



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **99591** (13) **C2**  
(51) МПК (2012.01)  
**A61K 38/43** (2006.01)  
**A61K 38/17** (2006.01)  
**A61P 27/00**

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**

<b>(21)</b> Номер заявки: <b>а 2008 07619</b>	<b>(72)</b> Винахідник(и): <b>Фунг Сек Чунг (US),</b> <b>Яо Женгбін (US)</b>
<b>(22)</b> Дата подання заявки: <b>04.11.2006</b>	<b>(73)</b> Власник(и): <b>ДЖЕНЕНТЕК, ІНК.,</b> 1 Dna Way, South San Francisco, California 94080, United States of America (US)
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права на винахід: <b>10.09.2012</b>	<b>(74)</b> Представник: <b>Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр. №115</b>
<b>(31)</b> Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>60/733,763</b>	<b>(56)</b> Перелік документів, взятих до уваги експертизою: BORA ET AL.: 'Role of Complement and Complement Membrane attack Complex in Laser-Induced Choroidal Neovascularization' J. IMMUNOL. vol. 174, 01 January 2005, p. 491 - 497 US 2002/0081293 A1, 27.06.2002 WO 02/30985 A2, 18.04.2002 US 2005/0222027 A1, 10.06.2005 US 6,333,034 B1, 25.12.2001
<b>(32)</b> Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>04.11.2005</b>	
<b>(33)</b> Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: <b>US</b>	
<b>(41)</b> Публікація відомостей про заявку: <b>25.07.2008, Бюл.№ 14</b>	
<b>(46)</b> Публікація відомостей про видачу патенту: <b>10.09.2012, Бюл.№ 17</b>	
<b>(86)</b> Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: <b>РСТ/US2006/043103, 04.11.2006</b>	

**(54) ЗАСТОСУВАННЯ ІНГІБІТОРІВ ШЛЯХУ КОМПЛЕМЕНТУ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ОЧНИХ ХВОРОБ**

**(57) Реферат:**

Винахід стосується способу запобігання або полегшення очної хвороби, яка пов'язана з активністю комплексу у суб'єкта, що включає стадію введення інгібітору шляху комплексу суб'єкту, який потребує такого введення, де шлях комплексу являє собою альтернативний шлях комплексу, де інгібітор інгібує активність фактора В, фактора Ва, фактора Bb або фактора D і де інгібітор являє собою антитіло або його зв'язувальний фрагмент.

UA 99591 C2



Цей винахід стосується інгібування шляху комплементу, зокрема, інгібування Фактора D, у пацієнтів, страждаючих від пов'язаних з очними хворобами станів і від хвороб, пов'язаних з активацією комплементу, таких як вікова макулярна дегенерація, діабетична ретинопатія.

#### РІВЕНЬ ВІНАХОДУ

Макулярна дегенерація являє собою клінічний термін, який застосовується для опису сімейства захворювань, які характеризуються прогресуючою втратою центрального зору, пов'язаної з аномаліями мембрани Бруха, хоріоїду, невральної сітківки і/або ретинального пігментного епітелію. У центрі сітківки знаходиться жовта пляма, діаметр якої становить приблизно 1/3-1/2 см. Пляма забезпечує гострий зір, особливо, в центрі (в ямці), тому що колбочки сітківки мають більш високу густину. Кровоносні судини, клітини ганглію, внутрішній нуклеарний шар і клітини, і плексиформні шари повернені в одну сторону (на відміну від тих, що залишилися, розташованих вище), надаючи таким чином світлу більш прямого шляху до колбочок сітківки. Під сітківкою розташовується хоріоїд, набір кровоносних судин, укрплених в фіброзну тканину, і пігментний епітелій (PE), який покриває хоріоїдний шар. Хоріоїдні кровоносні судини забезпечують живленням сітківку (особливо, її зорові клітини). Хоріоїд і PE виявлені в задній області ока.

Ретинальні пігментні епітеліальні клітини (RPE), які складають PE, продукують, зберігають і транспортують множини чинників, які відповідальні за нормальне функціонування і існування фоторецепторів. Ці мультифункціональні клітини транспортують метаболіти до фоторецепторів з кровотоку через хоріокапіляри ока. RPE клітини також функціонують як макрофаг, фагоцитувальний кінець зовнішнього сегменту паличок і колбочок сітківки, які продукуються при нормальній течії клітинної фізіології. Різноманітні іони, білки і вода пересуваються між RPE клітинами і внутрішнім фоторецепторним простором, і ці молекули, зрештою, впливають на метаболізм і виживаність фоторецепторів.

Вікова макулярна дегенерація (AMD), найпоширеніша макулярна дегенерація, асоційована з прогресуючою втратою гостроти зору в центральній ділянці поля зору, змінами хроматичного зору і аномальною адаптацією до темряви і чутливістю. Два принципових клінічних вияви AMD були описані, як суха, або атрофічна, форма і волога, або ексудативна, форма. Суха форма асоційована з атрофічною клітинною смертю центральної сітківки або макули, яка потрібна для тонкого зору, який застосовується для таких активностей, як читання, водіння або розпізнавання осіб. Приблизно у 10-20% таких пацієнтів з сухою формою AMD захворювання прогресує до другої форми AMD, відомої, як волога форма AMD. Волога (неоваскулярна/ексудативна) форма AMD викликана аномальним зростанням кровоносних судин перед сітківкою під макулою і васкулярним просоченням, що приводить в результаті до зміщення сітківки, крововиливу і утворення рубця. Це приводить в результаті до погіршення зору на період часу, який складає місяці і роки. Однак пацієнти можуть страждати швидкою втратою зору. Всі випадки вологої форми AMD утворюються з розвиненої сухої форми AMD. Волога форма є причиною 85% випадків сліпоти через AMD. При вологій формі AMD, оскільки через кровоносні судини просочується рідина і кров, утворюється рубцева тканина, яка руйнує центральну сітківку. Найбільш значними факторами ризику для розвитку обох форм захворювання є вік і відкладення друз, аномальних позаклітинних осадів за ретинальним пігментним епітелієм. Друзи викликають латеральне розтягнення моношару RPE і фізичне зміщення RPE від його безпосередньої системи кровопостачання, хоріокапілярів. Це зміщення створює фізичний бар'єр, який може перешкодити нормальній дифузії метаболітів і відходів між хоріокапілярами і сітківкою. Друзи є ознакою осадів, асоційованих з AMD. Біогенез друз включає дисфункцію RPE, погіршуючи гідроліз зовнішніх сегментів фоторецептора і послідовне накопичення дебрису. Друзи містять активатори комплементу, інгібітори, фрагменти комплементу, специфічні для активації, і компоненти термінального шляху комплементу, включаючи мембраноатакуючий комплекс (MAC або C5b-9), наявність яких передбачає, що фокальна концентрація цих речовин може зробити потужний хемотоксичний стимул для лейкоцитів, діючих через каскад комплементу (Killingsworth, et al., (2001) Exp Eye Res 73, 887-96). Недавні дослідження включали локальне запалення і активацію каскаду комплементу в стадії їх утворення (Bok D. Proc Natl Acad Sci (USA). 2005; 102: 7053-4; Hageman GS, et al. Prog Retin Eye Res. 2001; 20: 705-32; Anderson DH, et al. Am J Ophthalmol. 2002; 134: 411-31. Johnson LV, et al. Exp Eye Res. 2001; 73: 887-96). Волога форма AMD асоційована з хоріоїдальною неоваскуляризацією (CNV), і є складним біологічним процесом. Патогенез утворення нової хоріоїдальної судини погано вивчений, але вважається, що такі фактори, як запалення, ішемія і локальне продукування ангіогенних чинників є важливими. Хоч передбачалося, що запалення відіграє роль, при цьому роль комплементу не з'ясовувалася. Попереднє дослідження CNV на мишачій моделі показало, що CNV викликане активацією комплементу (Bora PS, J Immunol. 2005; 174: 491-497). Система

комплементу є ключовим компонентом природженого імунітету проти мікробної інфекції, і включає групу білків, які звичайно присутні в сироватці в не активному стані. Ці білки організовані в три шляхи активації: класичний, лектиновий і альтернативний (V.M. Holers, In *Clinical Immunology: Principles and Practice*, ed. R.R. Rich, Mosby Press; 1996, 363-391).

Молекули на поверхні мікробів можуть активувати ці шляхи, що приводить в результаті до утворення протеазних комплексів, відомих як С3-конвертази. Класичний шлях являє собою кальцій/магній-залежний каскад, який звичайно активується при утворенні комплексів антиген/антитіло. Він також може активуватися залежним від антитіла чином за допомогою зв'язування С - реакційноздатного білка, утворюючого комплекс з лігандом і за допомогою великої кількості патогенів, що містять грам-негативні бактерії. Альтернативний шлях являє собою магній-залежний каскад, який активується за допомогою внеску і активації С3 на певних сприйнятливих поверхнях (наприклад, полісахаридах клітинної стінки дріжджів і бактерій, і певних біополімерних речовинах).

Альтернативний шлях бере участь в ампліфікації активності обох шляхів класичного і лектинового (Suankratay, 3., *ibid*; Fairies, T.C. et al., *Moі. Immunol.* 27: 1155-1161(1990)). Активація шляху комплементу генерує біологічно активні фрагменти білків комплементу, наприклад, С3а, С4а і С5а анафілатоксини і С5b-9 мембраноатакуючі комплекси (MAC), які опосередковують запальні реакції за допомогою залучення хемотаксису лейкоцитів, активації макрофагів, нейтрофілів, тромбоцитів, тучних клітин і ендотеліальних клітин, за допомогою збільшеної васкулярної проникності, цитолізу і пошкодження тканини.

Фактор D може бути відповідною мішенню для інгібування цієї ампліфікації шляхів комплементу, тому що його концентрація в плазмі людини дуже низька (1,8 мкг/мл), і було показано, що він є лімітуючим ферментом активації альтернативного шляху комплементу (P.H. Lesavre and H.J. Miiller-Eberhard. *J. Exp. Med.*, 1978; 148: 1498-1510; J.E. Volanakis et al, *New Eng. J. Med.*, 1985; 312: 395-401). Було продемонстровано із застосуванням моделей на тваринах і в *ex vivo* дослідженнях, що інгібування активації комплементу є ефективним при лікуванні симптомів деяких хвороб, наприклад, червоного вовчаку і гломерулонефриту (Y. Wang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 1996, 93: 8563-8568).

З застосуванням аналізу поліморфізму окремих нуклеотидів (SNP) у AMD пацієнтів, було виявлено, що генетичний варіант Фактора H (Y402H) є з високою мірою асоційованим із збільшеною захворюваністю AMD (Zarepari S, Branham KEH, Li M, et al. *Am J Hum Genet.* 2005; 77: 149-53; Haines JL, et al. *Sci* 2005; 208: 419-21). Суб'єкти, що є або гомозиготними або гетерозиготними по цій точковій мутації гена Фактора H, становлять 50% випадків AMD. Фактор H є ключовим розчинним інгібітором альтернативного шляху комплементу (Rodriguez de Cordoba S, et al. *Moі Immunol* 2004; 41: 355-67). Він зв'язується з С3b і, таким чином, прискорює розпад С3-конвертази альтернативного шляху (С3bBb) і діє як кофактор для опосередкованої Фактором I протеолітичної інактивації С3b. Дослідження з гістохімічним фарбуванням показали, що існує однаковий розподіл Фактора H і MAC в області контакту RPE-хоріоїд. Виявлені у пацієнтів з AMD значні кількості відкладення MAC в цій області контакту вказують, що гаплотип Фактора H (Y402H) може володіти ослабленою функцією інгібування комплементу. Передбачається, що Фактор H (Y402H) може володіти зниженою аффіністю зв'язування з С3b. Таким чином, він не настільки ефективний, як дикий тип Фактора H в інгібуванні активації альтернативного шляху комплементу. Це ставить RPE і клітини хоріоїду в положення постійного ризику атаки комплементу, опосередкованої альтернативним шляхом. Було показано, що відсутність в плазмі Фактора H викликає активацію альтернативного шляху, що не контролюється, з використанням С3 і часто інших компонентів комплементу, таких як С5. Відповідно до цих отриманих даних, відомо, що рівень Фактора H в плазмі зменшується при курінні, яке є відомим фактором ризику для розвитку AMD (Esparza-Gordillo J, et al. *Immunogenetics.* 2004; 56: 77-82).

У цей час не існує перевіреної лікарської терапії для сухої форми AMD, і не доступне ніяке лікування для розвиненої сухої форми AMD. Для вибраних випадків вологої форми AMD може бути ефективний метод, відомий як лазерна фотокоагуляція для закриття протікаючих або кровоносних судин, що кровоточать. На жаль, лазерна коагуляція не повертає втрачений зір, але тільки сповільнює і, в деяких випадках, запобігає подальшій втраті зору. Нещодавно, було показано, що фотодинамічна терапія є ефективною для зупинки аномального зростання кровоносних судин приблизно для однієї третини пацієнтів з вологою формою AMD у випадку раннього лікування. При використанні Фотодинамічної Терапії Visdyne (PDT), барвник ін'єктують в око пацієнта, він накопичується в ділянці протікання судини в сітківці, і під впливом лазера з низькою енергією він реагує закриває протікаючі судини. У доповнення до цих двох лазерних методів існує декілька антиангіогенних терапій, направлених на створення конструкцій

васкулярного ендотеліального фактора росту (VEGF) для лікування вологої форми AMD. Однак тільки 10% підданих лікуванню пацієнтів показують поліпшення зору.

Беручи до уваги ці неадекватні способи лікування вологої форми AMD і тотальну відсутність доступних способів лікування розвиненої сухої форми AMD, очевидно, що необхідне створення нових способів лікування цього серйозного захворювання. У нашому винаході пропонується новий спосіб лікування цього серйозного захворювання.

#### СУТЬ ВИНАХОДУ

Даний винахід стосується інгібіторів комплементу для лікування пов'язаних з очною хворобою станів або хвороб, таких як вікова макулярна дегенерація (AMD), діабетична ретинопатія, ангиогенез, пов'язаний з очною хворобою, (такий як неоваскуляризація, пов'язана з очною хворобою, що впливає на хоріоїдну, корнеальну тканини або тканину сітківки), і для лікування інших станів, пов'язаних з очною хворобою, що включають активацію комплементу. Лікування AMD включає обидві форми AMD вологу і суху.

Інгібітори комплементу за даним винаходом включають, але не обмежені ними, ті, що інгібують альтернативний шлях комплементу, такі як Фактор D, пропердин, Фактор В, Фактор Ва, і Фактор Вb, і ті, що інгібують класичний шлях комплементу, такі як C3a, C5, C5a, C5b, C6, C1, C8, C9 і C5b-9. Даний винахід також включає застосування інгібіторів комплементу в комбінації з іншими агентами, такими як антиангіогенні агенти і протизапальні агенти, такі як стероїди.

Інше втілення даного винаходу стосується застосування інгібіторів C5aR і C3aR, таких як антитіла і виділені фрагменти, і однодоменні конструкції, а також низькомолекулярні компоненти.

Інше втілення даного винаходу стосується застосування рекомбінантного розчинного білка CR1 (TP10) і білків, виділених з нього; застосування молекул, інгібуючих C3, (таких як компстатин, пептидоміметик, який зв'язується з C3 і інгібує його активацію); застосування кіРНК, які блокують синтез C3, C5, FD, фактора Р, фактора В.

Ці інгібітори можуть являти собою, але не обмежені ними, низькомолекулярні хімічні компоненти, нуклеотиди, пептиди, білки, пептидоміметики і антитіла.

Інше втілення даного винаходу включає застосування людського Фактора Н, очищеного з крові людини, або рекомбінантного людського Фактора Н, що вводиться пацієнтам за допомогою внутрішньоочного введення або за допомогою іншого клінічно ефективного шляху введення.

Антитіла за даним винаходом включають суцільні імуноглобуліни, scFv, Fab, Fab', Fv, F(ab')<sub>2</sub>, або dAb. Домени антитіл включають або VH домен, або VL домен.

Одне втілення даного винаходу являє собою застосування моноклонального антитіла, яке зв'язується з Фактором D і блокує його здатність активувати альтернативний шлях комплементу. Такі антитіла описані в WO 01/70818 і US 20020081293, які введені сюди за допомогою посилання, такі антитіла як моноклональне антитіло 166-32, отримане з гібридами, депонованої в АТСС і позначеної HB 12476. Даний винахід також включає антитіла, які специфічно зв'язуються з тим же епітопом, що і моноклональне антитіло 166-32. Моноклональні антитіла за даним винаходом можуть також включати гуманізовані антитіла супутньої заявки, яка введена сюди за допомогою посилання.

Одне втілення за даним винаходом являє собою застосування моноклонального антитіла, яке зв'язується з компонентом комплементу C5a. Такі антитіла включають антитіло 137-26, отримане з гібридами, депонованої в АТСС і позначеної РТА-3650, і будь-яке антитіло, яке специфічно зв'язується з тим же епітопом, що і антитіло 137-26.

Згідно з даним винаходом, інгібітор шляху комплементу може вводитися шляхом (а) парентерального введення; (b) з допомогою біосумісного або біодеградуючого імплантанту з уповільненим вивільненням; (c) за допомогою імплантації інфузійного насоса; або (d) за допомогою локального введення, такого як субкон'юнктивальне введення або введення в скловидне тіло. Інгібітор комплементу може також вводитися за допомогою парентерального введення, вибраного з перорального введення, ентерального введення і місцевого введення. Місцеве введення може включати способи введення за допомогою розчину для очного примочування, очної мазі, очного щитка або розчину очних крапель.

Крім того, інгібітор комплементу за даним винаходом може вводитися в комбінації з імуномодулюючим або імуноприглушувальним компонентом.

