвищену величину ADCC. Інші методи глікоінженірингу, за допомогою яких одержують нефукозильовані антитіла за даним винаходом, описані, наприклад, у роботах Niwa R. та ін., J. Immunol. Methods, 306, 2005, сс. 151-160; Shinkawa T. та ін., J Biol Chem, 278, 2003, сс. 3466-3473; WO 03/055993 або US 2005/0249722.

Таким чином, одним із об'єктів даного винаходу є застосування нефукозильованого анти-CD20 антитіла ізо типу IgG1 або IgG3 (переважно ізо типу IgG1), що специфічно зв'язується з CD20 і містить кількість фукози 60 % або менше від загальної кількості олігосахаридів (цукрів) за положенням Asn297, для одержання лікарського засобу для лікування раку у комбінації з бендамустином. В одному з варіантів здійснення даного винаходу кількість фукози становить від 40 % до 60 % від загальної кількості олігосахаридів (цукрів) за положенням Asn297.

Антиген CD20 (який також називають В-лімфоцитарним антигеном CD20, В-лімфоцитарним поверхневим антигеном B1, Leu-16, Bp35, BM5 і LF5; послідовність позначена номером P11836 у базі даних Swissprot) є гідрофобним трансмембранним білком з молекулярною масою приблизно 35 кДа, розташованим на передпідвишках В-лімфоцитів і на зрілих В-лімфоцитах. (Valentine M.A. та ін., J. Biol. Chem., 264(19), 1989, сс. 11282-11287; Tedder T.F. та ін., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85, 1988, сс. 208-212; Stamenkovic I. та ін., J. Exp. Med., 167, 1988, сс. 1975-80; Einfeld D.A. та ін., EMBO J., 7, 1988, сс. 711-717; Tedder T.F. та ін., J. Immunol., 142, 1989, сс. 2560-2568). Відповідний ген людини являє собою трансмембранний 4-доменний підродина А представник 1, який також позначають MS4A1. Цей ген кодує представника сімейства трансмембранних 4А генів. Представники цього сімейства, що формується, відрізняються загальними структурними властивостями й подібними границями сплайсування інтрона/екзона й проявляють унікальні варіанти експресії серед клітин кровотворення й нелімфоїдних тканин. Цей ген кодує молекулу на поверхні В-лімфоцитів, яка бере участь у розвитку й диференціації В-клітин у клітині плазми. Представник цього сімейства локалізований за положенням 11q12, серед кластера представників сімейства. Інший сплайсинг цього гена приводить до двох варіантів транскрипта, які кодують той самий білок.

Поняття "антиген CD20" і "CD20" у контексті даного винаходу застосовують взаємозамінно і до них відносять які-небудь варіанти, ізоформи та гомологи CD20 людини інших видів, які природно експресуються клітинами або експресуються на поверхні клітин, які трансфектовані геном CD20. Зв'язування антитіла за даним винаходом з антигеном CD20 опосередковує знищення клітин, які експресують CD20 (наприклад, клітин пухлини), шляхом інактивування CD20. Знищення клітин, які експресують CD20, може відбуватися за одним або декількома з наступних механізмів: індукції загибелі клітин/апоптозу, ADCC і CDC.

До синонімів CD20, які застосовують у даній галузі, відносяться В-лімфоцитний антиген CD20, В-лімфоцитний поверхневий антиген B1, Leu-16, Bp35, BM5 і LF5.

Поняття "анти-CD20 антитіло" у контексті даного винаходу відноситься до антитіла, яке

специфічно зв'язується з антигеном CD20. Залежно від з'єднувальних властивостей і біологічної дії анти-CD20 антитіл стосовно антигена CD20 можуть бути виділено два типи анти-CD20 антитіл (анти-CD20 антитіла I і II типу) згідно Cragg M.S. та ін., Blood, 103, 2004, сс. 2738-2743; і Cragg M.S. та ін., Blood, 101, 2003, сс. 1045-1051, див. табл. 2.

5

Таблиця 2

Властивості анти-CD20 антитіл I і II типу

| Анти-CD20 антитіла I типу | Анти-CD20 антитіла II типу |
|---|---|
| Епітоп CD20 I типу | Епітоп CD20 II типу |
| Локалізуються CD20 на ліпідних рафтах | Не локалізуються CD20 на ліпідних рафтах |
| Підвищена цитотоксичність CDC (у випадку ізо типу IgG1) | Знижена цитотоксичність CDC (у випадку ізо типу IgG1) |
| Дія ADCC (у випадку ізо типу IgG1) | Дія ADCC (у випадку ізо типу IgG1) |
| Повною мірою властива здатність до зв'язування | Знижена здатність до зв'язування |
| Гомотипове агрегування | Посилене гомотипове агрегування |
| Індукція апоптозу при перехресному зв'язуванні | Індукція високої загибелі клітин без перехресного зв'язування |

До прикладів анти-CD20 антитіл II типу відносяться, наприклад, гуманізоване B-Ly1 антитіло IgG1 (хімерне гуманізоване антитіло IgG1, описане у WO 2005/044859), 11B8 IgG1 (описане у WO 2004/035607) і AT80 IgG1. Звичайно анти-CD20 антитіла II типу ізо типу IgG1 проявляють відмітні властивості CDC. Анти-CD20 антитіла II типу мають знижену цитотоксичність CDC (у випадку ізо типу IgG1) у порівнянні з антитілами I типу ізо типу IgG1.

До прикладів анти-CD20 антитіл I типу відносяться, наприклад, ритуксимаб, HI47 IgG3 (ECACC, гібридома), антитіло 2C6 IgG1 (описане у WO 2005/103081), 2F2 IgG1 (описане у WO 2004/035607 і WO 2005/103081) і 2H7 IgG1 (описане у WO 2004/056312).

Нефукозильовані анти-CD20 антитіла за даним винаходом в одному з варіантів здійснення даного винаходу є анти-CD20 антитілами II типу, у більше конкретному варіанті здійснення даного винаходу анти-CD20 антитіло II типу є нефукозильованим гуманізованим антитілом B-Ly1.

Нефукозильовані анти-CD20 антитіла за даним винаходом мають підвищену антитілозалежну клітинну цитотоксичність (antibody dependent cellular cytotoxicity – ADCC) на відміну від анти-CD20 антитіл, що не мають знижений вміст фукози.

Поняття "нефукозильоване анти-CD20 антитіло з підвищеною антитілозалежною клітинною цитотоксичністю (antibody dependent cellular cytotoxicity – ADCC)" у контексті даного винаходу означає нефукозильоване анти-CD20 антитіло, що має підвищену цитотоксичність ADCC, яку визначають яким-небудь прийнятним методом, відомим фахівцям у даній галузі. Одним із відомих методів аналізу ADCC in vitro є наступний:

1) в аналізі використовують клітини-мішені, про яких відомо, що вони експресують антиген-мішень, яка розпізнається антигензв'язуючою областю антитіла;

2) в аналізі використовують мононуклеарні клітини периферичної крові людини (МКПК), виділені з крові випадковим чином вибраних здорових донорів, як ефекторні клітини;

3) аналіз проводять за наступним протоколом:

i) МКПК виділяють, використовуючи стандартні процедури центрифугування у градієнті щільності, і суспендують до щільності 5×10^6 клітин/мл у культуральному середовищі RPMI;

ii) клітини-мішені вирощують стандартними методами роботи з тканинними культурами, збирають на експонентній фазі росту при життєздатності більше 90 %, промивають у середовищі для культур клітин RPMI, мітять 100 мікрокурі ^{51}Cr , промивають двічі середовищем для культур клітин і ресуспендують у середовищі для культур клітин при щільності 10^5 клітин/мл;

iii) 100 мікролітрів зазначеної вище підсумкової суспензії клітин-мішеней переносять у кожну ямку 96-ямкового планшета для мікротитрувань;

iv) антитіло серійно розводять від 4000 нг/мл до 0,04 нг/мл у середовищі для культур клітин і по 50 мікролітрів одержуваних розчинів антитіла вносять до клітин-мішеней у 96-ямковий планшет для мікротитрувань, проводячи дослідження антитіла у трьох різних концентраціях, що перекривають зазначений вище діапазон концентрацій;

v) для контролів максимального вивільнення (MB) у три додаткові ямки планшета, що містять мічені клітини-мішені, вносять 50 мкл 2 % (VN) водного розчину неіонного детергенту

(фірма Nonidet, Sigma, Сент-Луїс) замість розчину антитіла (пункт iv вище);

vi) для контролів спонтанного вивільнення (CB) у три додаткові ямки планшета, що містять мічені клітини-мішені, вносять по 50 мкл середовища RPMI для культур клітин замість розчину антитіла (пункт iv вище);

5 vii) 96-ямковий планшет для мікротитрування потім центрифугують у режимі $50 \times g$ протягом 1 хв та інкубують протягом 1 год. при 4°C ;

viii) 50 мікролітрів суспензії МКПК (пункт i вище) вносять у кожну ямку для одержання співвідношення ефекторних клітин до клітин-мішеней 25:1 і планшети поміщають в інкубатор в атмосферу $5\% \text{CO}_2$ при 37°C на 4 год.;

10 ix) супернатант без клітин з кожної ямки збирають і підраховують експериментально вивільнену радіоактивність (ЕВР), використовуючи лічильник гамма-випромінювання;

x) відсоток специфічного лізису розраховують для кожної концентрації антитіла за формулою $(\text{ЕВР-МВ})/(\text{МВ-СВ}) \times 100$, де ЕВР середню радіоактивність підраховують (див. вище пункт ix) для такої концентрації антитіла, МВ означає середню радіоактивність (див. вище пункт ix), розраховану для контролів МВ (див. вище п. V), і СВ означає середню радіоактивність (див. вище пункт ix), розраховану для контролів СВ (див. вище пункт vi);

15 4) "підвищена цитотоксичність ADCC" виражається або у вигляді підвищення максимального відсотка специфічного лізису, що спостерігається у дослідженому вище діапазоні концентрації антитіла, і/або зниження концентрації антитіла, необхідної для досягнення половини від

20 максимального відсотка специфічного лізису, що спостерігається у дослідженому вище діапазоні концентрації антитіла. Підвищення величини ADCC щодо величини ADCC, вимірюваної за допомогою зазначеного вище аналізу, опосередкованої тим же антитілом, виробленим тим же типом клітин-хазяїнів, використовуючи ті ж стандартні методи одержання, очищення, переробки й зберігання, які відомі фахівцям у даній галузі, але які не виробляються

25 клітинами-хазяїнами, сконструйованими для надекспресії GnTIII.

Зазначена "підвищена цитотоксичність ADCC" може бути отримана глікоінжинірингом зазначених антитіл, що означає підвищення зазначених природних опосередкованих клітинами ефекторних функцій моноклональних антитіл шляхом інжинірингу їх олігосахаридного компонента згідно з описом у роботах Umana P. та ін., Nature Biotechnol. 17, 1999, сс. 176-180, та US 6602684.

30 Поняття "комплементзалежної цитотоксичності (complement-dependent cytotoxicity – CDC)" відноситься до лізису клітин-мішеней пухлини людини антитілом за даним винаходом у присутності комплементу. CDC вимірюють переважно обробкою препарату клітин, які експресують CD20, анти-CD20 антитілом за даним винаходом у присутності комплементу. CDC виявляють, якщо антитіло індукує у концентрації 100 нМ лізис (загибель клітин) 20 % або більш

35 пухлинних клітин через 4 год. Аналіз здійснюють переважно з ^{51}Cr або Eu міченими пухлинними клітинами й вимірюють ^{51}Cr або Eu, що вивільнилися. Контролі включають інкубування пухлинних клітин-мішеней з комплементом, але без антитіла.