Інше втілення даного винаходу стосується введення конструкцій нуклеїнової кислоти, які здатні експресувати інгібітори шляху комплементу для генної терапії.

Інше втілення даного винаходу включає спосіб скринінгу інгібіторів комплементу, які застосовні в лікуванні AMD, включаючи застосування моделі AMD на старіючих мишах,

дифіцитних по Ccl-2 або Ccr-2. У цих мишей виявляються гістопатологічні зміни, подібні виявленим при сухій і вологій формі AMD людини. Ці миші можуть бути піддані лікуванню інгібіторами комплементу або Фактора Н за допомогою введення в скловидне тіло. Гістологічне дослідження може бути здійснене для визначення захисту від розвитку AMD у мишей, підданих лікуванню за допомогою агентів, що тестуються.

#### ДОКЛАДНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

Цей винахід не обмежений спеціальними, описаними в описі винаходу, методами, протоколами, клітинними лініями, векторами або реагентами, тому що вони можуть варіюватися. Крім того, застосовувана термінологія не призначена тільки для цілей опису конкретних втілень, і мається на увазі, що вона не обмежена рамками даного винаходу. У описі і формулі винаходу, форми однини включають посилання на множину, якщо тільки в контексті ясно не обумовлене інше, наприклад, посилання на "клітина-хазяїн" включає множину таких клітин-хазяїв.

Якщо не визначено інше, всі застосовувані технічні і наукові терміни і будь-які акроніми, мають такі ж значення, як і в загальноприйнятому розумінні фахівців в даній галузі винаходу. Тут описані приведені для прикладу способи, інструменти і речовини, хоч в практичній галузі даного винаходу можуть застосовуватися будь-які подібні або еквівалентні описаним тут способам або речовинам.

Всі вказані патенти і публікації включені в опис за допомогою посилання в допустимій згідно із законом мірі, для цілей опису і визначення білків, ферментів, векторів, клітин-хазяїв і методів, опублікованих тут, які можуть застосовуватися за даним винаходом. Однак тут нічого не повинно бути витлумачено, як допущення, що винахід не дає права датувати більш раннім числом таку заявку на основі попереднього винаходу.

#### Визначення

Термін "варіант амінокислотної послідовності" означає поліпептиди, що мають амінокислотні послідовності, які відрізняються в деякій мірі від нативної послідовності поліпептиду. Звичайно, варіанти амінокислотної послідовності мають щонайменше приблизно, 70% гомологію з нативним поліпептидом, або щонайменше, приблизно, 80% гомологію, або щонайменше, приблизно, 90% гомологію з нативним поліпептидом. Варіанти амінокислотної послідовності мають заміни, делеції і/або вставки в певних положеннях всередині нативної амінокислотної послідовності.

Термін "ідентичність" або "гомологія" визначається як відсоток амінокислотних залишків в кандидатній послідовності, які ідентичні із залишком відповідної послідовності, з якою здійснюється порівняння, після порівняння послідовностей і введення пропусків, якщо необхідно для досягнення максимального відсотка ідентичності для всієї послідовності, при цьому, не враховуючи ніяких консервативних замін як частину ідентичності. Ні N- або C-кінцеві подовження або вставки не повинні бути витлумачені як такі, що зменшують ідентичність або гомологію. Способи і комп'ютерні програми для порівняння добре відомі з рівня техніки. Ідентичність послідовності може бути легко розрахована відомими способами, що включають, але не обмежені способами, описаними в (Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; and Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; and Carillo, 30 H, and Lipman, D, SIAM J. Applied Math, 48: 1073 (1988). Способи визначення ідентичності розроблені для отримання найбільшого збігу між послідовностями, що тестуються. Способи визначення ідентичності між двома послідовностями з використанням комп'ютерних програм включають, але не обмежені пакетом програм GCG (Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research 12(1): 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, and FASTA (Atschul, S. F. et al., J Molec. Biol. 215: 403-410 (1990). Програма BLAST X загальнодоступна через NCBI і через інші джерела (BLASTManual, Altschul, S., et al, NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul, S., et al., Biol. 215: 403-410 (1990). Добре відомий алгоритм Сміта-Ватермана також може застосовуватися для визначення ідентичності.

Термін "антитіло" застосовується тут в широкому значенні і конкретно охоплює інтактні моноклональні антитіла, поліклональні антитіла, мультиспецифічні антитіла (наприклад, біспецифічні антитіла), утворені щонайменше з двох інтактних антитіл і фрагментів антитіл, оскільки вони виявляють бажану біологічну активність.

Термін "моноклональне антитіло", як застосовується тут, означає антитіло, отримане з популяції по суті гомогенних антитіл, тобто індивідуальні антитіла, що складають популяцію, є ідентичними за винятком можливих природних мутацій, які можуть бути присутніми в мінорних

кількостях. На відміну від препаратів поліклональних антитіл, які включають різні антитіла, направлені проти різних детермінант (епітопів), кожне моноклональне антитіло направлене проти однієї детермінанти на антигені. Модифікатор "моноклональне" показує характер антитіла, яке отримане з, по суті, гомогенної популяції антитіл, і цей термін не повинен бути витлумачений, як такий, що вимагає отримання антитіла яким-небудь конкретним способом. Наприклад, моноклональні антитіла, які застосовуються відповідно до даного винаходу, можуть бути отримані за допомогою гібридомного способу, описаного уперше Kohler et al, Nature, 256:495 (1975), or may be made by recombinant DNA methods (see, e.g., U.S. Pat. No. 4,816,567). "Моноклональні антитіла" можуть бути також виділені з фагової бібліотеки антитіл із застосуванням методик, описаних, наприклад, у C1ackson et al, Nature, 352:624-628 (1991) and Marks et al, J. Mol. Biol, 222:581-597 (1991). Моноклональні антитіла тут конкретно включають "химерні" антитіла, в яких ділянка важкого і/або легкого ланцюга є ідентичною або гомологічним відповідним послідовностям антитіл, виділених з конкретних видів, або що стосується конкретного класу або підкласу антитіл, в той час як ділянка ланцюга(ів), яка залишилася, є ідентичною або гомологічною відповідній послідовності антитіл, виділених з інших видів, або що стосується іншого класу або підкласу антитіл, а також є ідентичною або гомологічною відповідній послідовності таких фрагментів антитіл, оскільки вони виявляють бажану біологічну активність (U.S. Pat. No. 4,816,567; and Morrison et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)).

"Фрагменти антитіл" включають ділянку інтактного антитіла, що включає його антиген-зв'язувальну або варіабельну ділянку. Приклади фрагментів антитіла включають фрагменти Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, і Fv; діатіла; лінійні антитіла; одноланцюжкові молекули антитіл; і мультиспецифічні антитіла, утворені з фрагментів антитіл.

"Інтактне" антитіло являє собою антитіло, яке включає антиген-зв'язувальну варіабельну ділянку, а також константний домен легкого ланцюга (CL) і константні домени важкого ланцюга, CH1, CH2 і CH3. Константні домени можуть являти собою нативні послідовності константних доменів (наприклад, людські нативні послідовності константних доменів) або їх варіант амінокислотної послідовності. Інтактне антитіло може володіти однією або більше ефекторними функціями.

"Ефекторні функції" антитіла означають такі біологічні активності, які можуть бути віднесені до Fc ділянки (нативна послідовність Fc ділянки або варіант амінокислотної послідовності Fc ділянки) антитіла. Приклади ефекторних функцій антитіла включають C1q зв'язування; комплемент-залежну цитотоксичність; зв'язування Fc рецептора; антитіло-залежну клітинно-опосередковану цитотоксичність (ADCC); фагоцитоз; даун-регуляцію рецепторів клітинної поверхні (наприклад, B-клітинний рецептор; BCR) тощо.

В залежності від амінокислотної послідовності константного домену їх важких ланцюгів інтактні антитіла можуть бути віднесені до різних "класів". Існує п'ять головних класів інтактних антитіл: IgA, IgD, IgE, IgG і IgM і деякі з них можуть бути додатково розділені на "підкласи" (ізотипи), наприклад, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA і IgA2. Константні домени важкого ланцюга, які відповідають різним класам антитіл, називаються  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  і  $\mu$ , відповідно. Структури субодиниць і тривимірні конфігурації різних класів імунoglobulinів добре відомі.

"Антитіло-залежна клітинно-опосередкована цитотоксичність" (ADCC) означає клітинно-опосередковану реакцію, в якій не специфічні цитотоксичні клітини, які експресують Fc рецептори (FcR) (наприклад, Натуральні Кілерні клітини (NK), нейтрофіли і макрофаги) розпізнають зв'язане антитіло на клітини-мішені і, отже, викликають лізис клітини-мішені. Первинні клітини, опосередковані ADCC, NK клітини, експресують тільки Fc $\gamma$ RIII, тоді як моноцити експресують Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII і Fc $\gamma$ RIII. FcR експресується на гемопоетичних клітинах. Для визначення ADCC активності цікавлячої молекули може бути здійснений *in vitro* ADCC тест, такий як описаний в U.S. Пат. No. 5500362 або 5821337. Застосовувані ефекторні клітини для таких тестів включають мононуклеарні клітини периферичної крові (PBMC) і Натуральні Кілерні (NK) клітини. Альтернативно або додатково, ADCC активність цікавлячої молекули може бути визначена *in vivo*, наприклад, в моделі тварин. Деякі такі моделі є загальнодоступними.

Термін "варіабельний" означає той факт, що певні ділянки варіабельних доменів істотно відрізняються за послідовностями між антитілами і застосовуються для зв'язування і специфічності кожного конкретного антитіла для його конкретного антигену. Однак варіабельність неоднаково розподілена по послідовностях варіабельних доменів антитіл. Вона сконцентрована в трьох сегментах, які називаються гіперваріабельними ділянками, обидва в легкому ланцюгу і варіабельні домени важкого ланцюга. Ці гіперваріабельні ділянки також називаються ділянками, що визначають комплементарність або CDR. Найбільш високо-консервативні ділянки називаються каркасними ділянками (FR). Кожний з варіабельних доменів

нативних важкого і легкого ланцюгів включає чотири FR, Звичайно приймаючий конфігурацію  $\beta$  - листа, зв'язаних трьома гіперваріабельними ділянками, які утворюють петлі, зв'язуючі і в деяких випадках утворюючи частину структури  $\beta$  - листа. Гіперваріабельні ділянки в кожному ланцюгу за допомогою FR підтримуються разом в близькому сусідстві, і з гіперваріабельними ділянками з іншого ланцюга вносять внесок в утворення антиген-зв'язувального сайту антитілу (дивись Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)).

Термін "гіперваріабельна ділянка" означає амінокислотні залишки антитіла, які відповідальні за зв'язування з антигеном. Гіперваріабельна ділянка звичайно включає амінокислотні залишки з "ділянки, що визначає комплементарність" або "CDR" (наприклад, залишки 24-34 (L1), 50-56 (L2) і 89-97 (L3) у варіабельному домені легкого ланцюга і 31-35 (H1), 50-65 (H2) і 95-102 (H3) у варіабельному домені важкого ланцюга; Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed.)( Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.)( (1991)) і/або залишки з "гіперваріабельної петлі" (наприклад, залишки 2632 (L1), 50-52 (L2) і 91-96 (L3) у варіабельному домені легкого ланцюга і 26-32 (H1), 53-55 (H2) і 96-101 (H3) у варіабельному домені важкого ланцюга; Chothia and Lesk J. Mol Biol. 196:901-917 (1987)). Як тут визначається, залишки "Каркасної ділянки" або "FR" залишки являють собою такі залишки варіабельного домену, які відмінні від залишків гіперваріабельної ділянки.

За допомогою папаїнового гідролізу антитілу отримують два ідентичні антиген-зв'язувальних фрагменти, які називаються "Fab" фрагментами, кожний з одним антиген-зв'язувальним сайтом, і залишковий "Fc" фрагмент, чия назва відображає його здатність легко кристалізуватися. При обробці пепсином отримують F(ab')<sub>2</sub> фрагмент, який має два антиген-зв'язувальних сайти, і все ще залишається здатним до перехресного зв'язування антигену.

Fab фрагмент також містить константну домен легкого ланцюга і першу константну домен (CH1) важкого ланцюга. Fab фрагменти відрізняються від Fab фрагментів вставкою декількох залишків в карбокси-кінець CH1 домену важкого ланцюга, включаючи один або більше цистеїнів з шарнірної ділянки антитіла. Fab'-SH тут є позначенням для Fab', в якому цистеїнові залишки константних доменів несуть щонайменше одну вільну тиольну групу. F(ab')<sub>2</sub> фрагменти антитіла початково були отримані як пари Fab' фрагментів, між якими розташовуються шарнірні цистеїни. Також відомі інші хімічні конденсації фрагментів антитіла.

"Легкі ланцюги" антитілу з будь-яких рослинних видів можуть бути віднесені до одного з двох абсолютно окремих типів, які називаються каппа (K) і лямбда ( $\lambda$ ), на основі амінокислотних послідовностей їх константних доменів.

"Fv" являє собою мінімальний фрагмент антитіла, який містить повний антиген-розпізнавальний і антиген-зв'язувальний сайт. Ця ділянка складається з димера одного варіабельного домену важкого ланцюга і одного варіабельного домену легкого ланцюга, які знаходяться в щільному, але не ковалентному зв'язку. Вони знаходяться в такій конфігурації, щоб три гіперваріабельних ділянки кожного гіперваріабельного домену взаємодіяли для визначення антиген-зв'язувального сайту на поверхні VH-VL димера. Разом, шість гіперваріабельних ділянок дають антитілу антиген-зв'язувальну специфічність. Однак навіть один варіабельний домен (або половина Fv, що включає тільки три гіперваріабельні ділянки, специфічні для антигену) володіє здатністю розпізнавати і зв'язувати антиген, хоч з меншою аффінією, ніж повний сайт зв'язування.

"Одноланцюжковий Fv" або "scFv" фрагменти антитіла включають VH і VL домени антитіла, де ці домени присутні у вигляді одного поліпептидного ланцюга. Переважно, Fv поліпептид додатково включає поліпептидний лінкер між VH і VL доменами, який дає можливість scFv утворювати бажану структуру для зв'язування антигену. Як огляд по scFv дивись Plickthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer- Verlag, New York, pp. 269-315 (1994). scFv фрагменти антитіла до ErbB2 описані в WO93/16185; U.S. Пат. No. 5571894; і U.S. Пат. No. 5587458.

Термін "діатіла" означає короткі фрагменти антитіла з двома антиген-зв'язувальними сайтами, які включають варіабельний домен важкого ланцюга (VH), зв'язану з варіабельним доменом легкого ланцюга (VL) в один поліпептидну ланцюг (VH-VL). За допомогою застосування лінкер, який дуже короткий, щоб дати можливість злучитися двом доменам на одному і тому ж ланцюгу, здійснюється примусове спарювання доменів з комплементарними доменами на іншому ланцюгу, і створюються два антиген-зв'язувальних сайти. Діатіла найбільш повно описані, наприклад, в EP 404097; WO 93/11161; і у Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993).

"Однодоменне антитіло" є синонімом з "dAb" і означає поліпептид варіабельної ділянки імуноглобуліну, де зв'язування антигену здійснюється за допомогою одного домену, що містить



варіабельну ділянку. Як застосовується тут, "однодоменне антитіло" включає i) антитіло, що включає варіабельний домен важкого ланцюга (VH), або його антиген-зв'язувальний фрагмент, який утворює антиген-зв'язувальний сайт незалежно від будь-якого іншого варіабельного домену, ii) антитіло, що включає варіабельний домен легкого ланцюга (VL), або його антиген-зв'язувальний фрагмент, який утворює антиген-зв'язувальний сайт незалежно від будь-якого іншого варіабельного домену, iii) антитіло, що включає поліпептид, що містить VH домен, зв'язаний з іншим поліпептидом, що містить VH або VL домен (наприклад, VH-VH або VHx-VL), де кожний V домен утворює антиген-зв'язувальний сайт незалежно від будь-якого іншого варіабельного домену, i iv) антитіло, що включає поліпептид, що містить VL домен, зв'язаний з іншим поліпептидом, що містить VL домен (VL-VL), де кожний V домен утворює антиген-зв'язувальний сайт незалежно від будь-якого іншого варіабельного домену. Як застосовується тут, VL домен означає обидві форми легких ланцюгів каппа і лямбда.

"Гуманізовані" форми відрізняються від людських антитіл (наприклад, гризунів) являють собою химерні антитіла, які містять мінімальну послідовність, виділену з відрізаного від людського імуноглобуліну. Гуманізовані антитіла являють собою людські імуноглобуліни, де гіперваріабельні ділянки замінені залишками з гіперваріабельної ділянки з відрізаного від людини видів, таких як миша, щур, кролик або відрізаного від людини примат, що має бажану специфічність, афінність і здатність. У деяких випадках залишки каркасної ділянки (FR) людського імуноглобуліну замінені на відповідні, відрізані від людських залишки. Крім того, гуманізовані антитіла можуть включати залишки, які не виявлені в людському антитілі або у відрізаному від людського антитілі. Ці модифікації здійснюються для додаткового поліпшення характеристик антитіла. Звичайно, гуманізоване антитіло включає, по суті, все з щонайменше одного, і звичайно з двох варіабельних доменів, в яких все або, по суті, всі з гіперваріабельних петель відповідають аналогічним послідовностям відрізаного від людського імуноглобуліну, і весь або, по суті, всі з FR являють собою аналогічні послідовності людського імуноглобуліну. Гуманізоване антитіло також необов'язково включає щонайменше фрагмент константної ділянки імуноглобуліну (Fc), звичайно людського імуноглобуліну. Приклади методики гуманізації можна виявити, наприклад, у Queen et al. U.S. Пат. No. 5585089, 5693761; 5693762; 6180370, які введені сюди за допомогою посилання.