Антитіло, яке називають ритуксимабом (контрольне антитіло; приклад анти-CD20 антитіла I типу), є генетично сконструйованим химерним моноклональним антитілом людини гамма 1, що

40 містить константний домен миші та спрямований проти антигену людини CD20. Таке химерне антитіло містить константні домени гамма 1 людини і позначається "C2B8" в US 5736137. Ритуксимаб схвалений для лікування пацієнтів із рецидивуючою або такою, що не піддається лікуванню, злоякісною або фолікулярною CD20-позитивною В-клітинною неходжкінською

45 лімфомою (НХЛ). Дослідження механізму дії in vitro показують, що ритуксимаб проявляє залежну від комплементу людини цитотоксичність (complement--dependent cytotoxicity – CDC) (Reff M.E. та ін., Blood, 83(2), 1994, сс. 435-445). Крім того, він проявляє істотну дію у дослідженнях з вимірювання антитілозалежної клітинної цитотоксичності (ADCC). Ритуксимаб не відноситься до нефукозилізованих антитіл.

50

Антитіло, яке називають ритуксимабом (контрольне антитіло; приклад анти-CD20 антитіла I типу), є генетично сконструйованим химерним моноклональним антитілом людини гамма 1, що

40 містить константний домен миші та спрямований проти антигену людини CD20. Таке химерне антитіло містить константні домени гамма 1 людини і позначається "C2B8" в US 5736137. Ритуксимаб схвалений для лікування пацієнтів із рецидивуючою або такою, що не піддається лікуванню, злоякісною або фолікулярною CD20-позитивною В-клітинною неходжкінською

45 лімфомою (НХЛ). Дослідження механізму дії in vitro показують, що ритуксимаб проявляє залежну від комплементу людини цитотоксичність (complement--dependent cytotoxicity – CDC) (Reff M.E. та ін., Blood, 83(2), 1994, сс. 435-445). Крім того, він проявляє істотну дію у дослідженнях з вимірювання антитілозалежної клітинної цитотоксичності (ADCC). Ритуксимаб не відноситься до нефукозилізованих антитіл.

50

Антитіло, яке називають ритуксимабом (контрольне антитіло; приклад анти-CD20 антитіла I типу), є генетично сконструйованим химерним моноклональним антитілом людини гамма 1, що

40 містить константний домен миші та спрямований проти антигену людини CD20. Таке химерне антитіло містить константні домени гамма 1 людини і позначається "C2B8" в US 5736137. Ритуксимаб схвалений для лікування пацієнтів із рецидивуючою або такою, що не піддається лікуванню, злоякісною або фолікулярною CD20-позитивною В-клітинною неходжкінською

45 лімфомою (НХЛ). Дослідження механізму дії in vitro показують, що ритуксимаб проявляє залежну від комплементу людини цитотоксичність (complement--dependent cytotoxicity – CDC) (Reff M.E. та ін., Blood, 83(2), 1994, сс. 435-445). Крім того, він проявляє істотну дію у дослідженнях з вимірювання антитілозалежної клітинної цитотоксичності (ADCC). Ритуксимаб не відноситься до нефукозилізованих антитіл.

50

| Антитіло | Кількість фукози |
|---|------------------|
| Ритуксимаб (не відноситься до нефукозилізованих антитіл) | >85 % |
| Дикого типу нефукозилізоване глікоінженерне гуманізоване антитіло B-Ly1 (B-НН6-B-KV1) (не відноситься до нефукозилізованих антитіл) | >85 % |
| Нефукозилізоване глікоінженерне гуманізоване антитіло B-Ly1 (B-НН6-B-KV1 GE) | 45-50 % |

Поняття "гуманізоване антитіло B-Ly1" відноситься до гуманізованого антитіла B-Ly1, описаного у WO 2005/044859 і WO 2007/031875, яке отримане з моноклонального анти-CD20

антитіла B-Ly1 миші (варіабельна область важкого ланцюга миші (VH): SEQ ID NO: 1; варіабельна область легкого ланцюга миші (VL): SEQ ID NO: 2 - див. Poppema S. і Visser L., Biotest Bulletin 3, 1987, с. 131-139) за рахунок химеризації з константною областю людини з IgG1 і наступною гуманізацією (див. WO 2005/044859 і WO2007/031875). Такі "гуманізовані антитіла B-Ly1" докладно описані у WO 2005/044859 і WO 2007/031875.

В одному з варіантів здійснення даного винаходу "гуманізоване антитіло B-Ly1" має варіабельну область важкого ланцюга (VH), вибрану з групи послідовностей від SEQ ID NO:3 до SEQ ID NO:20 (від B-HH2 до B-HH9 і від B-HL8 до B-HL17 у WO 2005/044859 і WO 2007/031875). Особливо кращі Seq. ID No. 3, 4, 7, 9, 11, 13 і 15 (B-HH2, B-HH3, B-HH6, B-HH8, B-HL8, B-HL11 і B-HL13 з WO 2005/044859 і WO 2007/031875). В одному специфічному варіанті здійснення даного винаходу "гуманізоване антитіло B-Ly1" містить варіабельну область легкого ланцюга (VL) послідовності SEQ ID No. 20 (B-KV1 з WO 2005/044859 і WO 2007/031875). В іншому специфічному варіанті здійснення даного винаходу "гуманізоване антитіло B-Ly1" містить варіабельну область важкого ланцюга (VH) послідовності SEQ ID NO:7 (B-HH6 з WO 2005/044859 і WO 2007/031875) і варіабельну область легкого ланцюга (VL) послідовності SEQ ID No. 20 (B-KV1 з WO 2005/044859 і WO 2007/031875). Крім того, в одному з варіантів здійснення даного винаходу гуманізоване антитіло B-Ly1 є антитілом IgG1. Згідно з даним винаходом такі нефукозильовані гуманізовані B-Ly1 антитіла є глікоінженерними (glycoengineered – GE) в області Fc відповідно до процедур, описаних у WO 2005/044859, WO 2004/065540, WO2007/031875, Umana P. та ін., Nature Biotechnol. 17, 1999, сс. 176-180, і WO99/154342. В одному з варіантів здійснення даного винаходу використовуване анти-CD20 антитіло є нефукозильованим глікоінженерним гуманізованим антитілом B-Ly1, яке позначають B-HH6-B-KV1 GE. Такі глікоінженерні гуманізовані B-Ly1 антитіла мають змінений тип глікозилювання області Fc, переважно маючи знижений рівень залишків фукози. В одному з варіантів здійснення даного винаходу кількість фукози становить 60 % або менше від загальної кількості олігосахаридів у положенні Asn297 (в одному з варіантів здійснення даного винаходу кількість фукози становить від 40 % до 60 %, в іншому варіанті здійснення даного винаходу кількість фукози становить 50 % або менше, у ще одному з варіантів здійснення даного винаходу кількість фукози становить 30 % або менше, і у ще одному іншому варіанті здійснення даного винаходу кількість фукози становить 0 %). Крім того, в одному зі специфічних варіантів здійснення даного винаходу олігосахариди в області Fc роздвоєні. Такі глікоінженерні гуманізовані B-Ly1 антитіла мають підвищену ADCC.

Олігосахаридний компонент може суттєво вплинути на властивості, значимі для ефективності терапевтичного глікопротеїну, у тому числі на фізичну стабільність, стійкість до впливу протеази, взаємодії з імунною системою, фармакокінетичні показники та специфічну біологічну дію. Такі властивості можуть залежати не тільки від наявності або відсутності олігосахаридів, але також від їхніх специфічних структур. Деякі узагальнення між структурою олігосахаридів і функцією глікопротеїну можуть бути отримані. Наприклад, певні олігосахаридні структури опосередковують швидкий кліренс глікопротеїнів із кров'яного русла через взаємодії зі специфічними з'єднувальними білками вуглеводами, хоча інші можуть бути зв'язані антитілами та індуюють імунні реакції. (Jenkins N. та ін., Nature Biotechnol., 14, 1996, сс. 975-981).

Клітини ссавців є чудовими хазяїнами для вироблення терапевтичних глікопротеїнів через їхню здатність глікозилювати білки у найбільше прийнятній формі для застосування людьми. (Cumming D.A. та ін., Glycobiology, 1, 1991, сс. 115-130; Jenkins N. та ін., Nature Biotechnol., 14, 1996, сс. 975-981). Бактерії дуже рідко глікозилюють білки, але подібно іншим типам звичайних хазяїнів, наприклад, клітин дріжджів, міцеліальних грибів, комах і рослин, дають варіанти глікозилювання, асоційовані зі швидким кліренсом із кров'яного русла, небажаними імунними реакціями й у деяких особливих випадках зі зниженою біологічною дією. Серед клітин ссавців найбільше часто протягом двох останніх десятиліть використовують клітини яєчника китайського хом'ячка (Chinese hamster ovary – CHO). Крім одержання стабільних варіантів глікозилювання ці клітини дозволяють виробляти стійке покоління генетично стабільних високо продуктивних клональних клітинних ліній. Вони можуть культивуватися до високих щільностей у простих біореакторах, використовуючи середовища без сироватки, і дозволяють створювати безпечні й відтворені біопроцеси. До інших звичайно використовуваних клітин тварин відносяться клітини нирки дитинчати хом'ячка (baby hamster kidney – BHK), NSO- і SP2/0-клітини мієломи миші. Раніше досліджували продуктивність трансгенних тварин. (Jenkins N. та ін., Nature Biotechnol., 14, 1996, сс. 975-981).

Усі антитіла містять вуглеводні структури у консервативних положеннях константних областей важкого ланцюга, причому кожний ізотип має у своєму розпорядженні відмітне складання N-зв'язаних вуглеводних структур, які варіабельно впливають на складання білка,

секрецію або функціональну дію. (Wright A., Monison S.L., Trends Biotech., 15, 1997, сс. 26-32). Структура приєднаного N-зв'язаного вуглеводу суттєво варіює залежно від ступеня процесингу й може включати велику кількість манози, багаторазово розгалужена подібно біантенному комплексу олігосахаридів. (Wright A., Morrison S.L., Trends Biotech., 15, 1997, сс. 26-32).
 5 Звичайно є гетерогенний процесинг серцевинних олігосахаридних структур, приєднаних до певного сайту глікозилювання таким чином, що навіть моноклональні антитіла існують у вигляді множини глікоформ. Крім того, показано, що великі відмінності у глікозилюванні антитіла є у клітинних ліній і спостерігають навіть мініорні відмінності для даної клітинної лінії, вирощеної у різних умовах культивування. (Lifely M.R. та ін., Glycobiology, 5(8), 1995, сс. 813-822).

10 Один зі способів істотного збільшення ефективності дії, зберігаючи при цьому простий спосіб одержання при ймовірній відсутності істотних небажаних побічних ефектів, полягає у підвищенні природних опосередкованих клітинами ефекторних функцій моноклональних антитіл шляхом інжинірингу їх олігосахаридного компоненту згідно з описом у роботах Umana P. та ін., Nature Biotechnol. 17, 1999, сс. 176-180, та US 6602684. Антитіла типу IgG1, які звичайно
 15 використовують в імунотерапії раку, є глікопротеїнами з консервативним N-зв'язаним сайтом глікозилювання за положенням Asn297 у кожному домені CH2. Два складних біантених олігосахариди, приєднаних до Asn297, занурені між доменами CH2, формуючи просторові контакти з поліпептидним каркасом, та їх наявність важлива для антитіла для опосередкування ефекторних функцій, наприклад, антитілозалежної клітинної цитотоксичності (ADCC) (Lifely M.R. та ін., Glycobiology, 5, 1995, сс. 813-822; Jefferis R. та ін., Immunol. Rev., 163, 1998, сс. 59-76; Wright A., Morrison S.L., Trends Biotechnol., 15, 1997, сс. 26-32).