#### Отримання антитіл

Антитіла за даним винаходом можуть бути отримані за допомогою будь-якого відповідного способу, відомого з рівня техніки. Антитіла за даним винаходом можуть включати поліклональні антитіла. Способи отримання поліклональних антитіл відомі фахівцям в даній галузі (Harlow, et al., *Antibodies: a Laboratory Manual*, (Cold spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. (1988)), яка, таким чином, повністю введена сюди за допомогою посилання).

Наприклад, антитіла можуть бути отримані шляхом введення імуногену, що включає цікавлячий антиген, різним тваринам-хазяям, які включають, але не обмежені ними, кроликів, мишей, щурів тощо, для того, щоб індукувати продукування сироватки, що містить специфічні до антигену поліклональні антитіла. Введення імуногену може спричинити одну або більше ін'єкцій імунізованого агента і, якщо бажано, ад'юванта. Для підвищення імунологічної відповіді можуть застосовуватися різні ад'юванти в залежності від видів-хазяїв, і включають, але не обмежені ними, ад'ювант Фрейнда (повний і не повний), мінеральні гелі, такими як гідроксид алюмінію, поверхнево-активні речовини, такі як лізолецитин, плуронілові поліолі, поліаніони, пептиди, масляні емульсії, гемоціаніни лімфи равлика, динітрофенол і людські ад'юванти, що потенційно застосовуються, такі як BCG (бацила Кальмета-Герена) і *Corynebacterium parvum*. Додаткові приклади ад'ювантів, які можуть застосовуватися, включають MPL-TDM ад'ювант (монофосфорил ліпід A, синтетичний дикориноміколат трегалози).

Протоколи імунізації добре відомі з рівня техніки і можуть бути здійснені за допомогою способу, який викликає імунну відповідь у вибраної тварини-хазяя. Ад'юванти добре відомі з рівня техніки.

Звичайно імуноген (який містить або не містить ад'ювант) ін'єктують ссавцеві з допомогою багаторазових підшкірних або внутрішньочеревинних ін'єкцій, або імуноген ін'єктують внутрішньом'язово або через IV. Імуноген може включати антиген поліпептид, зшитий білок або їх варіанти. В залежності від природи поліпептидів (тобто відсотка гідрофобності, відсотка гідрофільності, стабільності, сумарного заряду, ізоелектричної точки тощо), вони можуть застосовуватися для кон'югації імуногену з білком, про який відомо, що він є імуногеном для ссавця, що імунізується. Така кон'югація включає, як хімічну кон'югацію, шляхом модифікації активних хімічних функціональних груп з двома агентами імуногеном і імуногеним білком, щоб вони були кон'юговані так, щоб утворився ковалентний зв'язок, так і включає кон'югацію за допомогою методики на основі утворення зшитого білка, або за допомогою інших способів,

відомих фахівцеві в даній галузі. Приклади таких імуногенних білків включають, але не обмежені ними, гемоціанін лімфи равлика, овальбумін, сироватковий альбумін, бичачий тироглобулін, соєвий інгібітор трипсину і різні Т-хелперні пептиди. Різні ад'юванти можуть застосовуватися для підвищення імунологічної відповіді, як описано вище.

Антитіла, що застосовуються за даним винаходом, включають моноклональні антитіла. Моноклональні антитіла можуть бути отримані із застосуванням гібридомної методики, такі як методики, описані у Kohler and Milstein, *Nature*, 256:495 (1975) і U.S. Пат. No. 4376110, by Harlow, et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold spring Harbor Laboratory Press, 2<sup>sup</sup>.nd ed. (1988), by Hammerling, et al., *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* (Elsevier, N. Y., (1981)), або можуть бути отримані за допомогою інших способів, відомих фахівцеві в даній галузі. Інші приклади способів, які можуть застосовуватися для отримання моноклональних антитіл, включають, але не обмежені ними, гібридомну методику з людськими В-клітинами (Kosbor et al., 1983, *Immunology Today* 4:72; Cole et al., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:2026-2030), і EBV-гібридомну методику (Cole et al., 1985, *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). Такі антитіла можуть являти собою будь-який клас імуноглобулінів, що включає IgG, IgM, IgE, IgA, IgD і будь-який їх підклас. Гібридома, продукуюча антитіла за цим винаходом, може культивуватися *in vitro* або *in vivo*.

Застосовуючи звичайні гібридомні методики, тварина-хазяїн, така як миша, гуманізована миша, миша з людською імунною системою, хом'як, кролик, верблюд або будь-яка інша відповідна тварина-хазяїн звичайно імунізується імуногеном, щоб викликати відповідь лімфоцитів, які продукують або здатні до продукування антитіл, які специфічно зв'язуються з цікавлячим антигеном. Альтернативно, лімфоцити можуть імунізуватися антигеном *in vitro*.

Звичайно, при отриманні продукуючих антитіл гібридом застосовуються або лімфоцити периферичної крові ("PBL"), якщо бажано використати клітини з людським походженням, або застосовуються клітини селезінки або лімфатичного вузла, якщо бажано використати джерела клітин ссавців, відмінних від людини. Потім проводять злиття лімфоцитів з іморталізованою клітинною лінією із застосуванням відповідного агента для злиття, такого як поліетиленгліколь, для утворення гібридомної клітини (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, (1986), pp. 59-103). Іморталізовані клітинні лінії звичайно трансформують клітини ссавців, особливо клітини мієломи з походженням від гризуна, бика або людини. Звичайно застосовується клітинна лінія мієломи щура або миші. Гібридомні клітини можуть культивуватися у відповідному культуральному середовищі, яке переважно містить одну або більше речовин, які інгібують зростання або виживання не злитих іморталізованих клітин. Наприклад, якщо батьківські клітини позбавлені ферменту гуаніну фосфорибозилтрансферази (HGPRT або HPRT), то культуральне середовище для гібридом звичайно включає гіпоксантин, аміноптерин або тимідин ("HAT середовище"), речовини, які запобігають зростанню клітин, дефіцитних по HGPRT.

Переважні іморталізовані клітинні лінії являють собою клітинні лінії, які ефективно зазнають злиття, підтримують стабільний високий рівень експресії антитіла у селектованих продукуючих антитіло клітин, і є чутливими до такого середовища, як HAT. Більш переважні іморталізовані клітинні лінії являють собою мишачі мієломні лінії, які можуть бути отримані, наприклад, з Клітинного Розподільного Центру Інституту Salk, San Diego, Calif, і з Американської Типованої Колекції Клітинних Культур, Manassas, Va. Клітинні лінії мієломи людини і гетеромієломи людина-миша також можуть застосовуватися для продукування людських моноклональних антитіл (Kosbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) pp. 51-63).

Культуральне середовище, в якому культивуються гібридомні клітини, може потім бути проаналізоване на присутність моноклональних антитіл, направлених проти імуногену. Специфічність зв'язування моноклональних антитіл, продукованих гібридомними клітинами визначається за допомогою, наприклад, імунопреципітації або за допомогою *in vitro* аналізу зв'язування, такого як радіоімуноаналіз (RIA) або твердофазний ІФА (ELISA). Такі методики відомі з рівня техніки фахівцеві в даній галузі. Афінність зв'язування моноклонального антитіла може бути визначена, наприклад, за допомогою Scatchard аналізу (Munson et al., *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980)).

Після того, як бажані гібридомні клітини ідентифіковані, клони можуть бути субклоновані за допомогою процедур лімітуючого розведення і вирощені за допомогою стандартних методів (Goding, дивись вище). Відповідне культуральне середовище для цієї мети включає, наприклад, Модифіковане Дульбекко Середовище Ігла і RPMI-1640. Моноклональні антитіла, секретовані субклонами, можуть бути виділені або очищені з культурального середовища за допомогою відповідних процедур очищення імуноглобулінів, таких як, наприклад, очищення з допомогою

протеїн А-сефарози, з допомогою хроматографії на гідроксиапатиті, гель-ексклюзійної хроматографії, гель-електрофорезу, діалізу або з допомогою аффіної хроматографії.

З рівня техніки відомо про існування різноманітності способів отримання моноклональних антитіл, і, таким чином, винахід не обмежений єдиним способом отримання антитіл з гібридом.

Наприклад, моноклональні антитіла можуть бути отримані за допомогою методів рекомбінантної ДНК, таких як методи, описані в U.S. Пат. No. 4816567. У цьому контексті термін "моноклональне антитіло" означає антитіло, виділене з єдиного еукаріотичного, фагового або прокаріотичного клона. ДНК, що кодують моноклональні антитіла за винаходом, можуть бути легко виділені і відсеквеновані із застосуванням звичайних процедур (наприклад, із застосуванням олігонуклеотидних зондів, які здатні до специфічного зв'язування з генами, що кодують важкі і легкі ланцюги мишачих антитіл, або з генами, що кодують такі ланцюги людських антитіл, гуманізованих антитіл або антитіл з інших джерел). Пбридомні клітини за винаходом служать як переважне джерело такої ДНК. Одного разу виділена ДНК може бути вміщена в експресуючі вектори, які потім трансформуються в клітини-хазяї, які по-іншому не продукують імуноглобуліновий білок, такі клітини як NSO клітини, Мавп'ячі COS клітини, клітини яєчника Китайського ховраха (CHO), або мієломні клітини, щоб отримати синтез моноклональних антитіл в рекомбінантних клітинах-хазяях. ДНК також може бути модифікована, наприклад, шляхом заміщення кодуєчої послідовності константних доменів важкого і легкого ланцюга людини в місці гомологічних мишачих послідовностей (U.S. Паї No. 4816567; Morrison et al, вище), або шляхом ковалентного з'єднання з кодуєчою послідовністю імуноглобуліну всієї або частини кодуєчої послідовності не імуноглобулінового поліпептиду. Такий не імуноглобуліновий поліпептид може бути заміщений на константні домени антитіла за винаходом або може бути заміщений на варіабельні домени одного об'єднаного антигенного сайту антитіла за винаходом для створення химерного бівалентного антитіла.

Антитіла можуть являти собою моновалентні антитіла. Способи отримання моновалентних антитіл добре відомі з рівня техніки. Наприклад, один спосіб включає рекомбінантну експресію легкого ланцюга імуноглобуліну і модифікованого важкого ланцюга. Важкий ланцюг є усіченим, Звичайно, в будь-якій точці ділянки Fc з тим, щоб запобігти перехресному з'єднанню важкого ланцюга. Альтернативно, істотні цистеїнові залишки заміняють на інший амінокислотний залишок або делетують з тим, щоб запобігти перехресному з'єднанню.

Фрагменти антитіла, які розпізнають специфічні епітопи, можуть бути отримані за допомогою відомих методик. Наприклад, Fab і F(ab')<sub>2</sub> фрагменти за винаходом можуть бути отримані за допомогою протеолітичного розщеплення імуноглобулінових молекул із застосуванням таких ферментів, як папаїн (для отримання Fab фрагментів) або пепсин (для отримання F(ab')<sub>2</sub> фрагментів). F(ab')<sub>2</sub> фрагменти містять варіабельну ділянку, константну ділянку легкого ланцюга і CH1 домен важкого ланцюга.

Для деяких застосувань, що включають *in vivo* застосування антитіл у людини і *in vitro* аналіз детекції, може бути переважним застосуванням химерних, гуманізованих або людських антитіл. Химерне антитіло являє собою молекулу, в якій різні ділянки антитіла виділені з різних видів тваринних, такі антитіла мають варіабельну ділянку, виділену з мишачого моноклонального антитіла і константна ділянка людського імуноглобуліну. Способи отримання химерних антитіл відомі з рівня техніки. Дивись, наприклад, Morrison, Science 229:1202 (1985); Oi et al., BioTechniques 4:214 (1986); Gillies et al., (1989) J. Immunol. Methods 125:191-202; U.S. Пат. No. 5807715; 4816567; і 4816397, які повністю введені сюди за допомогою посилання.

Гуманізовані антитіла являють собою отримані з відмінних від людини видів молекули антитіл, які зв'язуються з бажаним антигеном, що має одну або більше ділянки, що визначають комплементарність (CDR) з відмінних від людини видів, і каркасні ділянки (FR) з людської молекули імуноглобуліну. Часто, каркасні залишки в людських каркасних ділянках заміняють на відповідний залишок з CDR донорного антитіла для зміни, переважно, для поліпшення зв'язування антигену. Ці каркасні заміщення ідентифікуються за допомогою способів, добре відомих з рівня техніки, наприклад, за допомогою моделювання взаємодій CDR і каркасних залишків для ідентифікації каркасних залишків, що мають важливість для зв'язування антигену, і за допомогою порівняння послідовностей для ідентифікації незвичайних каркасних залишків в конкретних положеннях. (Дивись, наприклад, Queen et al., U.S. Пат. No. 5585089; Riechmann et al., Nature 332:323 (1988), які повністю введені сюди за допомогою посилання). Антитіла можуть бути гуманізовані із застосуванням різних методик, відомих з рівня техніки, що включають, наприклад, CDR-пересадку (EP 239400; PCT публікація WO 91/09967; U.S. Пат. No. 5225539; 5530101; і 5585089), маскування або перекладку (EP 592,106; EP 519596; Padlan, Molecular Immunology 28(4/5):489-498 (1991); Studnicka et al., Protein Engineering 7(6):805-814 (1994); Roguska. et al., PNAS 91:969-973 (1994)), і переміщення ланцюгів (U.S. Пат. No. 5565332).

Звичайно, гуманізоване антитіло має один або більше амінокислотних залишків, введених в нього з відмінного від людського джерела. Ці, відмінні від людських, амінокислотні залишки часто означають як "важливі" залишки, які звичайно взяті з "важливого" варіабельного домену. Гуманізація може бути звичайно здійснена, слідуючи способам Winter і сотр. (Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Reichmann et al, Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al, Science, 239:1534-1536 (1988), шляхом заміщення CDR гризунів або CDR послідовностей на відповідні послідовності людського антитіла. Відповідно, такі "гуманізовані" антитіла є химерними антитілами (U.S. Пат. No. 4816567), де, по суті, менш ніж інтактний людський варіабельний домен був заміщений на відповідну послідовність з відмінних від не-людських. У практиці, гуманізовані антитіла звичайно являють собою людські антитіла, в яких деякі CDR залишки і, можливо, деякі FR залишки заміщені з аналогічних сайтів антитіл гризунів.

Повністю людські антитіла особливо є бажаними для терапевтичного лікування пацієнтів людей. Людські антитіла можуть бути отримані за допомогою різних способів, відомих з рівня техніки, що включають способи фагового дисплея, описані вище, із застосуванням бібліотек антитіл, виділених з людських імуноглобулінових послідовностей. Дивись також U.S. Пат. No. 4444887 і 4716111; і PCT публікації WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 і WO 91/10741; кожна з яких повністю введена сюди за допомогою посилання. Також доступні методики Cole et al. і Boerder et al. для отримання людських моноклональних антитіл (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Riss, (1985); and Boerner et al., J. Immunol., 147(1):86-95, (1991)).

Людські антитіла можуть також являти собою однодоменні антитіла, що мають VH або VL домен, який функціонує незалежно від будь-якого іншого варіабельного домену. Ці антитіла звичайно вибрані з бібліотеки антитіл, яка експресується в фагу. Ці антитіла і способи виділення таких антитіл описані в U.S. Пат. No. 6595142; 6248516; і в заявках US20040110941 і US20030130496, кожна з яких введена сюди за допомогою посилання.

Людські антитіла також можуть бути отримані із застосуванням трансгенних мишей, які не здатні до експресії функціональних ендегенних імуноглобулінів, але які можуть експресувати людські імуноглобулінові гени. Наприклад, комплекси людських імуноглобулінових генів важкого і легкого ланцюга можуть бути введені випадковим чином або за допомогою гомологічної рекомбінації в мишачі ембріональні стовбурові клітини. Альтернативно, людська варіабельна ділянка, константна ділянка і ділянка варіабельності можуть бути введені в мишачі ембріональні стовбурові клітини в доповнення до людських генів важкого і легкого ланцюга. Мишачі імуноглобулінові гени важкого і легкого ланцюга можуть бути представлені окремо, як нефункціональні, або одночасно з введенням людського імуноглобулінового локусу шляхом гомологічної рекомбінації. Особливо, гомозиготна делеція JH ділянки запобігає ендегенному продукуванню антитіла. Модифіковані ембріональні стовбурові клітини розмножують і проводять їх мікроін'єкцію в бластоцисти для отримання химерних мишей. Химерних мишей потім запліднюють для отримання гомозиготного нащадка, який експресує людські антитіла. Трансгенних мишей імунізують звичайним способом з вибраним антигеном, наприклад, за допомогою суцільного або частини поліпептиду за винаходом. Моноклональні антитіла, направлені проти антигену, можуть бути отримані з імунізованих, трансгенних мишей із застосуванням звичайної гібридомної методики. Людські імуноглобулінові трансгени, приховані при перегрупованні під час В-клітинного диференціювання трансгенної миші, і, отже, піддаються перемиканню класів і соматичній мутації. Таким чином, застосовуючи таку методику, можливо отримувати терапевтично застосовні антитіла IgG, IgA, IgM і IgE. Для огляду цієї методики отримання людських антитіл, дивись Lonberg and Huszar, Int. Rev. Immunol. 13:65-93 (1995). Для докладного обговорення цієї методики отримання людських антитіл і людських моноклональних антитіл і протоколів отримання таких антитіл, дивись, наприклад, PCT публікації WO 98/24893; WO 92/01047; WO 96/34096; WO 96/33735; Європейський Патент No. 0 598 877; U.S. Пат. No. 5413923; 5625126; 5633425; 5569825; 5661016; 5545806; 5814318; 5885793; 5916771; і 5939598, які повністю введені сюди за допомогою посилання. Крім того, такі компанії, як Abgenix, Inc. (Freemont, Calif.), Genpharm (San Jose, Calif.), і Medarex, Inc. (Princeton, NJ.) можуть бути зайняті отриманням людських антитіл, направлених проти вибраного антигену, із застосуванням методики, подібної тією, що описана вище.