Раніше було показано, що надекспресія у клітинах яєчника китайського хом'ячка CHO β (1,4)-N-ацетилглюкозамінілтрансферази I11 ("GnTII17y") – глікозилтрансферази, що каталізує формування розгалужених олігосахаридів, суттєво підвищує дію ADCC in vitro
 25 антинейробластомного химерного моноклонального антитіла (chce7), яке виробляється сконструйованими клітинами CHO. (Див. Umana P. та ін., Nature Biotechnol. 17, 1999, сс. 176-180; і WO 99/154342, сутність яких включена у даний винахід у вигляді посилань). Антитіло chce7 належить до великого класу некон'югованих моноклональних антитіл, які мають підвищену спорідненість і специфічність відносно пухлин, але занадто слабкі для клінічного
 30 застосування при одержанні стандартними промисловими лініями клітин, що втратили фермент GnTIII (Umana P. та ін., Nature Biotechnol. 17, 1999, сс. 176-180). Це дослідження вперше показало, що значні підвищення дії ADCC можуть бути отримані шляхом інжинірингу клітин, що виробляють антитіла, для експресії GnTIII, що також приводить до підвищення у пропорції константна область (Fc)-асоційованих розгалужених олігосахаридів, включаючи розгалужені
 35 нефукозильовані олігосахариди, вище рівнів, установлених у природних антитіл.

Поняття "рак" у контексті даного винаходу включає лімфоми, лімфоцитарні лейкози, рак легенів, недрібноклітинний рак легенів (non small cell lung – NSCL), бронхоальвеолярно-клітинний рак легенів, рак костей, рак підшлункової залози, рак голови або шиї, шкірну або внутрішньоочну меланому, рак матки, рак яєчника, рак прямої кишки, рак анальної
 40 області, рак шлунка, рак товстої кишки, рак грудей, рак матки, рак фалопієвих труб, карциному ендометрію, карциному шийки матки, карциному піхви, карциному вульви, хворобу Ходжкіна, рак стравоходу, рак тонкого кишечника, рак ендокринної системи, рак щитовидки, рак паращитовидної залози, рак надниркових залоз, саркому м'яких тканин, рак уретри, рак пеніса, рак простати, рак сечового міхура, рак нирки або сечоводу, карциному клітин нирки, карциному
 45 ниркової балії, мезотеліому, гепатоклітинний рак, рак жовчного міхура, неоплазми центральної нервової системи (ЦНС), пухлини хребта, гліоми стовбура мозку, мультиформну гліобластому, астроцитому, шваному, епендимому, медулобластому, менингіому, плоскоклітинну карциному, аденому гіпофіза, включаючи версії яких-небудь зі зазначених вище форм раку, що не піддаються лікуванню, або комбінацію одного або декількох зазначених вище форм раку. В
 50 одному з варіантів здійснення даного винаходу поняття "рак" відноситься до раку, який експресує CD20.

Поняття "експресія антигену CD20" означає істотний рівень експресії антигену CD20 у клітині, переважно на поверхні Т- або В-клітин, більше переважно В-клітин, з пухлини або раку, відповідно, переважно пухлини, що не є щільною. Пацієнти з "раком, який експресує CD20"
 55 можуть бути визначені за допомогою стандартних методів, відомих у даній галузі. Наприклад, експресія антигену CD20 може бути виміряна, використовуючи імуногістохімічний метод визначення (immunohistochemical – IHC), метод FACS або засноване на ПЛР виявленні відповідної іРНК.

Поняття "рак, який експресує CD20" у контексті даного винаходу відноситься до всіх форм
 60 раку, в яких ракові клітини демонструють експресію антигену CD20. Переважно рак, який

експресує CD20, у контексті даного винаходу відноситься до лімфом (переважно до В-клітинної неходжкінської лімфоми (НХЛ)) і лімфоцитарних лейкозів. До таких лімфом і лімфоцитарних лейкозів відносяться, наприклад, а) фолікулярна лімфома, б) дрібноклітинна лімфома, що не ділиться/лімфома Беркітта (включаючи ендемічну лімфому Беркітта, спорадичну лімфому Беркітта и неберкіттську лімфому), в) лімфоми клітин маргінальної зони (включаючи екстранодальну лімфому з В-клітин маргінальної зони (асоційовану зі слизовою та лімфоїдною тканиною лімфому), вузлової лімфому з В-клітин маргінальної зони селезінки), г) лімфома клітин мантиї, д) великоклітинна лімфома (включаючи В-клітинну дифузійну великоклітинну лімфому, змішаноклітинну дифузійну В-великоклітинну лімфому, імунобластичну лімфому, первинну медіастинальну В-клітинну лімфому, ангіоцентричну лімфому – легеневу В-клітинну лімфому), е) волосатоклітинний лейкоз, ж) лімфоцитарна лімфома, макроглобулінемія Вальденстрема, з) гострий лімфолейкоз, хронічний лімфолейкоз (ХЛЛ)/лімфома малих лімфоцитів, В-клітинний пролімфоцитарний лейкоз, і) неоплазми плазматичних клітин, міелома плазматичних клітин, множинна міелома, плазмацитома, к) хвороба Ходжкіна.

В іншому варіанті здійснення даного винаходу раком, який експресує CD20, є В-клітинна неходжкінська лімфома (НХЛ). В іншому варіанті здійснення даного винаходу раком, який експресує CD20, є лімфома клітин мантиї, гострий лімфоцитарний лейкоз, хронічний лімфолейкоз (ХЛЛ), В-клітинна дифузійна великоклітинна лімфома, лімфома Беркітта, волосатоклітинний лейкоз, фолікулярна лімфома, множинна міелома, лімфома маргінальної зони, посттрансплантаційний лімфопроліферативний розлад, ВІЧ-асоційована лімфома, макроглобулінемія Вальденстрема або первинна лімфома ЦНС.

Поняття "спосіб лікування" або його еквівалент стосовно, наприклад, до раку, означає процедуру або курс дій, який призначений для зниження або елімінації числа ракових клітин у пацієнта або для полегшення симптомів раку. "Спосіб лікування раку" або іншого проліферативного розладу не обов'язково означає, що ракові клітини або інший розлад насправді може бути еліміновано, що число клітин або розлад насправді може бути знижене, або що симптоми раку або іншого розладу насправді можуть бути полегшені. Часто спосіб лікування раку може бути здійснений навіть при низькій ймовірності успіху, але який, одержуючи історію хвороби та оцінку ймовірності виживання пацієнта, проте вважаючи доцільним індукувати загальний цілющий курс лікування.

Поняття "спільне введення" і "вводяться разом" відносяться до введення зазначеного нефукозильованого анти-CD20 антитіла та бендамустину у вигляді єдиного складу або у вигляді двох різних складів. Спільне введення може бути одночасним або послідовним у тому або іншому порядку, причому переважно є період часу, коли обидва (або всі) діючі агенти одночасно проявляють свої біологічні дії. Зазначене анти-CD20 нефукозильоване антитіло та бендамустин вводяться спільно або одночасно, або послідовно (наприклад, внутрішньовенно шляхом безперервної інфузії (однієї для анти-CD20 антитіла й згодом іншої для бендамустину)). Якщо обидва терапевтичних агента вводяться спільно й послідовно, дозу вводять або у ту же добу, або у вигляді двох окремих введень, або один із агентів вводять в 1 добу, а другий агент одночасно вводять на 2-7 добу, переважно на 2-4 добу. Таким чином, поняття "послідовно" означає протягом 7 діб після дози першого компонента (бендамустину або антитіла), переважно протягом 4 діб після введення дози першого компонента; і поняття "одночасно" означає введення у той самий час. Поняття "спільне введення" стосовно до підтримуючих доз зазначеного нефукозильованого анти-CD20 антитіла та бендамустину означає, що підтримуючі дози можуть бути або спільно вводиться одночасно, якщо цикл лікування відповідає обом лікарським засобам, наприклад, щотижня. Або бендамустин, наприклад, вводять, наприклад, кожні 1-3 доби, і зазначене нефукозильоване антитіло вводять щотижня. Або підтримуючі дози одночасно вводять одну за іншою або протягом однієї, або протягом декількох доби(діб).

Якщо очевидно, що антитіла вводять пацієнтові у "терапевтично ефективній кількості" (або просто "ефективній кількості"), яке означає кількість відповідної сполуки або комбінації, яка може викликати біологічну або медичну відповідь тканини, системи, тварини або людини, яке підібране дослідником, ветеринаром, медиком або іншим клініцистом.

Кількість спільного введення зазначеного нефукозильованого анти-CD20 антитіла та бендамустину і розрахунок часу спільного введення може залежати від типу (виду, статі, віку, маси тіла тощо) і стану пацієнта, що зазнає лікування, і тяжкості захворювання або стану, що зазнає лікування. Зазначене нефукозильоване анти-CD20 антитіло та бендамустин спільно вводять відповідним чином пацієнтові у деякий час або протягом серій лікування.

Якщо проводять введення внутрішньовенно, первісний час інфузії для зазначеного нефукозильованого анти-CD20 антитіла або бендамустину може бути більше, ніж час для послідовних інфузій, наприклад, приблизно 90 хв для первісної інфузії та приблизно 30 хв для

наступних інфузій (якщо первісна інфузія добре переноситься).

Залежно від типу і тяжкості захворювання кількість приблизно від 1 мкг/кг до 50 мг/кг (наприклад, 0,1-20 мг/кг) зазначеного нефукозильованого анти-CD20 антитіла й від 1 мкг/кг до 50 мг/кг (наприклад, 0,1-20 мг/кг) бендамустину являє собою первісну розглянуту дозу для спільного введення обох лікарських засобів пацієнтові. В одному з варіантів здійснення даного винаходу краща доза зазначеного нефукозильованого анти-CD20 антитіла (переважно нефукозильованого гуманізованого антитіла B-Ly1) може перебувати у діапазоні приблизно від 0,05 мг/кг до приблизно 30 мг/кг. Таким чином, одна або декілька доз, що становлять приблизно 0,5 мг/кг, 2,0 мг/кг, 4,0 мг/кг, 10 мг/кг або 30 мг/кг (або яка-небудь їхня комбінація), можуть вводитися пацієнтові одночасно. В одному з варіантів здійснення даного винаходу доза бендамустину може бути у діапазоні від 0,01 мг/кг до приблизно 30 мг/кг, наприклад, від 0,1 мг/кг до 10,0 мг/кг. Залежно від типу (виду, статі, віку, маси тощо) і стану пацієнта і від типу нефукозильованого анти-CD20 антитіла дози та схеми введення зазначеного нефукозильованого антитіла та бендамустину можуть відрізнятися, наприклад, зазначене нефукозильоване анти-CD20 антитіло може вводитися, наприклад, кожні 1-3 тижні, а бендамустин може вводитися щодня або кожні 2-10 доби. Також може вводитися первісна підвищена ударна доза з наступним введенням однієї або декількох більше низьких доз.

В одному з кращих варіантів здійснення даного винаходу краща доза зазначеного нефукозильованого анти-CD20 антитіла (переважно нефукозильоване гуманізоване антитіло B-Ly1) може становити від 800 до 1200 мг на 1, 8, 15 добу 6-тижневого циклу дозування і потім у дозі від 800 до 1200 мг на 1 добу до п'яти 4-тижневих циклів дозування, і краща доза бендамустин може становити, наприклад, від 80 мг/м² до 110 мг/м² (в одному з варіантів здійснення даного винаходу 110 мг/м², в іншому варіанті здійснення даного винаходу 90 мг/м²) на 1 і 2 добу (введення внутрішньовенно й протягом 30 хв на 1 і 2 добу) до шести 4-тижневих циклів дозування. В іншому варіанті доза зазначеного нефукозильованого анти-CD20 антитіла може становити від 800 до 1200 мг (наприклад, 1000 мг) на 1 добу до восьми 3-тижневих циклів дозування.

В одному з варіантів здійснення даного винаходу лікарський засіб застосовний для попередження або зниження метастазування або подальшого поширення захворювання у таких пацієнтів із раком, переважно з раком, який експресує CD20. Лікарський засіб застосовний для підвищення тривалості виживання таких пацієнтів, підвищуючи безпрогресивне виживання таких пацієнтів, підвищення тривалості відповіді, приводячи до статистично істотного та клінічно значимого поліпшення стану у підданих лікуванню хворих, яке виражається у тривалості виживання, безпрогресивного виживання, швидкості відповіді або тривалості відповіді. В одному зі специфічних варіантів здійснення даного винаходу лікарський засіб застосовний для підвищення швидкості відповіді у групі пацієнтів.

У контексті даного винаходу додаткові інші цитотоксичні, хіміотерапевтичні або протиракові агенти або сполуки, які підвищують дію таких агентів (наприклад, цитокіни), можуть застосовуватися у лікуванні раку комбінацією нефукозильованого анти-CD20 антитіла та бендамустину. Такі молекули відповідним чином містяться у комбінації у кількостях, які ефективні для призначеної мети. В одному з варіантів здійснення даного винаходу зазначене лікування комбінацією нефукозильованого анти-CD20 антитіла та бендамустину застосовують без таких додаткових цитотоксичних, хіміотерапевтичних або протиракових агентів або сполук, які підвищують дію таких агентів.

До таких агентів, наприклад, відносяться: алкілюючі агенти або агенти з алкілюючою дією, наприклад, циклофосфамід (CTX; наприклад, продукт cytoxan®), хлорамбуцил (CHL; наприклад, продукт leukeran®), цисплатин (Cisp; наприклад, продукт platinol®), бусульфан (наприклад, продукт myleran®), мелфалан, кармустин (BCNU), стрептозотин, триетиленмеламін (TEM), мітоміцин C та ін.; антиметаболіти, наприклад, метотрексат (MTX), етопозид (VP16; наприклад, продукт verpesid®), 6-меркаптопурин (6MP), 6-тіоганін (6TG), цитарабін (Ara-C), 5-фторурацил (5-FU), капецитабін (наприклад, продукт Xeloda®), дакарбазин (DTIC) та ін.; антибіотики, наприклад, актиноміцин D, доксорубіцин (DXR; наприклад, продукт adriamycin®), даунорубіцин (дауноміцин), блеоміцин, мітраміцин та ін.; алкалоїди, наприклад, алкалоїди борвинка, наприклад, вінкрестин (VCR), вінбластин та ін.; та інші протипухлинні агенти, наприклад, паклітаксел (наприклад, продукт taxol®) і похідні паклітакселу, цитостатики, глюкокортикоїди, наприклад, дексаметазон (DEX; наприклад, продукт decadron®) і кортикостероїди, наприклад, преднізон, нуклеозиди – інгібітори ферментів, наприклад, гідроксисечовина, ферменти, що виснажують амінокислоти, наприклад, аспарагіназа, лейковорин і інші похідні фолієвої кислоти, а також подібні різноманітні протиракові агенти. Агенти, що приводяться нижче, також можуть застосовуватися в якості додаткових агентів: арніфостин (наприклад, продукт ethyol®),

дактиноміцин, мехлоретамін (азотистий іприт), стрептозоцин, циклофосфамід, ломустин (CCNU), ліпосомний доксорубіцин (наприклад, продукт doxil®), гемцитабін (наприклад, продукт gemzar®), ліпосомний даунорубіцин (наприклад, продукт daunoxome®), прокарбазин, мітоміцин, досетаксел (наприклад, продукт taxotere®), алдеслейкін, карбоплатин, оксаліплатин, кладрибін, камптотецин, СРТ 11 (іринотекан), 10-гідроксі 7-етил-камптотецин (SN38), флоксуридин, флударабін, іфосфамід, ідарубіцин, месна, інтерферон бета, інтерферон альфа, мітоксантрон, топотекан, лейпролід, мегестрол, мелфалан, меркаптопурин, плікаміцин, мітотан, пегаспаргас, пентостатин, піпоброман, плікаміцин, тамоксифен, теніпозид, тестолактон, тіогуанін, тіотепа, азотистий іприт, винорелбін, хлорамбуцил. Краще лікування комбінацією нефукозильованого анти-CD20 антитіла та бендамустину застосовують без таких додаткових агентів.

Застосування цитотоксичних і протиракових агентів, описаних вище, а також антипроліферативних специфічних відносно мішені протиракових лікарських засобів, наприклад, інгібіторів протеїнкінази у хіміотерапевтичних режимах, звичайно добре охарактеризоване в області протиракової терапії, та їх застосування у контексті даного винаходу підпадає під ті ж розгляди для моніторингу стійкості та ефективності й для контролю шляхів введення і доз із деякими коректуваннями. Наприклад, реальні дозування цитотоксичних агентів можуть варіювати залежно від відповіді культивованих клітин пацієнта, визначеного за допомогою методів гістологічних культур. У цілому доза може бути знижена у порівнянні з кількістю, яка застосовується при відсутності інших додаткових агентів.

Звичайно дози ефективного цитотоксичного агента можуть перебувати у діапазонах, рекомендованих виробником, і, якщо це впливає з відповідей *in vitro* або з відповідей, отриманих на тваринних моделях, можуть бути знижені приблизно до величини одного порядку концентрації або кількості. Таким чином, реальна доза може залежати від оцінки лікаря, стану пацієнта та ефективності способу терапії, заснованого на здатності до відповіді *in vitro* первинно культивованих злоякісних клітин або гістокультури зразка тканини, або відповідях, які спостерігаються у відповідних тваринних моделей.

У контексті даного винаходу може застосовуватися ефективна кількість іонізуючої радіації й/або радіофармацевтичний агент може застосовуватися додатково до лікування раку, який експресує CD20, комбінацією нефукозильованого анти-CD20 антитіла та бендамустину. Джерело радіації може бути або зовнішнім, або внутрішнім для пацієнта, що зазнає лікування. Якщо джерело радіації зовнішнє для пацієнта, лікування проводять як терапію зовнішнім радіоактивним пучком. Якщо джерело радіації внутрішнє для пацієнта, лікування називають брахітерапією або близькофокусною променевою терапією. Радіоактивні атоми для застосування у контексті даного винаходу можуть бути вибрані з групи, що включає, але ними перелік не обмежується, радій, цезій-137, іридій-192, америцій-241, золото-198, кобальт-57, мідь-67, технецій-99, йод-123, йод-131 та індій-111. Також можливо мітити антитіла такими радіоактивними ізотопами. Краще лікування комбінацією нефукозильованого анти-CD20 антитіла та бендамустину застосовують без такої іонізуючої радіації.

Радіаційна терапія є стандартним лікуванням для знищення нерезектабельних або неоперабельних пухлин й/або метастазів пухлин. Поліпшені результати спостерігають при радіаційній терапії, комбінованій з хіміотерапією. Радіаційна терапія заснована на принципі, що радіація у високій дозі, застосована у цільовій області, може призвести до загибелі репродуктивних клітин і у пухлинних, і у здорових тканинах. Режим дозування радіації звичайно виражають у термінах дози поглиненої радіації (греях, Гр), часу та фракціонування і він повинен бути ретельно визначений онкологом. Кількість радіації, яку отримує пацієнт, може залежати від різних обставин, але двома найбільше важливими є розташування пухлини і зв'язок з іншими важливими структурами або органами тіла та від ступеня поширення пухлини. Типовим курсом лікування пацієнта, що зазнає радіаційної терапії, може бути схема лікування протягом періоду з 1-6 тижнів із загальною дозою 10-80 Гр, введених пацієнтові при одиничному добовому ступені опромінення приблизно 1,8-2,0 Гр, 5 діб на тиждень. У кращому варіанті здійснення даного винаходу є синергізм, якщо пухлини пацієнта обробляють комбінованим лікуванням за даним винаходом і радіацією. Інакше кажучи, придушення росту пухлини за допомогою агентів, що включають комбінацію за даним винаходом, підвищене при комбінуванні радіації, необов'язково з додатковими протираковими або хіміотерапевтичними агентами. Параметри ад'ювантної радіаційної терапії представлені, наприклад, у WO 99/60023.

Нефукозильовані анти-CD20 антитіла можуть вводитися пацієнтові відомими методами, наприклад, внутрішньовенним введенням у вигляді болюса або безперервної інфузії протягом певного часу, внутрішньом'язовим, внутрішньочеревинним, внутрішньоспинномозковим, підшкірним, внутрішньосуглобним, підоболонковим або внутрішньосиновіальним шляхом. В одному з варіантів здійснення даного винаходу такі антитіла вводять внутрішньовенно або

підшкірно.

Бендамустин може вводиться пацієнтові відомими способами, наприклад, внутрішньовенним введенням у вигляді болюса або безперервної інфузії протягом певного часу, внутрішньом'язовим, внутрішньочеревинним, внутрішньоспиномозковим, підшкірним, внутрішньосуглобним, підоболонковим або внутрішньосиновіальним або пероральним шляхом. Відповідно до одного з варіантів здійснення даного винаходу таке антитіло вводять внутрішньовенно або внутрішньочеревинно.

У контексті даного винаходу поняття "фармацевтично прийнятний носій" відноситься до якого-небудь або до всіх матеріалів, сумісних з фармацевтичним введенням, що включають розчинники, диспергуючі середовища, покривні матеріали, антибактеріальні та протигрибкові агенти, ізотонічні та затримуючі всмоктування агенти, а також інші матеріали і сполуки, сумісні з фармацевтичним введенням. За винятком тих випадків, коли які-небудь традиційні середовища або агенти несумісні з діючою сполукою, їх застосування розглядають у композиціях даного винаходу. Додаткові діючі сполуки також можуть бути включені у композиції.

Фармацевтичні композиції

Фармацевтичні композиції можуть бути отримані шляхом переробки анти-CD20 антитіла і/або бендамустину за даним винаходом з фармацевтично прийнятними неорганічними або органічними носіями. Лактоза, кукурудзяний крохмаль або їх похідні, тальк, стеаринові кислоти або їх солі тощо можуть застосовуватися, наприклад, в якості таких носіїв для таблеток, таблеток з покриттям, драже і твердих желатинових капсул. Відповідними носіями для м'яких желатинових капсул є, наприклад, рослинні олії, воски, жири, напіврідкі і рідкі поліюлі тощо. Однак залежно від природи діючої речовини не потрібні носії, звичайно необхідні у випадку м'яких желатинових капсул. Відповідними носіями для одержання розчинів і сиропів є, наприклад, вода, поліюлі, гліцерин, рослинні олії тощо. Прийнятними носіями для супозиторіїв є, наприклад, природні або гартівні масла, воски, жири, напіврідкі і рідкі поліюлі тощо.