Також людські MAbs можуть бути отримані за допомогою імунізації мишей з трансплантованими лейкоцитами периферичної крові людини, спленоцитами або кістковим мозком (наприклад, Trioma методики XTL). Повністю людські антитіла, які розпізнають вибраний епітоп, можуть бути отримані із застосуванням методики, позначеної як "керована селекція". У цьому способі вибране відмінне від людського моноклональне антитіло, наприклад, мишаче

антитіло, застосовується для управління селекцією повністю людського антитіла, що розпізнає той же епітоп. (Jespersen et al., *Bio/technology* 12:899-903 (1988)).

Крім того, антитіла до поліпептидів за винаходом можуть, в свою чергу, застосовуватися для отримання антиідіотипічних антитіл, які "імітують" поліпептиди за винаходом із застосуванням методик, добре відомих фахівцям в даній галузі з рівня техніки. (Дивись, наприклад, Greenspan & Bona, *FASEB J.* 7(5): 437-444; (1989) and Nissinoff, J. *Immunol.* 147(8): 2429-2438 (1991)). Наприклад, можуть застосовуватися антитіла, які зв'язуються з поліпептидом і конкурентно інгібують поліпептидну мультимеризацію і/або зв'язування поліпептиду за винаходом з лігандом, для отримання антиідіотипів, які "імітують" поліпептидну мультимеризацію і/або зв'язування домену і, як наслідок, зв'язуються з поліпептидом і нейтралізують його і/або його ліганд. Такі нейтралізуючі антиідіотици або Fab фрагмент таких антиідіотипів можуть застосовуватися в терапевтичних режимах для нейтралізації ліганду поліпептиду. Наприклад, такі антиідіотипічні антитіла можуть застосовуватися для зв'язування поліпептиду за винаходом і/або для зв'язування його лігандів/рецепторів, і таким чином, блокують його біологічну активність.

Антитіла за даним винаходом можуть являти собою біспецифічні антитіла. Біспецифічні антитіла являють собою моноклональні, переважно, людські або гуманізовані антитіла, які володіють специфічністю зв'язування щонайменше до двох різних антигенів. У даному винаході одна з специфічностей зв'язування може бути направлена по відношенню до Фактора D, інша може бути направлена до іншого антигену, і, переважно, до білка клітинної поверхні, рецептору, субодиниці рецептора, тканинспецифічного антигену, білка, виділеного з вірусу, до білка оболонки, що кодується вірусом, до білка, виділеного з бактерії або до поверхневого бактерійного білка тощо. Біспецифічні антитіла можуть також включати два або більше однодоменних антитіл.

Способи отримання біспецифічних антитіл добре відомі. Традиційно, рекомбінантне продукування біспецифічних антитіл ґрунтується на ко-експресії двох пар важких ланцюг/легких ланцюг імуноглобуліну, де два важких ланцюги володіють різною специфічністю (Milstein and Cuellar, *Nature*, 305: 537-539 (1983)).

Через випадковий вибір важкого і легкого ланцюгів імуноглобуліну ці гібридоми (квадроми) продукують потенційну суміш часто різних молекул антитіл, з яких тільки одна володіє правильною біспецифічною структурою. Очищення правильної молекули звичайно здійснюється шляхом стадій аффіної хроматографії. Подібні процедури описані в WO 93/08829, опублікованому 13 Травня, 1993, і у Trautwein et al., *EMBO J.*, 10: 3655-3659 (1991).

Варіабельні домени антитіла з бажаною специфічністю зв'язування (об'єднані сайти антитіло-антиген) можуть бути зшиті з послідовностями константних доменів імуноглобуліну. Зшиття, переважно здійснюють з константним доменом важкого ланцюга імуноглобуліну, що включає щонайменше частину шарнірної ділянки, CH2 і CH3 ділянок. Антитіло може мати першу константну ділянку важкого ланцюга (CH1), який містить сайт, необхідну для зв'язування легкого ланцюга, присутньої щонайменше в одній із зшитих послідовностей. ДНК, що кодує зшиті послідовності важкого ланцюга імуноглобуліну, і, якщо бажано, легкого ланцюга імуноглобуліну, вставляють в окремі експресуючі вектори і ко-трансформують у відповідний організм-хазяїн. Для додаткових подробиць отримання біспецифічних антитіл дивись, наприклад, Suresh et al., *Meth. In Enzym.*, 121:210 (1986).

Гетерокон'югатні антитіла також пропонуються за даним винаходом. Гетерокон'югатні антитіла складаються з двох ковалентно зв'язаних антитіл. Передбачається, що такі антитіла направляють клітини імунної системи до небажаних клітин (U.S. Пат. No. 4676980). Передбачається, що антитіла можуть бути отримані *in vitro* із застосуванням відомих способів синтетичної білкової хімії, включаючи способи, що включають перехресно-зв'язані агенти. Наприклад, можуть бути сконструйовані імунотоксини із застосуванням реакції дисульфідного обміну або шляхом утворення тіефірного зв'язку. Приклади відповідних реагентів для цієї мети включають імінотіолат і метил-4-меркаптобутиримідат, і ті, що описані, наприклад, в U.S. Пат. No. 4676980. Крім того, можуть бути отримані однодоменні антитіла до IL-13. Приклади цієї методики описані в WO9425591 для антитіл, виділених з важкого ланцюга Ig з сімейства верблюжих Camelidae, а також в US 20030130496, що описує виділення повністю людських однодоменних антитіл з фагових бібліотек.

Отримання моноклональних антитіл (маб)

У одному втіленні за винаходом, моноклональні антитіла, такі як до Фактора D, можуть бути отримані шляхом імунізації гризунів (наприклад, мишей, щурів, ховрахів і морських свинок) або нативним фактором D, очищеним з плазми або сечі людини, або рекомбінантним фактором D або його фрагментами, які експресуються, або еукаріотичною або прокаріотичною системами.

Інші тварини можуть застосовуватися для імунізації, наприклад, відмінні від людини примати, трансгенні миші, експресуючі людські імуноглобуліни і миші з важким комбінованим імунodefіцитом (SCID), трансплантовані з людськими В лімфоцитами. Гібридами можуть бути отримані за допомогою звичайних процедур шляхом злиття В лімфоцитів з імунізованих тварин з мієломними клітинами (наприклад, Sp2/0 і NSO), як описано у G. Kohler and C. Milstein (Nature, 1975: 256: 495-497).

Крім того, моноклональні антитіла можуть бути отримані шляхом скринінгу бібліотек рекомбінантних одноланцюжкових Fv або Fab з людських В лімфоцитів в системах фагового дисплея. Специфічність MAb до даному антигену може бути протестована з допомогою твердофазного ІФА (ELISA), Western імуноблотингу або за допомогою інших імунохімічних методик. Інгібуюча активність антитіл по відношенню до активації комплементу може бути визначена для альтернативного шляху за допомогою гемолітичного аналізу із застосуванням несенсибілізованих еритроцитів (RBC) кролика або морської свинки, і для класичного шляху інгібуюча активність може бути визначена із застосуванням сенсибілізованих RBC курчати або вівці. Гібридами з осередків з позитивною реакцією клонують за допомогою лімітуючого розведення. Антитіла очищають для характеристики специфічності до антигену, такому як фактор D, за допомогою аналізів, добре відомих з рівня техніки.

Також можуть бути створені зв'язуючі одноланцюжкові пептиди молекули, в яких Fv ділянки важкого і легкого ланцюгів є зв'язаними. Одноланцюжкові антитіла ("ScFv") і спосіб їх конструювання описані в U.S. Патенті No. 4946778. Альтернативно, Fab може бути сконструйований і може експресуватися за допомогою подібних способів (MJ. Evans et al, J. Immunol. Meth., 1995; 184: 123-138). Кожне з повністю і частково людських антитіл є менш імуногенним, ніж повністю мишачі MAb, і фрагменти і одноланцюжкові антитіла також є менш імуногенними. Таким чином, малоімовірно, що всі ці типи антитіл викличуть імунну відповідь або алергічну реакцію. Отже, вони краще підходять для in vivo введення людям, ніж антитіла з повністю тваринним походженням, особливо коли необхідне повторне або тривале введення. Крім того, менший розмір фрагмента антитіла може допомогти поліпшити тканинну біодоступність, яка може бути критичною для кращого накопичення дози при ознаках гострого захворювання.

У одному переважному втіленні за винаходом терапевтично застосовується химерний Fab, що має варіабельні ділянки тваринного походження (мишачі) і людські константні ділянки. Fab є переважним, тому що він коротше, ніж суцільний імуноглобулін, і може забезпечити кращу тканинну проникність; оскільки це моновалентна молекула, то існує менший шанс утворення імунокомплексів і агрегатів; і він може бути отриманий в мікробній системі, масштаб якої може бути легше збільшений, ніж при використанні системи ссавців.

Застосування інгібіторів шляху комплементу

Інгібітори комплементу, такі як антитіла і їх зв'язувальні фрагменти можуть бути введені суб'єктам у відповідному фармацевтичному складі різними шляхами, що включають, але не обмеженими ними, внутрішньовенну інфузію, внутрішньовенну болюсну ін'єкцію, і шляхом внутрішньочеревинної ін'єкції, інтердермальної, внутрішньом'язової, підшкірної, внутрішньоносової, внутрішньотрахеальної, внутрішньохребетної ін'єкції і пероральним шляхом. Таке введення дає їм можливість зв'язуватися з ендogenous антигеном, таким як Фактор D, і, таким чином, інгібувати отримання анафілотоксинів C3b, C3a, C5a і C5b-9.

Певне переважне дозування таких антитіл і молекул складає між 10 і 500 мкг/мл сироватки. Реальне дозування може бути визначене в клінічних випробуваннях, слідуючи звичайній методиці для визначення оптимального дозування, тобто шляхом введення різного дозування і визначення, яка з них є найбільш ефективною.

Інгібітори шляху комплементу можуть функціонувати, інгібуючи in vivo активацію комплементу і/або альтернативний шлях комплементу і запальні вияви, які його супроводжують, такі як залучення і активація макрофагів, нейтрофілів, тромбоцитів і тучних клітин, набряк і руйнування тканини. Ці інгібітори можуть застосовуватися для лікування захворювань або станів, яких опосередковані надмірною або неконтролюючою активацією системи комплементу.

Антитіла за даним винаходом можуть являти собою моноспецифічні, біспецифічні, триспецифічні або антитіла більшої мультиспецифічності. Мультиспецифічні антитіла можуть бути специфічними до різних епітопів вибраного антигену або можуть бути специфічними до обох, до антигену, а також до гетерологічного епітопу, такому як гетерологічний поліпептид або речовина твердої підкладки. Дивись, наприклад, РСТ публікації WO 93/17715; WO 92/08802; WO 91/00360; WO 92/05793; Tutt, et al, J. Immunol. 147:60-69 (1991); U.S. Пат. No. 4474893; 4714681; 4925648; 5573920; 5601819; Kostelny et al, J. Immunol. 148:1547-1553 (1992).

Антитіла, що застосовуються за даним винаходом, можуть бути описані або визначені у виразах епітоп(и) або ділянка(ки) компонента шляху комплементу, такого як Фактор D, який вони розпізнають або специфічно зв'язують. Епітоп(и) або поліпептидна ділянка(ки) можуть бути визначені, як тут описано, наприклад, за допомогою N-кінцевих і C-кінцевих положень, по числу наступних один за одним амінокислотних залишків.

Антитіла, що застосовуються за даним винаходом, також можуть бути описані або визначені у вираженні їх перехресної реакційоздатності. Антитіла, які зв'язуються з поліпептидними компонентами шляху комплементу, які мають щонайменше 95% ідентичності з IL-13 щонайменше 90% щонайменше 85% щонайменше 80% щонайменше 75% щонайменше 70% щонайменше 65% щонайменше 60% щонайменше 55%, і щонайменше 50% ідентичності (як розраховано із застосуванням способів, відомих з рівня техніки і описаних тут), також включені в даний винахід. Антитіла до Фактора D також можуть зв'язуватися з KD менш ніж  $10^{-7}$  M, менш ніж, приблизно,  $10^{-6}$  M, менш ніж, приблизно,  $10^{-5}$  M з іншими білками, такими як антитіла до Фактора D з видів, відмінних від того вигляду, проти якого направлена дія антитіла до Фактора D.

#### Вектори клітини-хазяї

У іншому аспекті, в даному винаході пропонуються векторні конструкції, що включають нуклеотидну послідовність, що кодує антитіла за даним винаходом, і клітини-хазяї, що включають такий вектор. Можуть застосовуватися стандартні методики клонування і трансформації при отриманні клітинних ліній, експресуючих антитіла за даним винаходом.

Вектори для рекомбінантної експресії, що містять нуклеотидну послідовність, яка кодує антитіла за даним винаходом, можуть бути отримані із застосуванням добре відомих методик. Експресуючі вектори включають нуклеотидну послідовність, функціонально зв'язану з відповідними нуклеотидними послідовностями, регулюючими транскрипцію або трансляцію, такими як послідовності, виділені з генів ссавця, з мікробних генів, вірусних або генів комах. Приклади регуляторних послідовностей включають транскрипційні промотори, оператори, енхансери, сайти зв'язування мРНК з рибосомою і/або інші відповідні послідовності, які контролюють ініціацію і термінацію транскрипції і трансляції. Нуклеотидні послідовності є "функціонально зв'язаними", коли регуляторна послідовність функціонально зв'язана з нуклеотидною послідовністю відповідного поліпептиду. Таким чином, промоторна нуклеотидна послідовність функціонально зв'язана, наприклад, з послідовністю важкого ланцюга антитіла, якщо промоторна нуклеотидна послідовність контролює транскрипцію відповідної нуклеотидної послідовності.

Крім того, послідовності, що кодують відповідну сигнальну пептиди, які не є природно-асоційованими з послідовностями важкого і/або легкого ланцюга антитіла, можуть бути введені в експресуючі вектори. Наприклад, нуклеотидна послідовність сигнального пептиду (секреторного лідера) може бути зшита в одній рамці з поліпептидною послідовністю так, що антитіло буде секретуватися в периплазматичний простір або в середовище. Сигнальний пептид, який є функціональним у вибраних клітинах-хазяях, посилює позаклітинну секрецію відповідного антитіла. Сигнальний пептид може бути відщеплений від поліпептиду після секреції антитіла з клітини. Приклади таких секреторних сигналів добре відомі, і включають, наприклад, ті, що описані в US 5 69 843 5, US5698417 і US6204023.

Клітини-хазяї, що застосовуються за даним винаходом, включають, але не обмежені ними, мікроорганізми, такі як бактерії (наприклад, *E. coli*, *B. subtilis*), трансформовані з рекомбінантної ДНК експресуючих векторів бактеріофагу, ДНК плазмідних експресуючих векторів або ДНК космідних експресуючих векторів, що містять кодуючі послідовності антитіла; дріжджі (наприклад, *Saccharomyces*, *Pichia*), трансформовані рекомбінантними дріжджовими експресуючими векторами, що містять кодуючі послідовності антитіла; клітинні системи комах, інфіковані рекомбінантними вірусними експресуючими векторами (наприклад, Бакуловірус), що містять кодуючі послідовності антитіла; клітинні системи рослин, інфіковані рекомбінантними вірусними експресуючими векторами (наприклад, мозаїчний вірус цвітної капусти, CaMV; мозаїчний вірус тютюну, TMV) або трансформовані рекомбінантними плазмідними експресуючими векторами (наприклад, *Ti* плазмідною) що містять кодуючі послідовності антитіла; або клітинні системи ссавця (наприклад, COS, CHO, BHK, 293, 3T3 клітини), несучі рекомбінантні експресуючі конструкції, що містять промотори, виділені з геноми клітин ссавця (наприклад, металопітіоноівий промотор) або з вірусів ссавця (наприклад, пізній промотор аденовірусу; 7,5K промотор вірусу вакцинії).

Вектор може являти собою плазмідний вектор, одноланцюжковий або дволанцюжковий фаговий вектор або одноланцюжковий або дволанцюжковий РНК- або ДНК-вірусний вектор. Такі вектори можуть бути введені в клітини у вигляді полінуклеотидів за допомогою добре

відомих методик для введення ДНК і РНК в клітини. Вектори у випадку фагових і вірусних векторів також можуть бути введені в клітини у вигляді запакованого і інкапсульованого вірусу за допомогою добре відомих методик інфекції і трансдукції. Вірусні вектори можуть бути реплікативно компетентними або реплікативно дефектними. У останньому випадку, вірусне розмноження буде здійснюватися тільки в комплементарних клітинах-хазяях. Безклітинні системи трансляції також можуть застосовуватися для отримання білка із застосуванням РНК, виділених з справжніх ДНК-конструкцій. Такі вектори можуть включати нуклеотидну послідовність, що кодує константну ділянку молекули антитіла (дивись, наприклад, РСТ Публікацію WO 86/05807; РСТ Публікацію WO 89/01036; і U.S. Пат. No. 5122464), і варіабельний домен антитіла може бути клонований в такий вектор для експресії всього важкого або легкого ланцюга.