Крім того, фармацевтичні композиції можуть містити консерванти, розріджувачі, стабілізатори, зволожуючі агенти, емульгатори, підсолоджувачі, барвники, ароматизатори, солі для зміни осмотичного тиску, буфери, маскуючі агенти або антиоксиданти. Вони також можуть містити інші речовини терапевтичного призначення.

В одному з варіантів здійснення даного винаходу композиція включає й зазначене нефукозильоване анти-CD20 антитіло зі вмістом фукози 60 % або менше (в одному з варіантів здійснення даного винаходу зазначене антитіло є нефукозильованим гуманізованим антитілом B-Ly1), і бендамустин для застосування у лікуванні раку, зокрема, рак, який експресує CD20.

Зазначена фармацевтична композиція може включати один або декілька фармацевтично прийнятних носіїв.

Даний винахід додатково передбачає фармацевтичну композицію, зокрема для застосування відносно раку, що включає (i) ефективну кількість першого агента – нефукозильованого анти-CD20 антитіла зі вмістом фукози 60 % або менше (в одному з варіантів здійснення даного винаходу нефукозильоване гуманізоване антитіло B-Ly1), і (ii) ефективну кількість другого агента – бендамустину. Така композиція необов'язково включає фармацевтично прийнятні носії й/або ексципієнти.

Фармацевтичні композиції нефукозильованого анти-CD20 антитіла, яка одна застосовується відповідно до даного винаходу, одержують для зберігання шляхом змішування антитіла необхідного ступеня чистоти з необов'язковими фармацевтично прийнятними носіями, ексципієнтами або стабілізаторами (кн.: "Remington's Pharmaceutical Sciences", 1980, 16^e вид., під ред. Osol A.) у формі ліофілізованих складів або водних розчинів. Прийнятні носії, ексципієнти або стабілізатори є нетоксичними для реципієнтів у застосовуваних дозах і концентраціях і до них відносяться буфери, наприклад, фосфатний, цитратний та інших органічних кислот; антиоксиданти, включаючи аскорбінову кислоту та метіонін; консерванти (наприклад, октадецилдиметилбензиламоній хлорид; гексаметоній хлорид; бензалконій хлорид, бензетоній хлорид; фенол, бутіл або бензиловий спирт; алкілпарабени, наприклад, метил- або пропілпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол; m-крезол); низькомолекулярні поліпептиди (містять приблизно менше 10 залишків); білки, наприклад, сироватковий альбумін, желатин або імуноглобуліни; гідрофобні полімери, наприклад, полівінілпіролідон; амінокислоти, наприклад, гліцин, глутамін, аспарагін, гістидин, аргінін або лізин; моносахариди, дисахариди та інші вуглеводи, включаючи глюкозу, манозу або декстрини; хелатуючі агенти, наприклад, EDTA; цукри, наприклад, сахароза, маніт, трегалоза або сорбіт; формуючі солі протііони, наприклад, натрій; комплекси металів (наприклад, комплекси Zn-білка); і/або неіонні поверхневоактивні агенти, наприклад, TWEENTM, PLURONICSTM або поліетиленгліколь (ПЕГ).

Фармацевтичні композиції бендамустину можуть бути близькі описаним вище композиціям

для нефукозильованого анти-CD20 антитіла.

У ще одному з варіантів здійснення даного винаходу нефукозильоване анти-CD20 антитіло та бендамустин переробляють у два різних склади.

Діючі інгредієнти також можуть бути поміщені у мікрокапсули, отримані, наприклад, методами одержання коацерватів або шляхом об'єднання, наприклад, гідроксиметилцелюлози або полі(метилметакрилатних)мікрокапсул і желатинових мікрокапсул, відповідно, у колоїдні системи доставки лікарських засобів (наприклад, у ліпосоми, альбумінові мікрокапсули, мікроемульсії, наночастинки і нанокапсули) або у мікроемульсії. Такі методи описані у кн.: "Remington's Pharmaceutical Sciences", 1980, 16^е вид., під ред. Osol A.

Можуть бути отримані препарати стійкого вивільнення. Відповідними прикладами препаратів стійкого вивільнення є напівпроникні матриці твердих гідрофобних полімерів, що містять антитіло, матриці яких представлені у вигляді частинок певної форми, наприклад, у вигляді плівок або мікрокапсул. До прикладів матриць стійкого вивільнення відносяться поліефіри, гідрогелі (наприклад, полі(2-гідроксиметилметакрилат), або полівініловий спирт), полілактиди (US 3773919), співполімери L-глутамінової кислоти та гамма-етил-L-глутамату, етиленвініл ацетат, що не розкладається, співполімери молочної кислоти і гліколевої кислоти, що розкладаються, наприклад, продукт LUPRON DEPOTTM (ін'єкційні мікросфери, які складаються з співполімеру молочної кислоти і гліколевої кислоти і лепроліду ацетату) і полі-D(-)-3-гідроксимасляна кислота.

Склади для застосування введенням *in vivo* повинні бути стерильними. Це може бути легко виконане фільтрацією через стерильну мембрану.

Даний винахід додатково передбачає спосіб лікування раку, що включає введення пацієнтові, який потребує такого лікування, (i) ефективної кількості першого агента (нефукозильованого анти-CD20 антитіла, що містить 60 % фукози або менше; в одному з варіантів здійснення даного винаходу нефукозильованого гуманізованого антитіла B-Ly1); та (ii) ефективної кількості другого агента (бендамустину).

В одному з варіантів здійснення даного винаходу кількість фукози становить від 40 % до 60 %.

Переважаю зазначений рак є раком, який експресує CD20.

Переважаю зазначений рак, який експресує CD20, є В-клітинною неходжкінською лімфомою (НХЛ).

Переважаю зазначеним нефукозильованим анти-CD20 антитілом є анти-CD20 антитіло II типу.

Переважаю зазначене антитіло є гуманізованим антитілом B-Ly1.

Переважаю зазначене гуманізоване антитіло B-Ly1 вводять у дозі від 800 до 1200 мг на 1, 8, 15 добу 6-тижневого циклу дозування і потім у дозі від 800 до 1200 мг на 1 добу до п'яти 4-тижневих циклів дозування, і бендамустин вводять у дозі від 80 мг/м² до 110 мг/м² на 1 і 2 добу до шести 4-тижневих циклів дозування.

У контексті даного винаходу поняття "пацієнт" переважно відноситься до людини, яка потребує лікування нефукозильованим анти-CD20 антитілом (наприклад, пацієнта з раком, який експресує CD20) для якої-небудь мети, і більше переважно людини, яка потребує такого лікування для лікування раку, або передракового стану, або ушкодження. Однак поняття "пацієнт" також може відноситися до тварин, але не до людини, переважно до ссавців, наприклад, собак, кішок, коней, корів, свиней, овець і приматів, за винятком людини, а також до інших тварин.

Даний винахід також передбачає нефукозильоване анти-CD20 антитіло для лікування раку у комбінації з бендамустином.

Даний винахід також включає нефукозильоване анти-CD20 антитіло з кількістю фукози 60 % або менше і бендамустин для застосування у лікуванні раку.

Переважаю зазначене нефукозильоване анти-CD20 антитіло є гуманізованим антитілом B-Ly1.

Переважаю раком є рак, який експресує CD20, більше переважно В-клітинна неходжкінська лімфома (НХЛ).

Переважаю зазначене гуманізоване антитіло B-Ly1 вводять у дозі від 800 до 1200 мг в 1, 8, 15 добу 6-тижневого циклу дозування і потім у дозі від 800 до 1200 мг на 1 добу до п'яти 4-тижневих циклів дозування, і бендамустин вводять у дозі від 80 мг/м² до 110 мг/м² на 1 і 2 добу до шести 4-тижневих циклів дозування.

Приклади, що приводяться нижче, і фігури передбачені для полегшення розуміння даного винаходу, рамки охоплення якого встановлені у формулі винаходу. Очевидно, що модифікації можуть бути зроблені у ході описаних нижче процедур без відхилення від суті даного винаходу.

Переліки послідовностей

SEQ ID NO: 1 амінокислотна послідовність варіабельної області важкого ланцюга (VH) моноклонального анти-CD20 антитіла B-Ly1 миші.

5 SEQ ID NO: 2 амінокислотна послідовність варіабельної області легкого ланцюга (VL) моноклонального анти-CD20 антитіла B-Ly1 миші.

SEQ ID NO: 3-19 амінокислотна послідовність варіабельної області важкого ланцюга (VH) гуманізованих антитіл B-Ly1 (з B-HH2 по B-HH9, B-HL8 і з B-HL10 по B-HL17).

SEQ ID NO: 20 амінокислотні послідовності варіабельної області легкого ланцюга (VL) гуманізованого B-Ly1 антитіла B-KV1.

10 Опис фігур

Фіг. Протипухлинна дія *in vivo* комбінованого лікування нефукозильованим анти-CD20 антитілом II типу (B-HH6-B-KV1 GE) з бендамустином (у порівнянні з комбінацією ритуксимабу (фукозильованого анти-CD20 антитіла I типу) з бендамустином) і порівняння з відповідними монотерапіями.

15 Експериментальні методи

Протипухлинна дія комбінованого лікування анти-CD20 антитілом II типу (B-HH6-B-KV1 GE) з бендамустином

Досліджувані агенти

20 Нефукозильоване анти-CD20 антитіло B-HH6-B-KV1 GE (нефукозильоване гуманізоване антитіло B-Ly1, глікоінженерне антитіло B-HH6-B-KV1, див. WO2005/044859 і WO2007/031875) одержують у вигляді вихідного розчину (9,4 мг/мл) від фірми Glycart, Schlieren, Швейцарія. Буфер для антитіла включає гістидин, трегалозу і полісорбат 20. Розчин антитіла розводять відповідним чином у ФСБ із вихідного розчину для ін'єкцій.

25 Ритуксимаб (мабтера) для клінічного використання одержують від фірми Hoffmann La Roche, Базель.

Бендамустин (продукт Ribomustin®) здобувають на фірмі Mundipharma GmbH, Limburg an der Lahn, Німеччина. Необхідні розведення роблять з комерційного вихідного розчину 2,5 мг/мл.

Лінії клітин і умови культивування

30 Лінію клітин лімфоми клітин мантиї людини Z138 звичайним чином культивують у середовищі DMEM, збагаченої 10 % фетальної сироватки теляти (фірма PAA Laboratories, Австрія) і 2 мМ L-глутаміном, при 37 °C у насиченій вологою атмосфері з 8 % CO₂. Четвертий пасаж використовують для трансплантації. Проводять спільну ін'єкцію клітин і продукту Matrigel.

Тварини

35 Самок бежевих мишей лінії SCID у віці 3-4 тижня на момент поставки (фірма Charles River, Sulzfeld, Німеччина) тримають у специфічних умовах, що виключають патогени, при добовому ритмі 12 год. світла / 12 год. темряви відповідно до схвалених правил (GV-Solas; Felasa; TierschG). Протокол дослідження розглядається і затверджується місцевою владою. Придбаних тварин витримують у карантинному відсіку приміщення для тварин протягом одного тижня для звикання до нового середовища проживання і для спостереження. Безперервний моніторинг 40 стану здоров'я проводять на регулярній основі. Дієтичну їжу (Provimi Kliba 3337) і воду (підкислену до pH 2,5-3) надають за потребою.

Моніторинг

45 У тварин щодня контролюють клінічні симптоми і виявляють побічні ефекти. Протягом усього експерименту двічі на тиждень визначають масу тіла тварин, і після визначення стадії захворювання циркулем вимірюють об'єм пухлини.

Лікування тварин

50 Лікування тварин починають у день рандомізації через 19 діб після інокуляції пухлинних клітин. Гуманізоване нефукозильоване анти-CD20 антитіло B-HH6-B-KV1 GE або ритуксимаб вводять внутрішньочеревинно в якості окремих агентів один раз в 7 діб на 19 і 26 добу дослідження у призначеній дозі 1 мг/кг. У ті ж дні вводять відповідний розчинник. Бендамустин вводять внутрішньочеревинно на 19, 20, 21 і 22 добу у кількості 3 мг/кг. У групах комбінованої терапії хіміотерапевтичний агент вводять через 8 год. після введення обох антитіл на 19 добу.

Дослідження придушення росту пухлин *in vivo*

55 До кінця експерименту на 33 добу після інокуляції клітин пухлини відзначають придушення росту пухлини (ППП), зазначене у табл. 1, у тварин, що одержують ритуксимаб, анти-CD20 антитіло B-HH6-B-KV1 GE, комбінацію ритуксимабу та бендамустину або комбінацію анти-CD20 антитіла та бендамустину, відповідно, у порівнянні з контрольною групою. У даному експерименті лікування тільки одним бендамустином не показує якої-небудь протипухлинної дії.

60 Шляхом порівняння групи, підданої лікуванню комбінацією анти-CD20 антитілом B-HH6-B-KV1 GE/бендамустином, із групою, в якій лікують тільки одним анти-CD20 антитілом B-HH6-B-

KV1 GE, встановлено, що дія перевищує адитивний ефект.

Статистичний аналіз

- Дослідження закінчують на 33 добу. Статистична оцінка заснована на sAUC. Ріст пухлини статистично вірогідно пригнічується у групі 2 (В-НН6-В-KV1 GE, 1 мг/кг, раз на тиждень, внутрішньочеревинно), що показано величиною TCR=0,72 (ДІ 0,59-0,86), у групі 3 (ритуксимаб, 1 мг/кг, раз на тиждень, внутрішньочеревинно), що показано величиною TCR=0,78 (ДІ 0,65-0,93), у групі 5 (В-НН6-В-KV1 GE, 1 мг/кг, раз на тиждень, внутрішньочеревинно, у комбінації з бендамустином, 3 мг/кг, 19-22 доба дослідження, внутрішньочеревинно), що показано величиною TCR=0,46 (ДІ 0,34-0,59) і у групі 6 (ритуксимаб, 1 мг/кг, раз на тиждень, внутрішньочеревинно у комбінації з бендамустином, 3 мг/кг, 19-22 доба дослідження, внутрішньочеревинно), що показано величиною TCR=0,67 (ДІ 0,54-0,81) у порівнянні з групою застосування розчинника (група 1). Група 4 (бендамустин, 3 мг/кг, 19-22 доба дослідження, внутрішньочеревинно) показує ріст пухлин, порівнянний з ростом пухлин у контрольній групі до кінця дослідження.
- Комбінація В-НН6-В-KV1 GE з бендамустином показує дію, яка оцінюється більше ніж адитивна (синергетично) і статистично значима, з придушення росту пухлин у порівнянні з окремими обробками, дослідженими у тесті Tukey-Kramer ($p < 0,001$) (див. табл. 1 і Фіг.).

Таблиця 1

Параметричний показник TCR при низькому й високому довірчому інтервалі (ДІ), заснований на sAUC і ПРП (%)

| Група | Схема лікування | TCR | 95 % ДІ щодо групи 1 | ПРП (%) |
|-------|--|------|----------------------|---------|
| 2 | В-НН6-В-KV1 GE (раз на тиждень, 1 мг/кг) | 0,72 | [0,59-0,86] | 47 |
| 3 | Ритуксимаб (раз на тиждень, 1 мг/кг) | 0,78 | [0,65-0,93] | 29 |
| 4 | Бендамустин (на 19-22 добу дослідження, 3 мг/кг) | 0,9 | [0,76-1,06] | 0 |
| 5 | В-НН6-В-KV1 GE (раз на тиждень, 1 мг/кг) + Бендамустин (на 19-22 добу дослідження, 3 мг/кг) | 0,46 | [0,34-0,59] | 72 |
| 6 | Ритуксимаб (раз на тиждень, 1 мг/кг) + Бендамустин (на 19-22 добу дослідження, 3 мг/кг) | 0,67 | [0,54-0,81] | 42 |

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Рош Глікарт АГ

<120> КОМБІНОВАНА ТЕРАПІЯ НЕФУКОЗИЛЬОВАНИМ АНТИ-CD20 АНТИТІЛОМ З
БЕНДАМУСТИНОМ

<130> 26255

<150> EP 09010489.4

<151> 2009-08-14

<160> 27

<170> Patentin version 3.5

<210> 1

<211> 112

<212> БІЛОК

<213> Mus sp.

<220>

<221> інші ознаки

<223> амінокислотна послідовність варіабельної області важкого
ланцюга (VH)моноклонального анти-CD20 антитіла миші B-Ly1

<400> 1

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Pro | Glu | Leu | Val | Lys | Pro | Gly | Ala | Ser | Val | Lys | Ile | Ser | Cys | Lys |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Ser | Gly | Tyr | Ala | Phe | Ser | Tyr | Ser | Trp | Met | Asn | Trp | Val | Lys | Leu |
| | | 20 | | | | | | 25 | | | | | 30 | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Arg | Pro | Gly | Gln | Gly | Leu | Glu | Trp | Ile | Gly | Arg | Ile | Phe | Pro | Gly | Asp |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | |

Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr
50 55 60

Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Met Gln Leu Thr Ser Leu Thr
65 70 75 80

Ser Val Asp Ser Ala Val Tyr Leu Cys Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly
85 90 95

Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
100 105 110

<210> 2

<211> 103

<212> БІЛОК

<213> Mus sp.

<220>

<221> інші ознаки

<223> амінокислотна послідовність варіабельної області легкого ланцюга (VL)моноклонального анти-CD20 антитіла миші B-Ly1

<400> 2

Asn Pro Val Thr Leu Gly Thr Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
1 5 10 15

Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu
20 25 30

Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn
35 40 45

Leu Val Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr
50 55 60

Asp Phe Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val
65 70 75 80

Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly
85 90 95

Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100

<210> 3
<211> 119
<212> БІЛОК
<213> Штучна

<220>
<223> амінокислотна послідовність варіабельної області важкого ланцюга (VH) гуманізованого антитіла B-Ly1(B-HH2)

<400> 3

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

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

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser 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 Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 4

<211> 119

<212> БІЛОК

<213> Штучна

<220>

<223> амінокислотні послідовності варіабельної області важкого ланцюга (VH) гуманізованого антитіла B-Ly1 (B-HH3)

<400> 4

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

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

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

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 5

<211> 119

<212> БІЛОК

<213> Штучна

<220>

<223> амінокислотні послідовності варіабельної області важкого ланцюга (VH)гуманізованого антитіла B-Ly1(B-HH4)

<400> 5

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

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

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser 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 Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 6

<211> 119

<212> ВІЛОК

<213> Штучна

<220>

<223> амінокислотні послідовності варіабельної області важкого ланцюга (VH) гуманізованого антитіла B-Ly1 (B-HH5)

<400> 6

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

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

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser 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 Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 7

<211> 119

<212> БІЛОК

<213> Штучна

<220>

<223> амінокислотні послідовності варіабельної області важкого ланцюга (VH) гуманізованого антитіла B-Ly1 (B-HH6)

<400> 7

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
20 25 30

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

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

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser 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 Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 8

<211> 119

<212> БІЛОК

<213> Штучна

<220>

<223> амінокислотні послідовності варіабельної області важкого ланцюга (VH) гуманізованого антитіла B-Ly1 (B-HH7)

<400> 8

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
20 25 30

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

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

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser 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 Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 9

<211> 119

<212> БІЛОК

<213> Штучна

<220>

<223> амінокислотні послідовності варіабельної області важкого ланцюга (VH) гуманізованого антитіла B-Ly1 (B-HH8)

<400> 9

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Tyr Ser
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

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

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser 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 Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 10

<211> 119

<212> БІЛОК

<213> Штучна

<220>

<223> амінокислотні послідовності варіабельної області важкого ланцюга (VH) гуманізованого антитіла B-Ly1 (B-НН9)

<400> 10

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Tyr Ser
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

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

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser 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 Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 11

<211> 119

<212> БІЛОК

<213> Штучна

<220>

<223> амінокислотні послідовності варіабельної області важкого ланцюга (VH)гуманізованого антитіла B-Ly1(B-HL8)

<400> 11

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

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

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

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

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser 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 Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 12

<211> 119

<212> БІЛОК

<213> Штучна

<220>

<223> амінокислотні послідовності варіабельної області важкого ланцюга (VH)гуманізованого антитіла B-Lyl(B-HL10)

<400> 12

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

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

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

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

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser 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 Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 13

<211> 119

<212> БІЛОК

<213> Штучна

<220>

<223> амінокислотні послідовності варіабельної області важкого ланцюга (VH) гуманізованого антитіла B-Ly1(B-HL11)

<400> 13

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

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

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

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

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser 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 Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 14

<211> 119

<212> БІЛОК

<213> Штучна

<220>

<223> амінокислотні послідовності варіабельної області важкого ланцюга (VH) гуманізованого антитіла B-Ly1 (B-HL12)

<400> 14

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

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

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

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

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser 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 Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 15

<211> 119

<212> БІЛОК

<213> Штучна

<220>

<223> амінокислотні послідовності варіабельної області важкого ланцюга (VH) гуманізованого антитіла B-Ly1 (B-HL13)

<400> 15

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

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

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

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

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser 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 Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 16

<211> 119

<212> БІЛОК

<213> Штучна

<220>

<223> амінокислотні послідовності варіабельної області важкого ланцюга (VH)гуманізованого антитіла B-Ly1(B-HH14)

<400> 16

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

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

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

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

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser 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 Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 17
<211> 119
<212> БІЛОК
<213> Штучна

<220>
<223> амінокислотні послідовності варіабельної області важкого ланцюга (VH)гуманізованого антитіла B-Lyl(B-HH15)

<400> 17

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

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

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

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

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser 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 Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 18

<211> 119

<212> БІЛОК

<213> Штучна

<220>

<223> амінокислотні послідовності варіабельної області важкого ланцюга (VH)гуманізованого антитіла B-Ly1(B-HL16)

<400> 18

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

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ser | Leu | Arg | Val | Ser | Cys | Ala | Ala | Ser | Gly | Phe | Thr | Phe | Ser | Tyr | Ser |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Trp | Met | Asn | Trp | Val | Arg | Gln | Ala | Pro | Gly | Lys | Gly | Leu | Glu | Trp | Met |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | | 45 | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Arg | Ile | Phe | Pro | Gly | Asp | Gly | Asp | Thr | Asp | Tyr | Asn | Gly | Lys | Phe |
| | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Lys | Gly | Arg | Val | Thr | Ile | Thr | Ala | Asp | Lys | Ser | Thr | Ser | 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 Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 19
 <211> 119
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна

<220>
 <223> амінокислотні послідовності варіабельної області важкого ланцюга (VH)гуманізованого антитіла B-Ly1 (B-HL17)

<400> 19

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

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

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

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

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser 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 Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 20