Прокаріоти, що застосовуються як клітини-хазяї за даним винаходом, включають грам-негативні або грам-позитивні організми, такі як *E. coli* і *B. subtilis*. Експресуючі вектори для застосування в прокаріотичних клітинах-хазяях включають один або більше генів фенотипічно селектуючих маркерів. Ген афенотипічно селектуючого маркера являє собою, наприклад, ген, що кодує білок, який відповідає за стійкість до антибіотика або який забезпечує необхідними ауотрофними умовами. Приклади експресуючих векторів, що застосовуються для прокаріотичних клітин-хазяїв включають ті, що виділені з комерційно доступних плазмід, таких як pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden), pGEM1 (Promega Biotec, Madison, Wisconsin, USA), і pET (Novagen, Madison, Wisconsin, USA) і pRSET (Invitrogen Corporation, Carlsbad, California, USA) серії векторів (Studier, F. W., Biol. 219: 37 (1991); Schoepfer, R. Gene 124: 83 (1993)). Промоторні послідовності, що звичайно застосовуються для рекомбінантної експресії векторів в прокаріотичних клітинах-хазяях, включають T7, (Rosenberg, et al. Gene 56, 125-135 (1987)),  $\beta$  - лактамазний промотор (пеніциліназний), лактозну промоторну систему (Chang et al., Nature 275:615, (1978); and Goeddel et al., Nature 281: 544, (1979)), триптофанову промоторну систему (tap) (Goeddel et al., Nucl. Acids Res. 8:4057, (1980)), і tac промотор (Sambrook et al., 1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor,).

Дріжджі, які застосовуються за даним винаходом, включають ті, що утворюються з *Saccharomyces*, *Pichia*, *Actinomyces* і *Kluuyveromyces*. Дріжджеві вектори часто містять послідовність початку реплікації з дріжджевої плазмиди 2 $\mu$ , автономно послідовність, яка реплікується (ARS), промоторна ділянка, послідовності поліаденілювання, послідовності термінації транскрипції і ген селектуючого маркера. Відповідні промоторні послідовності для дріжджових векторів включають серед інших промотори металотіоненіну, 3-фосфогліцерат кінази (Hitzeman et al., J. Biol. Chem. 255:2073, (1980)) або промотори інших гліколітичних ферментів (Holland et al., Biochem. 17:4900, (1978)), таких як ено л азу, гліцеральдегід-3-фосфату дегідрогеназу, гексокіназу, піруват декарбоксилазу, фосфофруктокіназу, глюкозо-6-фосфат ізомерази, 3-фосфогліцерат мутази, піруват кіназу, тріозофосфат ізомерази і глюкокіназу. Інші відповідні вектори і промотори для застосування в дріжджевій експресії додатково описані у Fleer et al., Gene, 107:285-195 (1991). Інші відповідні промотори і вектори для дріжджів і протоколи дріжджевої трансформації добре відомі з рівня техніки. Протоколи дріжджевої трансформації добре відомі. Один такий протокол описаний у Hinnen et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 75:1929 (1978). У протоколі Хіннена селектуються Тір+ трансформанти в селективному середовищі.

Системи культур клітин-хазяїв ссавця або комахи також можуть застосовуватися для експресії рекомбінантних антитіл, наприклад, Бакуловірусні системи для отримання гетерологічних білків. У системах клітин комахи як вектор для експресії чужерідних генів може застосовуватися вірус нуклеарного гіпергідрозу *Autographa californica* (AcNPV). Вірус росте в клітинах *Spodoptera frugiperda*. Послідовність, що кодує антитіла, може бути клонована індивідуально в не істотні ділянки вірусу (наприклад, на місце гена поліедрини) і може бути вміщена під контроль AcNPV промотору (наприклад, поліедринового промотору).

Можуть застосовуватися клітини NSO або клітини яєчника Китайського ховраха (CHO) для експресії антитіл за даним винаходом у ссавців. Послідовності контролю транскрипції і трансляції для експресуючих векторів в клітинах-хазяях ссавця можуть бути виділені з вірусних геномів. Звичайно промоторні, що застосовуються і енхансерні послідовності виділені з вірусу Поліоми, Аденовірусу 2, Мавпячого Вірусу 40 (SV40), і людського цитомегаловірусу (CMV). ДНК послідовності, виділені з вірусного геному SV40 можуть застосовуватися для забезпечення інших генетичних елементів для експресії структурної генної послідовності в клітині-хазяї ссавця, наприклад, послідовність почала реплікації з SV40, ранній і пізній промотор, енхансер і сайти поліаденілювання. Конкретно застосовуються вірусні ранній і пізній промотори, тому що



обидва можуть бути легко отримані з вірусного геному у вигляді фрагмента, який також може містити вірусну послідовність початку реплікації. Приведені для прикладу експресуючі вектори для застосування в клітинах-хазяях ссавців є комерційно доступними.

Полінуклеотиди, кодує антибіоти

У винаході додатково пропонуються полінуклеотиди або нуклеїнові кислоти, наприклад, ДНК, що включають нуклеотидну послідовність, що кодує антибіот за винаходом або його фрагменти. Приведені для прикладу полінуклеотиди включають ті, що кодують ланцюги антибіоту, що включають одну або більш амінокислотних послідовностей, описаних тут. У винаході також охоплюються полінуклеотиди, які гібридизуються при суворих або менш суворих умовах гібридизації з полінуклеотидами, які кодують антибіот за даним винаходом.

Полінуклеотиди можуть бути отримані, і нуклеотидна послідовність полінуклеотидів може бути визначена за допомогою способу, відомого з рівня техніки. Наприклад, якщо відома послідовність полінуклеотиду, то полінуклеотид, що кодує антибіот, може бути зібраний з хімічно синтезованих олігонуклеотидів (наприклад, як описано у Kutmeier et al., *BioTechniques* 17:242 (1994)), коротко, цей спосіб включає синтез олігонуклеотидів, які перекриваються, що містять ділянки послідовності, яка кодує антибіот, відпал і лігування цих олігонуклеотидів, і потім ампліфікацію лігованих олігонуклеотидів з допомогою ПЛР.

Альтернативно, полінуклеотид, що кодує антибіот, може бути отриманий з нуклеїнової кислоти з відповідного джерела. Якщо клон, що містить нуклеїнову кислоту, що кодує конкретне антибіот, не доступний, але послідовність молекули антибіот відома, то нуклеїнова кислота, що кодує імуноглобулін, може бути синтезована хімічно або отримана з відповідного джерела (наприклад, з кДНК бібліотеки антибіот, або з кДНК бібліотеки або нуклеїнової кислоти, переважно полі А+ РНК, виділених з тканин або клітин, експресуючих антибіот за винаходом) з допомогою ПЛР ампліфікації із застосуванням синтетичних праймерів, які гібридизуються з 3' і 5' кінцями послідовності або за допомогою клонування із застосуванням олігонуклеотидного зонду, специфічного для конкретної генної послідовності для ідентифікації, наприклад, кДНК клону з кДНК бібліотеки, який кодує антибіот. Ампліфіковані нуклеїнові кислоти, отримані за допомогою ПЛР, потім можуть бути клоновані в реплікуючі вектори для клонування із застосуванням способу, добре відомого з рівня техніки.

Одного разу визначивши нуклеотидну послідовність і відповідну амінокислотну послідовність антибіоту, з нуклеотидною послідовністю антибіот можна здійснювати маніпуляції із застосуванням способів, добре відомих з рівня техніки, наприклад, ПЛР тощо (дивись, наприклад, методики, описані у Sambrook et al., 1990, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. and Ausubel et al., eds., 1998, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY, які повністю введені сюди за допомогою посилання), для отримання антибіот, що мають іншу амінокислотну послідовність, наприклад, для створення амінокислотних замін, делецій і/або вставок.

У конкретному втіленні, амінокислотна послідовність варіабельних доменів важкого і/або легкого ланцюга може бути досліджена з метою ідентифікації послідовностей CDR за допомогою добре відомих способів, шляхом порівняння відомих амінокислотних послідовностей з іншими варіабельними ділянками важкого і/або легкого ланцюга для визначення гіперваріабельних ділянок послідовності. Застосовуючи звичайні методики рекомбінантної ДНК, один або більше CDR можуть бути вставлені в каркасні ділянки, наприклад, в людські каркасні ділянки для гуманізації відмінного від людського антибіоту, як описано вище. Каркасні ділянки можуть являти собою природні або консенсусні каркасні ділянки, і, переважно, людські каркасні ділянки (дивись, наприклад, Chothia et al., *Bioi.* 278: 457-479 (1998) список людських каркасних ділянок). Переважно, полінуклеотид, отриманий за допомогою каркасних ділянок і CDR, кодує антибіот, яке специфічно зв'язується з поліпептидом за винаходом. Переважно, як обговорювалося вище, може бути зроблена одна або більш амінокислотних замін всередині каркасних ділянок, і, переважно, амінокислотні заміни поліпшують зв'язування антибіоту з його антигеном. Крім того, такі способи можуть застосовуватися для отримання амінокислотних замін або делецій одного або більше за цистеїнів варіабельної ділянки, що беруть участь в утворенні дисульфідного зв'язку всередині ланцюга для отримання молекул, позбавлених однією або більше за дисульфідного зв'язку всередині ланцюга. Інші зміни полінуклеотиду охоплені даним винаходом і відомі фахівцям з рівня техніки.

Крім того, можуть застосовуватися методики, розроблені для продукування "химерних антибіот" (Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:851-855 (1984); Neuberger et al., *Nature* 312:604-608 (1984); Talceda et al., *Nature* 314:452-454 (1985)) шляхом сплайсингу генів з молекули мишачого антибіоту з відповідною антигенною специфічністю разом з генами з молекули людського антибіоту з відповідною біологічною активністю. Як описано вище, химерне антибіот

являє собою молекулу, в якій різні ділянки виділені з різних видів тварин, таке антитіло, як ті, що мають варіабельну ділянку, виділену з мишачого MAb, і константна ділянка людського імуноглобуліну, наприклад, гуманізоване антитіло.

Альтернативно, методики, описані для отримання одноланцюжкових антитіл (U.S. Пат. No. 4946778; Bird, Science 242:423-42 (1988); Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883 (1988); and Ward et al., Nature 334:544-54 (1989)) можуть бути адаптовані для отримання одноланцюжкових антитіл. Одноланцюжкові антитіла утворюються шляхом зв'язування фрагментів важкого і легкого ланцюга ділянки Fv за допомогою амінокислотного містка, що приводить в результаті до отримання одноланцюжкового поліпептиду. Також можуть застосовуватися методики для збирання функціональних Fv фрагментів в *E. coli* (Skerra et al., Science 242:1038-1041 (1988)).

Способи отримання антитіл

Антитіла за винаходом можуть бути отримані будь-яким способом синтезу антитіл, відомим з рівня техніки, особливо шляхом хімічного синтезу або, переважно, за допомогою методик рекомбінантної експресії.

Для рекомбінантної експресії антитіла за винаходом або його фрагмента, похідного або аналога (наприклад, важкого або легкого ланцюга антитіла за винаходом або одного ланцюга антитіла за винаходом), потрібна конструкція експресуючого вектора, що містить полінуклеотид, який кодує антитіло або фрагмент антитіла. Отримавши одного разу полінуклеотид, що кодує молекулу антитіла, вектор для продукування антитіла може бути отриманий за допомогою методики рекомбінантної ДНК. Експресуючий вектор конструюється так, що він містить послідовності, що кодують антитіло, і відповідні сигнали контролю транскрипції і трансляції. Ці способи включають, наприклад, *in vitro* методики рекомбінантної ДНК, методики синтезу і *in vivo* генетичну рекомбінацію.

Експресуючі вектори переносять в клітини-хазяї за допомогою звичайних методик, і трансфіковані клітини потім культивують за допомогою звичайних методик для продукування антитіла за винаходом. У одному аспекті за винаходом, вектори, що кодують обидва ланцюги - важкий і легкий, можуть ко-експресуватися в клітині-хазяї для експресії суцільної молекули імуноглобуліну, як описано нижче.

Для експресії молекул антитіла за винаходом можуть застосовуватися різні системи хазяїн-експресуючий вектор, як описано вище. Такі системи експресії в організмі-хазяї представляють носії, за допомогою яких цікаві кодує послідовності можуть бути отримані і згодом очищені, але також представляють клітини, які після трансформації або трансфекції відповідними кодує послідовностями ДНК можуть експресувати *in situ* молекулу антитіла за винаходом. Бактерійні клітини, такі як *E. coli*, і еукаріотичні клітини, звичайно застосовуються для експресії молекули рекомбінантного антитіла, особливо для експресії суцільної молекули рекомбінантного антитіла. Наприклад, клітини ссавця, такі як клітини яєчника Китайського ховраха (CHO), в з'єднанні з вектором, що містить головний промоторний елемент проміжно-раннього з людського цитомегаловірусу являють собою ефективну систему експресії антитіл (Foecking et al., Gene 45:101 (1986); Cockett et al., Bio/Technology 8:2 (1990)).

Крім того, може бути вибраний штам клітини-хазяя, який модулює експресію вставлених послідовностей або модифікує і процесує генний продукт певним бажаним способом. Такі модифікації (наприклад, глікозування) і процесинг білкового продукту можуть бути важливими для функції білка. Різні клітини-хазяї мають характеристики і певні механізми поста-трансляційний процесингу і модифікації білків і генних продуктів. Відповідні клітинні лінії або системи клітин-хазяїв можуть бути вибрані, щоб гарантувати коректну модифікацію і процесинг експресуючого чужерідного білка. З цією метою можуть застосовуватися еукаріотичні клітини-хазяї, які володіють клітинним апаратом для правильного процесингу первинного транскрипту, глікозування і фосфорилізування генного продукту. Такі клітини-хазяї ссавців включають, але не обмежені ними, клітини CHO, COS, 293, 3T3 або мієломні клітини.

Для тривалого з високим виходом продукування рекомбінантних білків переважна стабільна експресія. Наприклад, можуть бути розроблені клітинні лінії, які стабільно експресують молекулу антитіла. Швидше ніж застосування експресуючих векторів, які містять вірусні послідовності початку реплікації, клітини-хазяї можуть бути трансформовані ДНК, що контролюється за допомогою відповідних елементів контролю експресії (наприклад, за допомогою послідовностей промотору, енхансеру, термінаторів транскрипції, сайтів поліаденілювання тощо), і селектує маркера. Слідом за введенням чужерідної ДНК клітинам, які містять конструкцію, дають можливість рости протягом 1-2 днів в збагаченому середовищі, і потім перемикають на селективне середовище. Селектує маркер в рекомбінантній плазміді відповідає за стійкість до селекції і дає клітинам можливість стабільно

інтегрувати плазмиду в хромосоми клітин і рости з утворенням фокусів, які в свою чергу можуть бути клоновані і розвинені в клітинні лінії. Цей спосіб переважно може застосовуватися для конструювання клітинних ліній, яких експресують молекулу антитіла. Такі сконструйовані клітинні лінії можуть бути особливо застосовні при скринінгу і оцінці компонентів, які

5 взаємодіють безпосередньо з молекулою антитіла або непрямо.

Може застосовуватися ряд систем селекції, що включають, але не обмежених системою генів тимідинкінази простого вірусу герпесу (Wigler et al., Cell 11:223 (1977)), гіпоксантин-гуанін фосфорибозилтрансферази (Szybalska & Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:202 (1992)), і аденин фосфорибозилтрансферази (Lowy et al., Cell 22:817 (1980)) в клітинах tk, hgprt або aprt-, відповідно. Також, може застосовуватися стійкість до антиметаболітів, як основа селекції наступних генів: dhfr, який відповідає за стійкість до метотрексату (Wigler et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:357 (1980); O'Hare et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527 (1981)); gpt, який відповідає за стійкість до мікофенілової кислоти (Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072 (1981)); neo, який відповідає за стійкість до аміноглікозиду G-418 (Wu and Wu, Biotherapy 3:87-95 (1991)); і hygro, який відповідає за стійкість до гігromіцину (Santerre et al., Gene 30:147 (1984)). Способи, як правило, відомі з рівня техніки методик рекомбінантної ДНК можуть бути застосовані звичайним чином для селекції бажаного рекомбінантного клона, і такі способи описані, наприклад, у Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990); and in Chapters 12 and 13, Dracopoli et al. (eds), Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY (1994); Colberre-Garapin et al., Biol. 150:1 (1981), які повністю введені сюди за допомогою посилання.

Рівень експресії молекули антитіла може бути збільшений шляхом ампліфікації вектору (для огляду дивись Bebbington and Hentschel, "The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells" (DNA Cloning, Vol.3. Academic Press, New York, 1987)). Коли маркер у векторній системі, яка експресує антитіло, є ампліфікуючим, то збільшення рівня інгібітору, присутнього в культурі клітини-хазяя, буде збільшувати кількість списів гену маркера. Оскільки ампліфікована ділянка асоційована з геном антитіла, продукування антитіла буде також збільшуватися (Grouse et al, Moř. Cell. Biol. 3:257(1983)).

Клітина-хазяїн може бути ко-трансфікована двома векторами за винаходом, першим вектором, що кодує поліпептид, виділений з важкого ланцюга, і другим вектором, що кодує поліпептид, виділений з легкого ланцюга. Два вектори можуть містити ідентичні селектуючі маркери, які дають можливість рівній експресії поліпептидів важкого і легкого ланцюга. Альтернативно, може застосовуватися один вектор, який кодує, і здатний до експресії обох поліпептидів - важкого і легкого ланцюга. У таких ситуаціях легкий ланцюг повинен бути вміщений перед важким ланцюгом, щоб уникнути надлишку токсично вільного важкого ланцюга (Proudfoot, Nature 322:52 (1986); Kohler, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2197 (1980)). Кодуючі послідовності важкого і легкого ланцюга можуть включати кДНК або геномну ДНК.

Одного разу отримана молекула антитіла з тварини, хімічно синтезована або рекомбінантно експресована може бути очищена будь-яким способом, відомим з рівня техніки, для очищення молекули імуноглобуліну, наприклад, з допомогою хроматографії (наприклад, іонно-обмінної, аффіної, особливо, аффіної до певного антигену після протейну і ексклюзивної хроматографії), центрифугування, диференціальної розчинності або за допомогою будь-якої іншої стандартної методики для очищення білків. Крім того, антитіла за даним винаходом або їх фрагменти,

45 можуть бути зшиті з послідовностями гетерологічних поліпептидів, описаних тут, або з іншими відомими з рівня техніки для полегшення очищення.