<211> 115

<212> БІЛОК

<213> Штучна

<220>

<223> амінокислотні послідовності варіабельної області легкого ланцюга (VL)гуманізованого антитіла B-Ly1 B-KV1

<400> 20

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

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

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Val Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

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

Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val
115

<210> 21

<211> 144

<212> BIJOK

<213> Homo sapiens

<400> 21

Met Trp Leu Gln Ser Leu Leu Leu Leu Gly Thr Val Ala Cys Ser Ile
1 5 10 15

Ser Ala Pro Ala Arg Ser Pro Ser Pro Ser Thr Gln Pro Trp Glu His
20 25 30

Val Asn Ala Ile Gln Glu Ala Arg Arg Leu Leu Asn Leu Ser Arg Asp
35 40 45

Thr Ala Ala Glu Met Asn Glu Thr Val Glu Val Ile Ser Glu Met Phe
50 55 60

Asp Leu Gln Glu Pro Thr Cys Leu Gln Thr Arg Leu Glu Leu Tyr Lys
65 70 75 80

Gln Gly Leu Arg Gly Ser Leu Thr Lys Leu Lys Gly Pro Leu Thr Met
85 90 95

Met Ala Ser His Tyr Lys Gln His Cys Pro Pro Thr Pro Glu Thr Ser
 100 105 110

Cys Ala Thr Gln Ile Ile Thr Phe Glu Ser Phe Lys Glu Asn Leu Lys
 115 120 125

Asp Phe Leu Leu Val Ile Pro Phe Asp Cys Trp Glu Pro Val Gln Glu
 130 135 140

<210> 22

<211> 144

<212> EIMOK

<213> Homo sapiens

<400> 22

Met Trp Leu Gln Ser Leu Leu Leu Leu Gly Thr Val Ala Cys Ser Ile
 1 5 10 15

Ser Ala Pro Gly Arg Ser Pro Ser Pro Ser Thr Gln Pro Trp Glu His
 20 25 30

Val Asn Ala Ile Gln Glu Ala Arg Arg Leu Leu Asn Leu Ser Arg Asp
 35 40 45

Thr Ala Ala Glu Met Asn Glu Thr Val Glu Val Ile Ser Glu Met Phe
 50 55 60

Asp Leu Gln Glu Pro Thr Cys Leu Gln Thr Arg Leu Glu Leu Tyr Lys
 65 70 75 80

Gln Gly Leu Arg Gly Ser Leu Thr Lys Leu Lys Gly Pro Leu Thr Met
85 90 95

Met Ala Ser His Tyr Lys Gln His Cys Pro Pro Thr Pro Glu Thr Ser
100 105 110

Cys Ala Thr Gln Thr Ile Thr Phe Glu Ser Phe Lys Glu Asn Leu Lys
115 120 125

Asp Phe Leu Leu Val Ile Pro Phe Asp Cys Trp Glu Pro Val Gln Glu
130 135 140

<210> 23
<211> 152
<212> BIMOK
<213> Homo sapiens

<400> 23

Met Ser Arg Leu Pro Val Leu Leu Leu Leu Gln Leu Leu Val Arg Pro
1 5 10 15

Gly Leu Gln Ala Pro Met Thr Gln Thr Thr Pro Leu Lys Thr Ser Trp
20 25 30

Val Asn Cys Ser Asn Met Ile Asp Glu Ile Ile Thr His Leu Lys Gln
35 40 45

Pro Pro Leu Pro Leu Leu Asp Phe Asn Asn Leu Asn Gly Glu Asp Gln
50 55 60

Asp Ile Leu Met Glu Asn Asn Leu Arg Arg Pro Asn Leu Glu Ala Phe
65 70 75 80

Asn Arg Ala Val Lys Ser Leu Gln Asn Ala Ser Ala Ile Glu Ser Ile
85 90 95

Leu Lys Asn Leu Leu Pro Cys Leu Pro Leu Ala Thr Ala Ala Pro Thr
100 105 110

Arg His Pro Ile His Ile Lys Asp Gly Asp Trp Asn Glu Phe Arg Arg
115 120 125

Lys Leu Thr Phe Tyr Leu Lys Thr Leu Glu Asn Ala Gln Ala Gln Gln
130 135 140

Thr Thr Leu Ser Leu Ala Ile Phe
145 150

<210> 24

<211> 152

<212> БИЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 24

Met Ser Arg Leu Pro Val Leu Leu Leu Leu Gln Leu Leu Val Arg Pro
1 5 10 15

Gly Leu Gln Ala Pro Met Thr Gln Thr Thr Ser Leu Lys Thr Ser Trp
20 25 30

Val Asn Cys Ser Asn Met Ile Asp Glu Ile Ile Thr His Leu Lys Gln
35 40 45

Pro Pro Leu Pro Leu Leu Asp Phe Asn Ser Leu Asn Gly Glu Asp Gln
50 55 60

Asp Ile Leu Met Glu Asn Asn Leu Arg Arg Pro Asn Leu Glu Ala Phe
65 70 75 80

Asn Arg Ala Val Lys Ser Leu Gln Asn Ala Ser Ala Ile Glu Ser Ile
85 90 95

Leu Lys Asn Leu Leu Pro Cys Leu Pro Leu Ala Thr Ala Ala Pro Thr
100 105 110

Arg His Pro Ile His Ile Lys Asp Gly Asp Trp Asn Glu Phe Arg Arg
115 120 125

Lys Leu Thr Phe Tyr Leu Lys Thr Leu Glu Asn Ala Gln Ala Gln Gln
130 135 140

Thr Thr Leu Ser Leu Ala Ile Phe
145 150

<210> 25

<211> 152

<212> EIJOK

<213> Homo sapiens

<400> 25

Met Ser Arg Leu Pro Val Leu Leu Leu Leu Gln Leu Leu Val Arg Pro
1 5 10 15

Gly Leu Gln Ala Pro Met Thr Gln Thr Thr Ser Leu Lys Thr Ser Trp
20 25 30

Val Asn Cys Ser Asn Met Ile Asp Glu Ile Ile Thr Arg Leu Lys Gln
 35 40 45

Pro Pro Leu Pro Leu Leu Asp Phe Asn Asn Leu Asn Gly Glu Asp Gln
 50 55 60

Asp Ile Leu Met Glu Asn Asn Leu Arg Arg Pro Asn Leu Glu Ala Phe
 65 70 75 80

Asn Arg Ala Val Lys Ser Leu Gln Asn Ala Ser Ala Ile Glu Ser Ile
 85 90 95

Leu Lys Asn Leu Leu Pro Cys Leu Pro Leu Ala Thr Ala Ala Pro Thr
 100 105 110

Arg His Pro Ile His Ile Lys Asp Gly Asp Trp Asn Glu Phe Arg Arg
 115 120 125

Lys Leu Thr Phe Tyr Leu Lys Thr Leu Glu Asn Ala Gln Ala Gln Gln
 130 135 140

Thr Thr Leu Ser Leu Ala Ile Phe
 145 150

<210> 26

<211> 554

<212> БИЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 26

Met Thr Ala Pro Gly Ala Ala Gly Arg Cys Pro Pro Thr Thr Trp Leu
1 5 10 15

Gly Ser Leu Leu Leu Leu Val Cys Leu Leu Ala Ser Arg Ser Ile Thr
20 25 30

Glu Glu Val Ser Glu Tyr Cys Ser His Met Ile Gly Ser Gly His Leu
35 40 45

Gln Ser Leu Gln Arg Leu Ile Asp Ser Gln Met Glu Thr Ser Cys Gln
50 55 60

Ile Thr Phe Glu Phe Val Asp Gln Glu Gln Leu Lys Asp Pro Val Cys
65 70 75 80

Tyr Leu Lys Lys Ala Phe Leu Leu Val Gln Asp Ile Met Glu Asp Thr
85 90 95

Met Arg Phe Arg Asp Asn Thr Pro Asn Ala Ile Ala Ile Val Gln Leu
100 105 110

Gln Glu Leu Ser Leu Arg Leu Lys Ser Cys Phe Thr Lys Asp Tyr Glu
115 120 125

Glu His Asp Lys Ala Cys Val Arg Thr Phe Tyr Glu Thr Pro Leu Gln
130 135 140

Leu Leu Glu Lys Val Lys Asn Val Phe Asn Glu Thr Lys Asn Leu Leu
145 150 155 160

Asp Lys Asp Trp Asn Ile Phe Ser Lys Asn Cys Asn Asn Ser Phe Ala

| | | | | | |
|---|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 165 | | 170 | | 175 |
| Glu Cys Ser Ser Gln Asp Val Val Thr Lys Pro Asp Cys Asn Cys Leu | | | | | |
| | 180 | | 185 | | 190 |
| Tyr Pro Lys Ala Ile Pro Ser Ser Asp Pro Ala Ser Val Ser Pro His | | | | | |
| | 195 | | 200 | | 205 |
| Gln Pro Leu Ala Pro Ser Met Ala Pro Val Ala Gly Leu Thr Trp Glu | | | | | |
| | 210 | | 215 | | 220 |
| Asp Ser Glu Gly Thr Glu Gly Ser Ser Leu Leu Pro Gly Glu Gln Pro | | | | | |
| 225 | | 230 | | 235 | 240 |
| Leu His Thr Val Asp Pro Gly Ser Ala Lys Gln Arg Pro Pro Arg Ser | | | | | |
| | 245 | | 250 | | 255 |
| Thr Cys Gln Ser Phe Glu Pro Pro Glu Thr Pro Val Val Lys Asp Ser | | | | | |
| | 260 | | 265 | | 270 |
| Thr Ile Gly Gly Ser Pro Gln Pro Arg Pro Ser Val Gly Ala Phe Asn | | | | | |
| | 275 | | 280 | | 285 |
| Pro Gly Met Glu Asp Ile Leu Asp Ser Ala Met Gly Thr Asn Trp Val | | | | | |
| | 290 | | 295 | | 300 |
| Pro Glu Glu Ala Ser Gly Glu Ala Ser Glu Ile Pro Val Pro Gln Gly | | | | | |
| 305 | | 310 | | 315 | 320 |
| Thr Glu Leu Ser Pro Ser Arg Pro Gly Gly Gly Ser Met Gln Thr Glu | | | | | |
| | 325 | | 330 | | 335 |

Pro Ala Arg Pro Ser Asn Phe Leu Ser Ala Ser Ser Pro Leu Pro Ala
340 345 350

Ser Ala Lys Gly Gln Gln Pro Ala Asp Val Thr Gly Thr Ala Leu Pro
355 360 365

Arg Val Gly Pro Val Arg Pro Thr Gly Gln Asp Trp Asn His Thr Pro
370 375 380

Gln Lys Thr Asp His Pro Ser Ala Leu Leu Arg Asp Pro Pro Glu Pro
385 390 395 400

Gly Ser Pro Arg Ile Ser Ser Leu Arg Pro Gln Gly Leu Ser Asn Pro
405 410 415

Ser Thr Leu Ser Ala Gln Pro Gln Leu Ser Arg Ser His Ser Ser Gly
420 425 430

Ser Val Leu Pro Leu Gly Glu Leu Glu Gly Arg Arg Ser Thr Arg Asp
435 440 445

Arg Arg Ser Pro Ala Glu Pro Glu Gly Gly Pro Ala Ser Glu Gly Ala
450 455 460

Ala Arg Pro Leu Pro Arg Phe Asn Ser Val Pro Leu Thr Asp Thr Gly
465 470 475 480

His Glu Arg Gln Ser Glu Gly Ser Ser Ser Pro Gln Leu Gln Glu Ser
485 490 495

Val Phe His Leu Leu Val Pro Ser Val Ile Leu Val Leu Leu Ala Val
500 505 510

Gly Gly Leu Leu Phe Tyr Arg Trp Arg Arg Arg Ser His Gln Glu Pro
515 520 525

Gln Arg Ala Asp Ser Pro Leu Glu Gln Pro Glu Gly Ser Pro Leu Thr
530 535 540

Gln Asp Asp Arg Gln Val Glu Leu Pro Val
545 550

<210> 27

<211> 554

<212> BIJOK

<213> Homo sapiens

<400> 27

Met Thr Ala Pro Gly Ala Ala Gly Arg Cys Pro Pro Thr Thr Trp Leu
1 5 10 15

Gly Ser Leu Leu Leu Leu Val Cys Leu Leu Ala Ser Arg Ser Ile Thr
20 25 30

Glu Glu Val Ser Glu Tyr Cys Ser His Met Ile Gly Ser Gly His Leu
35 40 45

Gln Ser Leu Gln Arg Leu Ile Asp Ser Gln Met Glu Thr Ser Cys Gln
50 55 60

Ile Thr Phe Glu Phe Val Asp Gln Glu Gln Leu Lys Asp Pro Val Cys
65 70 75 80

Tyr Leu Lys Lys Ala Phe Leu Leu Val Gln Asp Ile Met Glu Asp Thr
85 90 95

Met Arg Phe Arg Asp Asn Thr Pro Asn Ala Ile Ala Ile Val Gln Leu
100 105 110

Gln Glu Leu Ser Leu Arg Leu Lys Ser Cys Phe Thr Lys Asp Tyr Glu
115 120 125

Glu His Asp Lys Ala Cys Val Arg Thr Phe Tyr Glu Thr Pro Leu Gln
130 135 140

Leu Leu Glu Lys Val Lys Asn Val Phe Asn Glu Thr Lys Asn Leu Leu
145 150 155 160

Asp Lys Asp Trp Asn Ile Phe Ser Lys Asn Cys Asn Asn Ser Phe Ala
165 170 175

Glu Cys Ser Ser Gln Asp Val Val Thr Lys Pro Asp Cys Asn Cys Leu
180 185 190

Tyr Pro Lys Ala Ile Pro Ser Ser Asp Pro Ala Ser Val Ser Pro His
195 200 205

Gln Pro Leu Ala Pro Ser Met Ala Pro Val Ala Gly Leu Thr Trp Glu
210 215 220

Asp Ser Glu Gly Thr Glu Gly Ser Ser Leu Leu Pro Gly Glu Gln Pro
225 230 235 240

Leu His Thr Val Asp Pro Gly Ser Ala Lys Gln Arg Pro Pro Arg Ser
245 250 255

Thr Cys Gln Ser Phe Glu Pro Pro Glu Thr Pro Val Val Lys Asp Ser
260 265 270

Thr Ile Gly Gly Ser Pro Gln Pro Arg Pro Ser Val Gly Ala Phe Asn
275 280 285

Pro Gly Met Glu Asp Ile Leu Asp Ser Ala Met Gly Thr Asn Trp Val
290 295 300

Pro Glu Glu Ala Ser Gly Glu Ala Ser Glu Ile Pro Val Pro Gln Gly
305 310 315 320

Thr Glu Leu Ser Pro Ser Arg Pro Gly Gly Gly Ser Met Gln Thr Glu
325 330 335

Pro Ala Arg Pro Ser Asn Phe Leu Ser Ala Ser Ser Pro Leu Pro Ala
340 345 350

Ser Ala Lys Gly Gln Gln Pro Ala Asp Val Thr Gly Thr Ala Leu Pro
355 360 365

Arg Val Gly Pro Val Arg Pro Thr Gly Gln Asp Trp Asn His Thr Pro
370 375 380

Gln Lys Thr Asp His Pro Ser Ala Leu Leu Arg Asp Pro Pro Glu Pro
385 390 395 400

Gly Ser Pro Arg Ile Ser Ser Leu Arg Pro Gln Gly Leu Ser Asn Pro
 405 410 415

Ser Thr Leu Ser Ala Gln Pro Gln Leu Ser Arg Ser His Ser Ser Gly
 420 425 430

Ser Val Leu Pro Leu Gly Glu Leu Glu Gly Arg Arg Ser Thr Arg Asp
 435 440 445

Arg Arg Ser Pro Ala Glu Pro Glu Gly Gly Pro Ala Ser Glu Gly Ala
 450 455 460

Ala Arg Pro Leu Pro Arg Phe Asn Ser Val Pro Leu Thr Asp Thr Gly
 465 470 475 480

His Glu Arg Gln Ser Glu Gly Ser Phe Ser Pro Gln Leu Gln Glu Ser
 485 490 495

Val Phe His Leu Leu Val Pro Ser Val Ile Leu Val Leu Leu Ala Val
 500 505 510

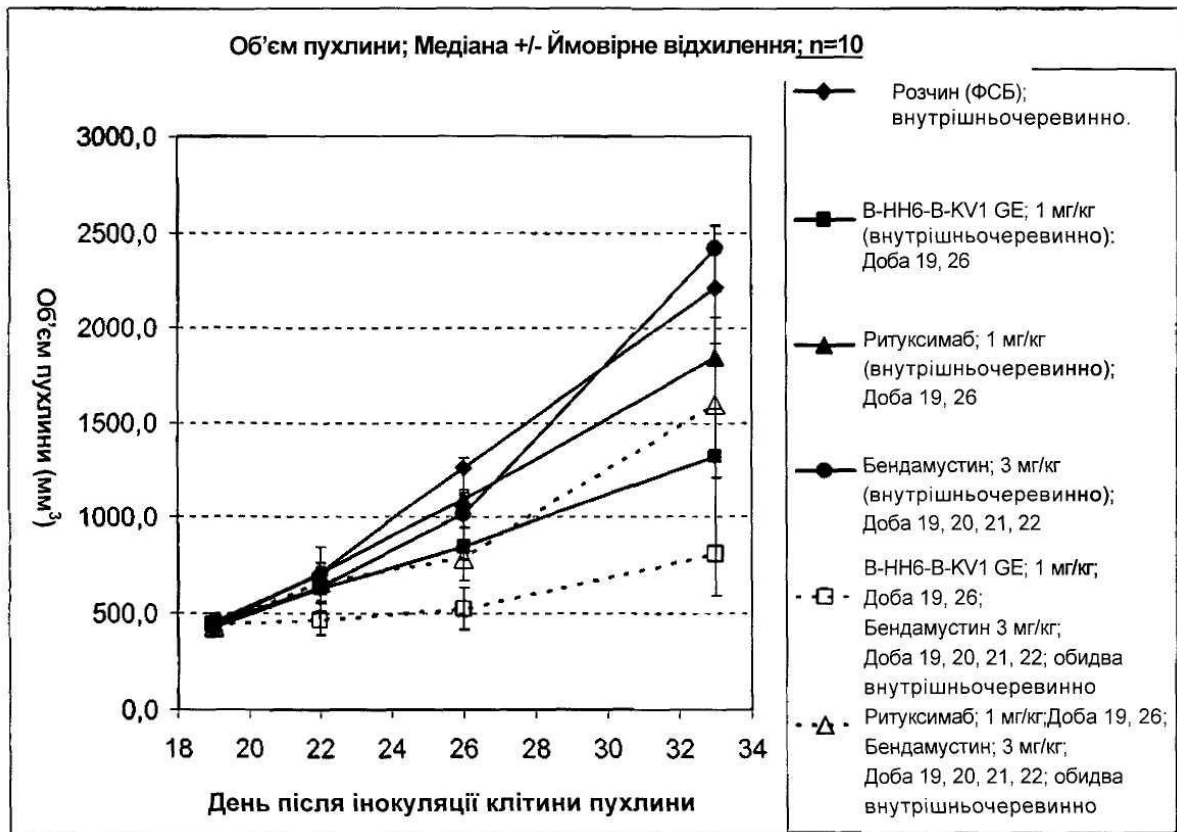
Gly Gly Leu Leu Phe Tyr Arg Trp Arg Arg Arg Ser His Gln Glu Pro
 515 520 525

Gln Arg Ala Asp Ser Pro Leu Glu Gln Pro Glu Gly Ser Pro Leu Thr
 530 535 540

Gln Asp Asp Arg Gln Val Glu Leu Pro Val
 545 550

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Застосування нефукозильованого анти-CD20 антитіла з кількістю фукози 60 % або менше від загальної кількості олігосахаридів (цукрів) у положенні Asn297 для одержання лікарського засобу для лікування раку у комбінації з бендамустином, де зазначеним раком є рак, який експресує CD20, і тим, що зазначене антитіло містить амінокислотну послідовність варіабельної області важкого ланцюга (VH), представлену у SEQ ID NO:7, і амінокислотну послідовність варіабельної області легкого ланцюга (VL), представлену у SEQ ID NO:20.
2. Застосування за п. 1, яке **відрізняється** тим, що кількість фукози становить від 40 до 60 %.
3. Застосування за п. 1 або 2, яке **відрізняється** тим, що зазначений рак, який експресує CD20, є В-клітинною неходжкінською лімфомою (НХЛ).
4. Застосування за одним із пп. 1-3, яке **відрізняється** тим, що вводять один або декілька додаткових інших цитотоксичних, хіміотерапевтичних або протиракових агентів, або сполук, або застосовують іонізуючу радіацію, що підвищує дію таких агентів.
5. Застосування за одним із пп. 1-4, яке **відрізняється** тим, що зазначене антитіло вводять у дозі 800-1200 мг на 1,8, 15 добу 6-тижневого циклу дозування та потім у дозі від 800 до 1200 мг на 1 добу 4-тижневого циклу, який може тривати до 5 разів, і бендамустин вводять у дозі від 80 мг/м² до 110 мг/м² на 1 і 2 добу 4-тижневого циклу, який може тривати до 6 разів.
6. Нефукозильоване анти-CD20 антитіло з кількістю фукози 60 % або менше від загальної кількості олігосахаридів (цукрів) за положенням Asn297 для лікування раку у комбінації з бендамустином, де зазначеним раком є рак, який експресує CD20, і тим, що зазначене антитіло містить амінокислотну послідовність варіабельної області важкого ланцюга (VH), представлену у SEQ ID NO:7, і амінокислотну послідовність варіабельної області легкого ланцюга (VL), представлену у SEQ ID NO:20.
7. Антитіло за п. 6, яке **відрізняється** тим, що кількість фукози становить від 40 до 60 %.
8. Антитіло за п. 6 або 7, де зазначений рак, який експресує CD20, є В-клітинною неходжкінською лімфомою (НХЛ).
9. Антитіло за одним із п. 6-8, де вводять один або декілька додаткових інших цитотоксичних, хіміотерапевтичних або протиракових агентів, або сполук, або застосовують іонізуючу радіацію, що підвищує дію таких агентів.
10. Антитіло за одним із пп. 6-9, яке **відрізняється** тим, що зазначене антитіло вводять у дозі 800-1200 мг на 1, 8, 15 добу 6-тижневого циклу дозування та потім у дозі від 800 до 1200 мг на 1 добу 4-тижневого циклу, який може тривати до 5 разів, і бендамустин вводять у дозі від 80 мг/м² до 110 мг/м² на 1 і 2 добу 4-тижневого циклу, який може тривати до 6 разів.



Фіг.

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601