Даний винахід охоплює антитіла рекомбінантно зшиті або хімічно кон'юговані (включаючи обидві - ковалентну і нековалентну кон'югації) з поліпептидом. Зшиті або кон'юговані антитіла за даним винаходом можуть застосовуватися для полегшення очищення. Дивись, наприклад, Harbor et al., вище, і РСТ публікацію WO 93/21232; EP 439,095; Naramura et al., Immunol. Lett. 39:91-99 (1994); U.S. Пат. No. 5,474,981; Gillies et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 89:1428-1432 (1992); Fell et al., J. Immunol. 146:2446-2452(1991), які повністю введені за допомогою посилання.

Крім того, антитіла або їх фрагменти за даним винаходом можуть бути зшиті з маркерними послідовностями, такими як пептид, для полегшення очищення. У переважних втіленнях, маркетна амінокислотна послідовність являє собою серед інших гексагістидиновий пептид, такий як фрагмент, передбачений у векторі pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, Calif., 91311), багато які з таких послідовностей є комерційно доступними. Як описано у Gentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824 (1989), наприклад, гексагістидин передбачений для зручного очищення зшитого білка. Інші пептидні фрагменти, які застосовуються для очищення,

включають, але не обмежені ними, "НА" фрагмент, який відповідає епітопу, виділеному з білка гемаглютиніну вірусу грипу (Wilson et al., Cell 37:767 (1984)) і "flag" фрагмент.

#### Діагностичні застосування антитіл

Антитіла за винаходом включають похідні, які модифіковані, тобто за допомогою ковалентного приєднання будь-якого типу молекули антитіла, так що ковалентне приєднання не впливає на зв'язування антигену. Наприклад, але не шляхом обмеження, похідні антитіла включають антитіла, які були модифіковані, наприклад, з допомогою біотинілювання, HRP або за допомогою будь-якого іншого детектуючого компонента.

Антитіла за даним винаходом можуть застосовуватися, наприклад, але не обмежуючись цими застосуваннями, для детекції Фактора D, включаючи обидва *in vitro* і *in vivo* діагностичних способів. Наприклад, антитіла знаходять застосування в імуноаналізах для якісного і кількісного вимірювання рівня Фактора D в біологічних зразках, отриманих з очей суб'єктів, страждаючих зв'язаними з очними хворобами станами або захворюваннями. Звичайні імуноаналізи описані, наприклад, у Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988) (повністю введене сюди за допомогою посилання).

Як обговорюється більш детально нижче, антитіла за даним винаходом можуть застосовуватися або індивідуально, або в комбінації з іншими композиціями. Антитіла можуть бути додатково рекомбінантно зшиті з гетерологічним поліпептидом по N- або C-кінцю або можуть бути хімічно кон'юговані (включаючи ковалентну і нековалентну кон'югації) з поліпептидними або з іншими композиціями. Наприклад, антитіла за даним винаходом можуть бути рекомбінантно зшиті або кон'юговані з молекулами, що застосовуються як мітки в аналізах по детектуванню.

Даний винахід додатково охоплює застосування антитіл або їх фрагментів, кон'югованих з діагностичним агентом, для детектування рівня компонентів шляху комплементу в оці підданого впливу індивідуума. Антитіла можуть застосовуватися в діагностичних цілях, наприклад для спостереження за розвитком або прогресією очного стану або хвороби, як частина процедури клінічного дослідження, наприклад, для визначення ефективності даного режиму лікування. Детекція може бути полегшена за допомогою з'єднання антитіла з детектуючою речовиною. Приклади детектуючих речовин включають простетичні групи, флуоресцентні речовини, люмінесцентні речовини, біоломінесцентні речовини, радіоактивні речовини, випромінюючі позитрони метали із застосуванням різних томографій з позитронною емісією і не радіоактивних парамагнітних іонів металів. Детектуюча речовина може бути приєднана або кон'югована, або безпосередньо з антитілом (або його фрагментом), або непрямо через посередник (такий як, наприклад, лінкер, відомий з рівня техніки) із застосуванням методик, відомих з рівня техніки. Дивись, наприклад, U.S. Пат. No. 4741900 для іонів металів, які можуть бути кон'юговані з антитілами для застосування як діагностиків згідно з даним винаходом. Приклади відповідних ферментів включають пероксидазу хрону, лужну фосфатазу, бета-галактозидазу або ацетилхолінестеразу; приклади відповідних комплексів протестичних груп включають стрептавидін/біотин і авидін/біотин; приклади відповідних флуоресцентних речовин включають умбелліферон, флуоресцеїн, флуоресцеїн ізотіоціанат, родамін, дихлортриазиніламін флуоресцеїн, дансил хлорид або фікоерітрин; приклад люмінесцентної речовини включає люмінол; приклади біоломінесцентних речовин включають люциферазу, люциферин і аекворин; і приклади відповідної радіоактивної речовини включають <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I, <sup>111</sup>In або - <sup>99</sup>Tc.

Антитіла також можуть бути приєднані до твердої підкладки, яка особливо застосовується для імуноаналізу або очищення антиген-мішені. Така тверда підкладка включає, але не обмежена ними, скло, целюлозу, поліакриламід, нейлон, полістирен, полівінілхлорид або поліпропілен.

Мічені антитіла і їх похідні і аналоги, які специфічно зв'язуються з Фактором D, можуть застосовуватися для діагностичних цілей, щоб детектувати, діагностувати або спостерігати за хворобами, захворюваннями і/або станами, асоційованими з аберантною експресією і/або активністю Фактора D. У винаході пропонується застосування для детектування аберантною експресією Фактора D, що включає (а) аналіз експресії Фактора D в клітинах або в рідині організму індивідуума із застосуванням одного або більше антитіла за даним винаходом, специфічні до Фактора D і (b) порівняння рівня генної експресії зі стандартним рівнем експресії, за допомогою чого збільшення або зменшення рівня експресії Фактора, який аналізується в порівнянні зі стандартним рівнем експресії є показником аберантною експресії.

Антитіла можуть застосовуватися для детектування присутності і/або рівня Фактора D в зразку, наприклад, в очній рідині. Спосіб детектування може включати контактування зразка з антитілом до Фактора D і визначення кількості антитіла, яке зв'язується із зразком.

У винаході пропонується діагностичний аналіз для діагностики захворювання, який включає (а) аналіз експресії Фактора D в клітинах або в рідині організму індивідуума із застосуванням одного або більше за антитіла за даним винаходом, специфічні до Фактора D і (b) порівняння рівня генної експресії зі стандартним рівнем експресії, за допомогою чого збільшення або зменшення рівня експресії Фактора, який аналізується в порівнянні зі стандартним рівнем експресії є показником для конкретного захворювання.

Антитіла за винаходом можуть застосовуватися для аналізу рівня білка в біологічному зразку із застосуванням класичних імуногістологічних способів, відомих з рівня техніки фахівцям в даній галузі (наприклад, дивись Jalkanen, et al., J. Cell. Biol. 101:976-985 (1985); Jalkanen, et al., J. Cell. Biol. 105:3087-3096 (1987)). Інші способи на основі антитіл, що застосовуються для детектування експресії гена і білка, включають імуноаналізи, такі як твердофазний ІФА (ELISA) і радіоімуноаналіз (RIA). Відповідні мітки для аналізу із застосуванням антитіл відомі з рівня техніки і включають ферментні мітки, такі як глюкозоксидаса; радіоізотопи, такі як йод ( $^{125}\text{I}$ ,  $^{121}\text{I}$ ), вуглевод (UC), сіра ( $^{35}\text{S}$ ), тритій ( $^3\text{H}$ ), індій ( $^{112}\text{In}$ ), і технецій ( $^{99}\text{Tc}$ ); люмінесцентні мітки, такі як люмінол; і флуоресцентні влучні, такі як флуоресцеїн і родамін, і біотин.

Один аспект за винаходом являє собою детектування і діагностику хвороби або захворювання, асоційованої з активацією комплементу в очах суб'єкта, переважно у ссавця, і найбільш переважно, у людини. У одному втіленні діагностика включає: а) огорожа зразка з ока пацієнта; б) вимірювання рівня компонентів комплементу, таких як C3a або C3b, або C5a. Рівень фону може бути визначений різними способами, що включають порівняння кількості міченої детектованої молекули зі стандартною раніше певною для конкретної системи величиною.

У втіленні, моніторинг хвороби або захворювання проводять шляхом повторення способу діагностики хвороби або захворювання, наприклад, через місяць після первинної діагностики, через шість місяців після первинної діагностики, через рік після первинної діагностики тощо.

Терапевтичні застосування інгібіторів шляху комплементу

Інгібітори шляху комплементу можуть водитися суб'єкту, страждаючому очною хворобою, такою як вікова макулярна дегенерація. Антитіло, яке містить або яке не містить терапевтичний компонент, кон'югований з ним, може застосовуватися в терапевтичних цілях. Даний винахід стосується застосування інгібіторів шляху комплементу, особливо, антитіл, який включає введення вказаних інгібіторів тварині, ссавцеві або людині для лікування очної хвороби, захворювання або стану, що включає активацію шляху комплементу. Тварина або суб'єкт може являти собою тварину, потребує конкретного лікування, з конкретним діагностованим захворюванням, наприклад, пов'язаним з комплементом. Антитіла, направлені проти Фактора D застосовуються для інгібування захворювань або станів, зв'язаних з альтернативним шляхом комплементу. Особливо, даний винахід стосується лікування AMD, діабетичної ретинопатії і хоріоїдальної неоваскуляризації. Ефекти активації компонентів шляху комплементу можуть бути зменшені або усунені у підданого лікуванню ссавця, наприклад, шляхом введення терапевтично прийнятної дози антитіла або антитіл за даним винаходом, або коктейлю антитіл за даним винаходом, або в комбінації з іншими молекулами з різних джерел.

Терапевтичні компоненти за винаходом включають, але не обмежені ними, антитіла за винаходом (які включають фрагменти, їх аналоги і похідні, як тут описано) і нуклеїнові кислоти, що кодують антитіла за винаходом, як описано нижче (які включають фрагменти, їх аналоги і похідні, і антиідвотипичні антитіла, як описано тут). Антитіла за винаходом можуть застосовуватися для лікування, інгібування або запобігання хворобам, захворювань або станів, асоційованого з аберантною експресією і/або активністю компонентів шляху комплементу, особливо, компонентів альтернативного шляху, і особливо, Фактора D. Лікування і/або запобігання хворобам, захворюванням або станам, асоційованих з аберантною експресією і/або активністю Фактора D, включає, але не обмежене ними, полегшення щонайменше одного симптому, асоційованого з цими хворобами, захворюваннями або станам. Антитіла за винаходом можуть пропонуватися у вигляді фармацевтично прийнятних композицій, як відомо з рівня техніки, або як описано в описі винаходу.

Кількість антитіла, яке ефективно при лікуванні, інгібуванні і запобіганні хвороби або захворювань, асоційованих з аберантною експресією і/або активацією компонентів шляху комплементу, може бути визначена за допомогою стандартних клінічних методик. Антитіло може вводитися в режим лікування згідно з хворобою, наприклад, у вигляді однієї або декількох доз від одного до декількох днів для поліпшення стану хвороби, або антитіло може вводитися періодичними дозами протягом тривалого часу для запобігання очним хворобам або станам.

Крім того, *in vitro* аналізи необов'язково можуть застосовуватися для того, щоб допомогти ідентифікації оптимальних меж дозування. Точна доза, яку потрібно застосовувати в складі, також буде залежати від шляху введення і серйозності хвороби або захворювання, і повинна

бути визначена згідно з рішенням практикуючого лікаря і згідно з обставинами кожного конкретного пацієнта. Ефективні дози можуть бути екстрапольовані виходячи з кривих доза-відповідь, виділених на основі *in vitro* модельних тест-систем або модельних тест-систем тварин.

5 Для антитіл, дозування, ті, які вводяться пацієнту звичайно складають від 0,1 мг/кг до 100 мг/кг від ваги тіла пацієнта. Переважно, дозування, що вводиться пацієнту, складає між 0,1 мг/кг і 20 мг/кг від ваги тіла пацієнта, більш переважно, 1 мг/кг-10 мг/кг від ваги тіла пацієнта. Звичайно, людські антитіла мають більший період півжиття всередині тіла людини, ніж антитіла з інших видів, завдяки імунній відповіді на чужерідні поліпептиди. Таким чином, часто є

10 можливим більш низьке дозування людських антитіл і менша частота введення. Крім того, дозування і частота введення антитіл за винаходом може бути зменшена шляхом посилення засвоєння і проникності в тканині (наприклад, в мозок) антитіл за допомогою модифікацій, таких як, наприклад, ліпідизація. У переважному аспекті, антитіло є по суті очищеним (наприклад, по суті вільним від речовин, які обмежують його ефект або виробляють небажані побічні ефекти).

15 Відомі різні системи доставки, і вони можуть застосовуватися для введення антитіла за даним винаходом, системи доставки, що включають ін'єкцію, наприклад, інкапсуляцію в ліпосоми, мікрочастинки, мікрокапсули, рекомбінантні клітини, здатні до експресії компонента, рецептор-опосередкований ендоцитоз (дивись, наприклад, Wu et al., J. Biol. Chem. 262:4429-4432 (1987)), конструкцію нуклеїнової кислоти, як частини ретровірусного або іншого вектора

20 тощо. Антитіло може бути введене ссавцеві будь-яким прийнятним способом. Способи введення включають, але не обмежені ними, інтрадермальний, внутрішньом'язовий, внутрішньочеревинний, внутрішньовенний, підшкірний, внутрішньоносовий, епідуральний, інгаляційний і пероральний шляхи введення. Однак, для мети даного винаходу переважним шляхом введення є внутрішньоочний.

25 Введення може бути систематичним або локальним. Крім того, може бути бажаним вводити терапевтичні антитіла або композиції за винаходом в центральну нервову систему будь-яким відповідним шляхом, що включає інтравентрикулярну або інтратекальну ін'єкцію; інтравентрикулярна ін'єкція може бути полегшена за допомогою інтравентрикулярного катетера, наприклад, приєднаного до резервуара, такого як резервуар Оммаїя.

30 У іншому втіленні, антитіло може бути доставлене у везикулі, особливо, в ліпосомі (дивись Langer, Science 249:1527-1533 (1990); Treat et al., in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, *ibid.*, pp. 317-327; дивись в основному там же). Ще в одному втіленні антитіло може бути доставлене в системі з контролюючим вивільненням. У одному втіленні, може застосовуватися насос (дивись Langer, *вище*; Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201 (1987); Buchwald et al., Surgery 88:507 (1980); Saudek et al, N. Engl. J. Med. 321:574 (1989)). У іншому втіленні, можуть застосовуватися полімерні речовини (дивись Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger and Peppas, J., Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61 (1983); дивись також Levy et al., Science 228:190 (1985); During et al., Ann. Neurol. 25:351 (1989); Howard et al., J. Neurosurg. 71:105 (1989)). Ще в одному втіленні, система з контролюючим вивільненням може бути вміщена поблизу терапевтичної мішені.

45 У даному винаході також пропонуються фармацевтичні композиції, що застосовуються в даному способі. Такі композиції включають терапевтично ефективну кількість антитіла і фізіологічно прийнятний носій. У конкретному втіленні, термін "фізіологічно прийнятний" означає затверджений регулюючим Федеральним відомством або регулюючим відомством під владою штату або присутнє в списку U.S. Фармакопії або в іншому списку, що Звичайно визнається фармакопєю для застосування у тварин, і більш конкретно у людини. Термін "носій" означає розріджувач, ад'ювант, допоміжну речовину або носій, з яким вводиться терапевтичний агент. Такі фізіологічні носії можуть являти собою стерильні рідини, такі як вода або масла, що

50 включає масла з походженням з нафти, тварини, рослини або з синтетичним походженням, такі як арахісове масло, соєва олія, мінеральне масло, кунжутна олія і подібні. Вода є переважним носієм, коли фармацевтична композиція вводиться внутрішньовенно. Сольові розчини і водний розчин декстрази, і розчини гліцерину також можуть застосовуватися як рідкі носії, особливо для розчинів для ін'єкцій. Відповідні фармацевтичні допоміжні речовини включають крохмаль, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, крейду, силікагель, стеарат натрію, моностеарат гліцерину, тальк, хлорид натрію, сухе зняте молоко, гліцерин, пропиляний, гліколь, воду, етанол і подібні. Композиція, якщо бажано, також може містити міnorні кількості

60

зволожуючих або емульгуючих агентів, або буферних агентів для приведення рН. Ці композиції можуть приймати форму розчинів, суспензій, емульсій, таблеток, пілюль, капсул, порошоків, складів з безперервним вивільненням і подібні. Композиція може бути включена в склад у вигляді супозиторію з традиційними зв'язувальними речовинами і носіями, такими як тригліцериди. Пероральний склад може включати стандартні носії, такі як фармацевтичні категорії маніту, лактози, крохмалю, стеарату магнію, сахарину натрію, целюлози, карбонату магнію тощо. Приклади відповідних носіїв описані у "E. W. Martin Remington's Pharmaceutical Sciences". Такі композиції містять ефективну кількість антитіла, переважно в очищеній формі разом з відповідною кількістю носія, так щоб забезпечити форму для правильного введення пацієнту. Склад повинен відповідати способу введення.

У одному втіленні, композиція включена в склад відповідно до звичайних процедур, як фармацевтична композиція, адаптована для внутрішньовенного введення людям. Звичайно, композиції для внутрішньовенного введення являють собою розчини в стерильному ізотонічному водному буфері. Де необхідно, композиція може включати солубілізуючий агент і локальний анестетик, такий як лідокаїн, для полегшення болю в місці ін'єкції. Звичайно, інгредієнти постачаються або окремо, або змішані разом в єдиній дозованій формі, наприклад, у вигляді сухого ліофілізованого порошку або у вигляді безводного концентрату в герметично упакованому контейнері, такому як ампула або саше, з вказівкою кількості активного агента. Там де композицію потрібно вводити з допомогою інфузій, вона може бути забезпечена інфузійним флаконом, що містить стерильну воду або сольовий розчин фармацевтичної категорії. Там де композицію вводять за допомогою ін'єкції, вона забезпечується ампулою зі стерильною водою для ін'єкції або сольовим розчином.

У винаході також пропонується фармацевтична група або набір, що включає один або більше контейнерів, заповнені одним або більше інгредієнтів фармацевтичної композиції за винаходом. Необов'язково такий контейнер(и) може супроводжуватися зауваженням в формі, наказаний державним органом, регулюючим виробництво, застосування або продаж лікарських засобів або біологічних продуктів, причому зауваження відображає затверджене виробничою організацією застосування або продаж для введення людині.

Крім того, антитіла за даним винаходом можуть бути кон'юговані з різними ефекторними молекулами, такими як гетерологічні поліпептиди, лікарські засоби, радіонуклеотиди або токсини. Дивись, наприклад, РСТ публікації WO 92/08495; WO 91/14438; WO 89/12624; U.S. Пат. No. 5314995; EP 396387. Антитіло або його фрагмент можуть бути кон'юговані з терапевтичним компонентом, таким як цитотоксин, наприклад, цитостатичний або цитотоксичний агент, терапевтичний агент або радіоактивний іон металу, наприклад, альфа-випромінювач, такий як, наприклад, <sup>213</sup>Bi. Цитотоксин або цитотоксичний агент включає будь-який агент, який є згубним для клітин. Приклади включають паклітаксол, цитохалазин В, граміцидин D, етидіум бромід, еметин, мітоміцин, етопосид, тенопосид, вінкрістин, вінбластин, колхіцин, доксорубіцин, даунорубіцин, динідроксиантрацидін, мітоксантрон, мітраміцин, актиноміцин D, 1-дегідротестостерон, глюкокортикоїди, прокаїн, тетракаїн, лідокаїн, пропранолол і пуроміцин, і їх аналоги і гомологи. Терапевтичні агенти включають, але не обмежені ними, антиметаболіти (наприклад, метотрексат, 6-меркаптопурин, 6-тіогуанін, цитарабін, 5-фторурацил, декарбазин), алкілюючі агенти (наприклад, мехлоретамін, тіотепа, хлорамбуцил, мелфалан, кармустин (BSNU) і ломустин (CCNU), циклоіфамід, бусульфан, диброманіт, стрептозотоцин, мітоміцин С і цис-дихлордіамін платину (II) (DDP) цисплатин), антрацикліни (наприклад, даунорубіцин (відомий як дауноміцин) і доксорубіцин), антибіотики (наприклад, дактиноміцин (відомий як актиноміцин), блеоміцин, мітраміцин і антраміцин (AMC)), і антимітотичні агенти (наприклад, вінкрістин і вінбластин).

Методики кон'югації такого терапевтичного компонента з антитілами добре відомі, дивись, наприклад, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in *Controlled Drug Delivery* (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), and Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.* 62:119-58 (1982). Альтернативно, антитіло може бути кон'юговане з іншим антитілом з утворенням гетерокон'югату. (Дивись, наприклад, Segal in U.S. Пат. No. 4676980).

Кон'югати за винаходом можуть застосовуватися для модифікації даної біологічної відповіді, причому терапевтичний агент або лікарський компонент не повинні бути витлумачені як такі, що обмежуються класичними хімічними терапевтичними агентами. Наприклад, лікарський компонент може являти собою білок або поліпептид, що володіє бажаною біологічною активністю. Такі білки можуть включати, токсин, такий як абрин, рицин А, синьогнійний екзотоксин або дифтерійний токсин; білок, такий як Фактор некрозу пухлини,  $\alpha$  - інтерферон,  $\beta$  - інтерферон, Фактор росту нервів, тромбоцитарний Фактор росту, активатор тканинного плазміногену, апоптозний агент, наприклад, TNF -  $\alpha$ , TNF -  $\beta$ , AIM I (Дивись, Міжнародну Публікацію No. WO 97/33899), AIM II (Дивись, Міжнародну Публікацію No. WO 97/34911), Fas Ліганд (Takahashi et al., *Int. Immunol.*, 6:1567-1574 (1994)), VEGF (Дивись, Міжнародну Публікацію No. WO 99/23105), тромботичний агент або анти-ангіогенний агент, наприклад, ангіостатин або ендостатин; або модифікатори біологічної відповіді, такі як, наприклад, лімфокіни, інтерлейкін-1 ("IL-1"), інтерлейкін-2 ("IL-2"), інтерлейкін-6 ("IL-6"), гранулоцит макрофаг колонієстимулюючий Фактор ("GM-CSF"), гранулоцит колонієстимулюючий Фактор ("G-CSF"), або інші Фактори росту.

Генна терапія на основі антитіла

У іншому аспекті винаходу, нуклеїнові кислоти, що включають послідовності, що кодують антитіла або їх зв'язувальні фрагменти, вводять для лікування, інгібування або запобігання хворобі або захворюванню, асоційованій з аберантною експресією і/або активацією компонентів шляху комплементу, шляхом генної терапії. Генна терапія означає терапію, здійснювану шляхом введення суб'єкту нуклеїнової кислоти, яка експресується або здатна до експресії. У цьому втіленні винаходу, нуклеїнові кислоти продукують білок, що кодується ними, який опосередкує терапевтичний ефект. Будь-які з доступних способів генної терапії можуть застосовуватися згідно з даним винаходом. Приведені для прикладу способи описані нижче.

Для основних оглядів способів генної терапії дивись Goldspiel et al., *Clinical Pharmacy* 12:488-505 (1993); Wu and Wu, *Biotherapy* 3:87-95 (1991); Tolstoshev, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:573-596 (1993); Mulligan, *Science* 260:926-932 (1993); and Morgan and Anderson, *Ann. Rev. Biochem.* 62:191-217 (1993); May, *TIBTECH* 11(5):155-215(1993).

У одному аспекті, компонент включає послідовності нуклеїнової кислоти, що кодують антитіло, причому вказані послідовності нуклеїнової кислоти є частиною експресуючих векторів, якими експресують антитіло або його фрагменти, або його химерні білки, або його важкі або легкі ланцюги у відповідному хазяї. Особливо, такі послідовності нуклеїнової кислоти мають промотори, функціонально зв'язані з ділянкою, що кодує антитіло, причому вказаний промотор є індукованим або конститутивним, і необов'язкове тканиноспецифічним.

У іншому конкретному втіленні, застосовуються молекули нуклеїнової кислоти, в яких послідовності, що кодують антитіло, і будь-які інші бажані послідовності фланкуванні ділянками, які стимулюють гомологічну рекомбінацію в бажаному сайті геному, таким чином, забезпечуючи внутрішньохромосомну експресію нуклеїнових кислот, що кодують антитіло (Koller and Smithies, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:8932-8935 (1989); Zijlstra et al, *Nature* 342:435-438 (1989). В конкретних втіленнях, експресована молекула антитіла являє собою одноланцюжкове антитіло; альтернативно, послідовності нуклеїнової кислоти включають послідовності, що кодують обидва ланцюги антитіла важку і легку, або їх фрагменти.

Доставка нуклеїнових кислот пацієнту може бути або прямою, в цьому випадку пацієнт безпосередньо зазнає впливу нуклеїнової кислоти або векторів, несучих нуклеїнову кислоту, або непрямої, у цьому випадку клітини спочатку трансформують нуклеїновими кислотами *in vitro*, потім трансплантують пацієнту. Ці два способи відомі, відповідно, як *In vivo* або *ex vivo* генна терапія.

У конкретному втіленні, послідовності нуклеїнової кислоти вводять безпосередньо *in vivo*, де вона експресується, продукуючи продукт, що кодується. Це може бути здійснене за допомогою будь-кого з численних способів, відомих з рівня техніки, наприклад, шляхом конструювання нуклеїнових кислот як частини відповідного вектора, експресуючого нуклеїнову кислоту, і його введення так, що вони стають внутрішньоклітинними, наприклад, шляхом інфекції із застосуванням ретровірусних векторів на основі дефектних або ослаблених вірусів або інших вірусних векторів (дивись U.S. Пат. No. 4980286), або шляхом безпосередньої ін'єкції вільної ДНК, або шляхом застосування бомбардування мікрочастинок (наприклад, генної гармати; Biolistic, Dupont), або за допомогою покриття ліпідами, або за допомогою рецепторів клітинної поверхні, або трансфекуючих агентів, за допомогою інкапсуляції в ліпосоми, мікрочастинки або мікрокапсули, або шляхом їх введення в зв'язаному стані з пептидом, про який відомо, що він проникає в ядро, шляхом їх введення зв'язаними з лігандом, при умові опосередкованого рецептором ендцитозу (дивись, наприклад, Wu and Wu, *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432 (1987)) (спосіб, який може застосовуватися для направленої взаємодії з клітинними типами, специфічно



експресуючими рецептори) тощо. В іншому втіленні, можуть бути утворені комплекси нуклеїнова кислота ліганд, в яких ліганд включає фузогенний вірусну пептид для руйнування ендосом, що дає можливість нуклеїновій кислоті уникнути лізосомної деградації. Ще в одному втіленні, нуклеїнова кислота може бути піддана впливу *in vivo* для клітинно-специфічного поглинання і експресії шляхом впливу на конкретну рецептор (дивись, наприклад, РСТ Публікації WO 92/06180; WO 92/22635; WO92/20316; WO93/14188, WO 93/20221). Альтернативно, нуклеїнова кислота може бути введена внутрішньоклітинно, і для експресії введена в ДНК клітину-хазяя за допомогою гомологічної рекомбінації (Koller and Smithies, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935 (1989); Zijlstra et al., Nature 342:435-438 (1989)).

У конкретному втіленні, можуть застосовуватися вірусні вектори, які містять послідовності нуклеїнової кислоти, що кодують антитіло за винаходом (дивись Miller et al., Meth. Enzymol. 217:581-599 (1993)). Ці ретровірусні вектори містять компоненти, необхідні для коректної упаковки вірусного геному і інтеграції в ДНК клітини-хазяя. Послідовності нуклеїнової кислоти, що кодують антитіло, які використовуються в генній терапії, клонують в один або більше векторів, які полегшують доставку гена пацієнту. Більш докладну інформацію про ретровірусні вектори можна виявити у Boesen et al., Biotherapy 6:291-302 (1994), де описане застосування ретровірусного вектора, який здійснює доставку гена *mdr1* в гемапоетичні стовбурові клітини для того, щоб зробити стовбурові клітини більш стійкими до хіміотерапії. Інші посилання, що ілюструють застосування ретровірусних векторів в генній терапії описані в: C1owes et al., J. C1in. Invest. 93:644-651 (1994); Kiem et al., Blood 83:1467-1473 (1994); Salmons and Gunzberg, Human Gene Therapy 4:129-141 (1993); and Grossman and Wilson, Curr. Opin. Gen. and Dev. 3:110-114(1993).

Аденовіруси також можуть застосовуватися в даному винаході. Аденовіруси є особливо привабливими носіями за даним винаходом для доставки антитіл в клітини епітелію дихального шляху. Аденовіруси природно інфікують клітини епітелію дихального шляху. Іншими мішенями для систем доставки на основі аденовірусу є печінка, центральна нервова система, ендотеліальні клітини і м'яз. Аденовіруси мають перевагу, оскільки здатні інфікувати клітини, які не діляться. У Kozarsky and Wilson, Curr. Opin. Gen. Dev. 3:499-503 (1993) представлений огляд генної терапії на основі аденовірусу. У Bout et al., Human Gene Therapy 5:3-10 (1994) продемонстроване застосування аденовірусних векторів для перенесення генів до клітин епітелію дихального шляху макаки-резус. Інші приклади застосування аденовірусу в генній терапії можуть бути виявлені у Rosenfeld et al., Science 252:431- 434 (1991); Rosenfeld et al., Cell 68:143-155 (1992); Mastrangeli et al., J. C1in. Invest.91:225-234 (1993); РСТ Публікації WO94/12649; and Wang, et al., Gene Therapy 2:775-783 (1995). Адено-асоційований вірус (AAV) також може бути запропонований для застосування в генній терапії (Walsh et al., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 204:289-300 (1993); U.S. Пат. No. 5436146; 6632670; 6642051).

Інший спосіб генної терапії включає перенесення гена до клітин в тканинній культурі такими способами, як електропорація, ліпофекція, опосередкована фосфатом кальцію трансфекція або вірусна інфекція. Звичайно спосіб для перенесення включає перенесення селектуемого маркера до клітин. Клітини потім піддають селекції для виділення тих клітин, які отримали перенесений ген і експресують його. Ці клітини потім доставляються пацієнту.

У цьому втіленні, нуклеїнову кислоту вводять в клітину перед введенням *in vivo* отриманої в результаті рекомбінантної клітини. Таке введення може бути проведене за допомогою способу, відомого з рівня техніки, що включає, але не обмеженого ними, трансфекцію, електропорацію, мікроін'єкцію, інфекцію вірусним вектором або вектором бактеріофагу, що містить послідовності нуклеїнової кислоти, злиття клітин, хромосом-опосередкований перенесенням гена, мікроклітинно-опосередкований перенесенням гена, злиття сферопластів тощо Численні методики введення чужерідних генів в клітини відомі з рівня техніки (дивись, наприклад, Loefflerand Behr, Meth. Enzymol.217:599-618 (1993); Cohen et al., Meth. Enzymol.217:618-644 (1993); C1ine, Pharmac. Ther.29:69-92m (1985) і можуть застосовуватися відповідно до даного винаходу при умові, що не порушені фізіологічні і зв'язані з розвитком функції клітин-реципієнтів. Методика повинна забезпечувати стабільне перенесення нуклеїнової кислоти в клітину, так щоб нуклеїнова кислота експресувалась потомством цієї клітини.

Отримані в результаті рекомбінантні клітини можуть бути доставлені пацієнту різними способами, відомими з рівня техніки. Рекомбінантні клітини крові (наприклад, гемапоетичні стовбурові або клітини-попередники) переважно вводять внутрішньовенно. Передбачувана кількість клітин для застосування залежить від бажаного ефекту, стану пацієнта тощо, і може бути визначене фахівцем в даній галузі.

Клітини, в які була введена нуклеїнова кислота для цілей генної терапії охоплюють будь-який бажаний, доступний клітинний тип, і включають, але не обмежені ними, епітеліальні

клітини, ендотеліальні клітини, кератиноцити, фібробласти, мишечні клітини, гепатоцити; клітини крові, такі як Т лімфоцити, В лімфоцити, моноцити, макрофаги, нейтрофіли, еозинофіли, мегакаріоцити, гранулоцити; різні стовбурові і клітини-попередники, наприклад, отримані з кісткового мозку, з крові пуповини, ембріональної печінки тощо.

У одному втіленні, клітина, яка застосовується для генної терапії, є аутологічною пацієнту. Послідовності нуклеїнової кислоти, що кодує антитіло за даним винаходом, вводять в клітини, так щоб вони експресувались клітинами або їх потомством, і рекомбінантні клітини потім вводять *in vivo* для терапевтичного ефекту. Будь-які стовбурові і/або клітини-попередники, які можуть бути виділені і підтримані *In vitro*, потенційно можуть застосовуватися в цьому втіленні за даним винаходом (дивись, наприклад РСТ Публікацію WO 94/08598; Stemple and Anderson, Cell 71:973-985 (1992); Rheinwald, Meth. Cell Bio.21A:229 (1980); and Pittelkow and Scott, Mayo Clinic Proc. 61: 771 (1986)).

Модулювання експресії компонента шляху комплементу за допомогою кіРНК

Було доведено, що кіРНК застосовні як інструмент при дослідженнях модулювання генної експресії, де традиційні антагоністи, такі як малі молекули або антитіла можуть бути менш ефективні. (Shi Y., Trends in Genetics 19(1):9-12 (2003)). *In vitro* синтезовані, дволанцюжкові РНК довжиною 21-23 нуклеотиду можуть діяти як інтерферуючі РНК (іРНК), і можуть специфічно інгібувати генну експресію (Fire A., Trends in Genetics 391; 806-810 (1999)). Ці іРНК діють шляхом опосередкування деградації їх РНК-мішеней. Оскільки їх довжина складає до 30 нуклеотидів, вони не можуть ініціювати механізм клітинного антивірусного захисту. Такі механізми включають продукування інтерферону і загальне вимкнення синтезу білка клітини-хазяя. Практично, кіРНК можуть бути синтезовані і потім клоновані в ДНК векторів. Такі вектори можуть бути трансфіковані, і примушують експресуватися кіРНК на високому рівні. Високий рівень експресії кіРНК застосовується для "нокауту", або значно зменшує кількість білка, продукуемого в клітині, і, таким чином, це застосовується в експериментах, де передбачається, що надекспресія білка зв'язана з таким захворюванням, як злоякісне захворювання. кіРНК застосовуються як антагоністи білків шляху комплементу, і діють шляхом обмеження продукування кліткою антигену і інгібування активації каскаду комплементу.

Пептидоміметики молекули з низькою молекулярною вагою

Добре відомо фахівцям в даній галузі, що можливо замінювати пептиди пептидоміметиками. Пептидоміметики по відношенню до пептидів звичайно є переважними як терапевтичні агенти, що володіють посиленою біодоступністю і відносно відсутністю атак з боку протеолітичних ферментів. Методики молекулярного моделювання можуть застосовуватися для конструювання пептидоміметиків, які наслідують структурі зв'язаних з комплементом пептидів, описаних тут. Відповідно, в даному винаході також пропонуються пептидоміметики і інші компоненти-прототиби, які можуть бути ідентифіковані на основі даних, отриманих з структурного аналізу білка шляху комплементу. Потенційний аналог Фактора D може бути визначений за допомогою застосування комп'ютерного моделювання, що застосовує програму відповідності, таку як GRAM, DOCK або AUTODOCK. Ця процедура може включати комп'ютерний підбір аналогів Фактора D. Комп'ютерні програми також можуть застосовуватися для оцінки тяжіння, відштовхування і стеричних перешкод аналога з потенційним сайтом зв'язування. Звичайно, суворий підбір (наприклад, менші стеричні перешкоди і/або велика сила тяжіння) найбільш сильного потенційного лікарського засобу буде мати місце, якщо ці властивості будуть узгодитися з жорсткою константою зв'язування. Крім того, велика специфічність в дизайні потенційного найбільш вірогідного лікарського засобу буде мати місце, якщо властивості лікарського засобу не будуть суперечити іншим властивостям системи, яка експресує. Це мінімізує потенційні побічні ефекти завдяки небажаним взаємодіям з іншими білками.

Початково може бути отриманий потенційний аналог Фактора D за допомогою скринінгу бібліотеки випадкових пептидів, продукуючих наприклад, рекомбінантним бактеріофагом, або за допомогою скринінгу хімічної бібліотеки. Аналог ліганд, селектований таким способом, може бути систематично модифікований за допомогою програм комп'ютерного моделювання доти, поки не буде ідентифікований один або більш що подає надії потенційний ліганд.

Таке комп'ютерне моделювання дає можливість селекції обмеженої кількості раціональних хімічних модифікацій в протилежність численній кількості, по суті, випадкових хімічних модифікацій, які можуть бути зроблені, і з яких будь-яка модифікація може привести до отримання застосовного лікарського засобу. Таким чином, застосування тривимірної структури, описаної тут, і комп'ютерного моделювання, скринується велика кількість сполук, і декілька вірогідних кандидатів можуть бути визначені без лабораторного синтезу незліченної кількості сполук.

Одного разу ідентифікований потенційний аналог Фактора D, може бути або селектований з бібліотеки хімічних сполук, комерційно доступної від більшості хімічних компаній, включаючи Merck, Glaxo Wellcome, Bristol Meyers Squib, Monsanto/Searle, EH Lilly, Novartis і Pharmacia UpJohn, або альтернативно, потенційний ліганд синтезується *de novo*. Як указано вище, синтез *de novo* одного або навіть відносно невеликої групи конкретних сполук є раціональним виходячи з рівня техніки дизайну лікарських засобів.

Альтернативно, на основі молекулярних структур варіабельних ділянок антитіл до Фактора D, можна застосовувати молекулярне моделювання і раціональний молекулярний дизайн для отримання і скринінгу малих молекул, які наслідують молекулярним структурам ділянок зв'язування антитіл і інгібують активність Фактора D. Ці малі молекули можуть являти собою пептиди, пептидоміметики, олігонуклеотиди або органічні сполуки.

#### Приклад

Ефективність Антитіла в індукованій лазером хоріоїдальної неоваскуляризації (CNV), як моделі вологій форми AMD.

Ефективність внутрішньоочних ін'єкцій антитіла може бути протестована в моделі CNV при пошкодженні лазером, як описано раніше у Krzystolik MG et al. (Arch Ophthalmol. 2002; 120: 338-346). Ця модель може застосовуватися для тестування ефективності будь-якого лікарського засобу кандидата для запобігання і/або поліпшенню при AMD. У цій індукованій лазером моделі CNV застосовується аргонний лазер зеленого діапазону для індукції CNV в макулі мавпи. Існує хороша кореляція між кількістю CNV пошкоджень і ангіографічною картиною просочення.

Існують дві фази досліджень: Фаза 1, фаза, що запобігає, включає початок лікування антитілом перед лазерною індукцією CNV і через один тиждень після впливу лазером для інгібування утворення CNV, яка звичайно з'являється через 2-3 тижні після пошкодження лазером. Фаза 2, фаза лікування, починається на 42 день (через 3 тижні після пошкодження лазером), коли CNV пошкодження будуть очікуватися в контрольних очах з фази 1. Фаза 2 визначає ефект лікування на ослаблення міри існуючих CNV пошкоджень і на ослаблення просочення існуючих CNV пошкоджень.

Десять макак-крабоїдів (*Macaca fascicularis*) звичайно застосовували в дослідженні такого типу. Мавпам робили анестезію під час всіх процедур за допомогою внутрішньом'язових ін'єкцій, наприклад, гідрохлоридом кетаміну (20 мг/кг); малеатом ацепромазину (0,125 мг/кг); і сульфатом атрофіну (0,125 мг/кг). За потреби вводили додаткову анестезію 5-6 мг/кг гідрохлоридом кетаміну. Крім того, для місцевої анестезії звичайно застосовували 0,5% гідрохлорид пропаракаїну. Перед енукліозацією могла вводитися додаткова анестезія внутрішньовенно розчином пентобарбіталу натрію (5 мг/кг). Тварин піддавали евтаназії після проведення експерименту.

#### Лікування з застосуванням антитіла

Антитіло, що Тестується вводили в фізіологічному буфері в концентрації, наприклад, приблизно, 10 мкг/мкл. У контрольне око здійснювали ін'єкцію носія, що складався з всіх компонентів за винятком антитіла, яке тестується. Внутрішньоочні ін'єкції, наприклад, приблизно 50 мкл на око або з антитілом, або з носієм, здійснювали в кожне око, відповідно, через тучну частину війчастого тіла (*pars plana*) із застосуванням голки з калібром 30 і туберкульованого шприца після місцевої краплинної анестезії і введення розчину 5% повідон-йоду. Антитіло витягували з флакона через 5 мкм фільтр, і для внутрішньоочних ін'єкцій застосовували нову (загострену) голку калібру 30. Після ін'єкції краплинно вводили в склепіння головного мозку бактерицидну очну мазь, таку як бацитрацин. Сайти ін'єкції звичайно варіювали, щоб уникнути травми склери.

У фазі 1, випадково вибирали праве або ліве око тварини для введення внутрішньоочних ін'єкцій антитіла в дозі, наприклад, приблизно, 500 мкг (50 мкл на око), і це око позначали як захищене око. Доза, яка застосовується, може бути визначена на основі дослідження безпеки і токсикології перед даним дослідженням ефективності, або за допомогою інших відповідних клінічних способів. Інше око вибирали для отримання внутрішньоочних ін'єкцій носія і позначали як контрольне око. Обидва ока кожної тварини, звичайно отримували дві внутрішньоочні ін'єкції або з антитілом, що тестується, або тільки з носієм в дні 0 і 14 перед обробкою лазером. На 21 день всі очі піддавали аргонній лазерній фотокоагуляції в зеленому діапазоні для індукції CNV пошкоджень. На 28 день, через тиждень після лазерної індукції захищене око отримувало іншу ін'єкцію з антитілом, і контрольне око отримувало ін'єкцію з носієм. Фазу 2 дослідження починали на 42 день або через 3 тижні після лазерної індукції, коли очікувався розвиток CNV. Після флуоресцентної ангіографії на 42 день обидва ока кожної тварини отримували внутрішньоочні ін'єкції антитіла в дозі, наприклад, приблизно 500 мкг (50 мкл на око), і це повторювалося на 56 день.

## Індукція експериментальної CNV

CNV мембрани індукували в макулі макак-крабоїдів за допомогою лазерних променів зеленого діапазону (Coherent Argon Dye Laser 920; Coherent Medical Laser, Palo Alto, Calif) із застосуванням щілинної лампи і м'яких контактних фундус-лінз.

Дев'ять пошкоджень симетрично розташовували в макулі кожного ока за допомогою закритого маскою хірурга. Лазерні змінні включають: розмір плями 501 00 мкм, тривалість 0,1 секунд, і потужність в межах від 350 до 700 мВт. Потужність, яка застосовується, визначали за допомогою лазерної здатності проводити пухир і невеликий крововилив при вибраній енергії. Якщо крововиливи не помічали, то поруч з першою плямою мали в своєму розпорядженні додаткову лазерну пляму після такої ж лазерної процедури. Кольорові фотографування і флуоресцентну ангіографію звичайно застосовували для детекції і вимірювання міри CNV і просочення CNV. Однак може застосовуватися спосіб, здатний вимірювати індуковану лазером CNV і асоційовані з нею ефекти.

## Дослідження очних змін

Очі тварин перевіряли на відносний пупілярний аферентний дефект і потім розширювали з допомогою 2,5% фенілефрину і 0,8% тропікаміду. Обидва ока досліджували із застосуванням біомікроскопії з щілинною лампою і непрямую офтальмоскопією в дні 0, 14, 28, 42 і 56 (перед ін'єкцією антитіла); дні 1, 15, 29, 43, і 57 (після ін'єкції); в день 21 (перед обробкою лазером); дні 35 і 49 (проміжні дні); і в день 63 (енуклеація і смерть).

Кольорове фотографування і флуоресцентна ангіографія

Фотографування очного дна звичайно здійснювали у всіх тварин в ті ж дні, що і дослідження очних змін. Фотографії можна було отримати із застосуванням фундус-камери (Canon Fundus CF-60Z; Canon USA Inc, Lake Success, NY) плівки 35-мм, але можна було застосовувати будь-який інструмент для фотографування.

Imagenet Система Цифрової Ангіографії (Торсон 501 A і Imagenet система; Torcon America Corp, Paramus, NJ) може застосовуватися для флуоресцентної ангіографії. Фотографії обох очей при відсутності ефекту червоних очей звичайно отримували з допомогою флуоресцентної ангіографії із застосуванням 0,1 мл/кг від ваги тіла 10% флуоресцеїну натрію (Akorn Inc, Abita Springs, La) з швидкістю 1 мл/с. Після ін'єкції флуоресцеїну в першу хвилину отримували швидкі серії фотографій спочатку заднього полюса правого ока і потім лівого ока. Додаткові пари фотографій звичайно отримували приблизно через 1-2 і 5 хвилин. У період часу між 2 і 5 хвилинами отримували дві фотографії середньопериферичних областей (скроневої і назальної) кожного ока. Флуоресцентну ангіографію здійснювали на початковому рівні (день 0) і дні 7, 14, 29, 42, 49, 57 і 63.

Аналіз офтальмологічних даних

Фотографії і ангіограми оцінювали по очевидності ангіографічного просочення, крововиливів або будь-яких інших аномалій. Крововиливи очного дна розподіляли на основі системи розподілу крововиливів сітківки, яка включає менш ніж 3 дискові області, визначали як 1-а міра, крововиливи в 3-6 дискових областях, як 2-га міра, і крововиливи в більш ніж 6 дискових областях визначали як 3-я міра. Також оцінювали зв'язок крововиливів з CNV мембранами або сайтом лазерної індукції. Клінічно значущі кровотечі визначали як будь-який крововилив на очному дні більше, ніж або рівне 6 дисковим областям.

Очне запалення також оцінювали із застосуванням біомікроскопії з щілинною лампою. Клітини передньої камери ока і вітреальні клітини вважали за допомогою щілинної лампи 2-мм з високим збільшенням і розподіляли із застосуванням схеми Американської Академії Офтальмології. CNV пошкодження розподіляли за допомогою перегляду флуоресцентних ангіограм, здійснених в дні 35, 42, 49, 56 і 63 досвідченими дослідниками, звичайно двома, що проводили розподіл згідно з консенсусною думкою. CNV пошкодження розподіляли згідно за наступною схемою із застосуванням стандартизованих ангіографій для порівняння. 2-га міра пошкодження виявляє гіперфлуоресценцію без просочення. 3-я міра пошкоджень показує гіперфлуоресценцію на ранній або середньопроміжних фотографіях і пізніе просочення. 4-та міра пошкоджень показує яскраву гіперфлуоресценцію в проміжному і пізньому просоченні позаду оброблених областей. 4-ту міру пошкоджень визначали як клінічно значущу.

Статистичний аналіз може бути здійснений із застосуванням Панелі Даних, Зібраних з Популяції за допомогою Узагальнених Оцінних Рівнянь і коефіцієнта частоти захворювань (IRR). Коефіцієнт частоти захворювань звичайно визначають як кількість пошкоджень 4-тої міри, які зустрічаються під час даного інтервалу, ділений на загальну кількість індукованих пошкоджень. У фазі 1, IRR означає відношення коефіцієнта частоти захворювань пошкоджень 4-тої міри в захищених очах до коефіцієнта частоти захворювань в контрольних очах. IRR зі значенням 1 означає відсутність відмінностей між коефіцієнтами частоти захворювань. Число набагато

менше, ніж 1 вказує на зменшення захворювань при пошкодженнях 4-тої міри в захищеній групі проти контрольної групи. У фазі 2, порівнюють захворювання при пошкодженнях 4-тої міри в контрольних очах проти підданих лікуванню очей. Це означає, що захворювання при пошкодженнях 4-тої міри порівнюють протягом всього часу в наборі очей, які спочатку були визначені в контрольну групу, але в дні 42 і 56 піддані лікуванню антитілом і визначені як очі, піддані лікуванню.

Скринінг на предмет агентів, які застосовуються в лікуванні AMD

Дослідження і лікування вікової макулярної дегенерації (AMD) може бути здійснене із застосуванням нової моделі на тварині, що включає мишей, дефіцитних або по хемоатрактанту моноцитів - білку-1, -2; також відомому як MCP-1) або дефіцитних по його родинному C-C рецептору-2 хемокінів (Ccr-2) (Ambati, J. et al. Nat Med. 2003 Nov;9(11):1390-7. Epub 2003 Oct 19). У цих мишей розвиваються кардинальні межі AMD, що включають накопичення ліпофусцину в ретинальному пігментованому епітелії і накопичення друз нижче за ретинального пігментованого епітелію (RPE), атрофію фоторецептора і хоріоїдальну неоваскуляризацію (CNV).

Лікування цих мишей з бажаним агентом може дати можливість визначення ефективності такого агента в лікуванні AMD.

#### ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Спосіб запобігання або полегшення очної хвороби, яка пов'язана з активністю комплементу у суб'єкта, що включає стадію введення інгібітору шляху комплементу суб'єкту, який потребує такого введення, де шлях комплементу являє собою альтернативний шлях комплементу, де інгібітор інгібує активність фактора В, фактора Ва, фактора Вb або фактора D і де інгібітор являє собою антитіло або його зв'язувальний фрагмент.

2. Спосіб за п. 1, де очну хворобу вибирають з групи, яка складається з дегенерації жовтої плями, діабетичної ретинопатії та очного ангіогенезу.

3. Спосіб за п. 2, де суб'єкту потрібне інгібування очної неоваскуляризації, яке впливає на власне судинну оболонку ока, ретинальний пігментований епітелій або ретинальну тканину.

4. Спосіб за п. 1, де інгібітор шляху комплементу являє собою фрагмент антитіла, що включає Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv або однокланцюжковий фрагмент Fv.

5. Спосіб за п. 1, де інгібітор шляху комплементу являє собою одноклононе антитіло.

6. Спосіб за п. 1, де інгібітор шляху комплементу являє собою моноклональне антитіло.

7. Спосіб за п. 1, де інгібітор шляху комплементу являє собою химерне антитіло, деімунізоване, гуманізоване, приматизоване або людське антитіло.

8. Спосіб за п. 1, де антитіло або його зв'язувальний фрагмент специфічно зв'язується з фактором D, фактором В, фактором Ва або фактором Вb.

9. Спосіб за п. 8, де антитіло або його зв'язувальний фрагмент специфічно зв'язується з фактором D.

10. Спосіб за п. 9, де антитіло являє собою моноклональне антитіло 166-32, отримане з гібридами, депонованої в АТСС і позначеної НВ 12476.

11. Спосіб за п. 9, де антитіло або його зв'язувальний фрагмент специфічно зв'язується з тим же епітопом, що і моноклональне антитіло 166-32, отримане з гібридами, депонованої в АТСС і позначеної НВ 12476.

12. Спосіб за п. 9, де антитіло являє собою гуманізоване моноклональне антитіло, виділене з антитіла 166-32, отриманого з гібридами, депонованої в АТСС і позначеної НВ 12476.

13. Спосіб за будь-яким з пп. 1-12, де інгібітор шляху комплементу вводять за допомогою парентерального введення, перорального введення, ентерального введення, внутрішньоочного введення, введення в склоподібне тіло, субкон'юнктивального введення, інтрадермального введення, внутрішньом'язового введення, інтраперитонеального введення, внутрішньовенного введення, підшкірного введення, інтраназального введення, інтратекального введення, внутрішньошлуночкового введення, епідурального введення, інгаляції, за допомогою біосумісного або біорозкладаного імплантанта з уповільненим вивільненням або імплантації інфузійного насоса.

14. Спосіб за будь-яким з пп. 1-12, де інгібітор шляху комплементу вводять в око за допомогою розчину для очної примочки, очної мазі, очного щитка або розчину очних крапель.

15. Спосіб за будь-яким з пп. 1-12, який додатково включає стадію введення імуномодуючої сполуки, протизапальної сполуки, антиангіогенної сполуки або імунопригнічуючого компонента вказаному суб'єкту.

16. Спосіб за будь-яким з пп. 1-12, який додатково включає проведення суб'єкту антиангіогенної терапії, націленої на судинний ендотеліальний фактор росту (VEGF).

17. Спосіб за будь-яким з пп. 1-12, який додатково включає введення суб'єкту стероїду.

18. Спосіб за п. 1, де очну хворобу вибирають з групи, яка складається з дегенерації жовтої плями, діабетичної ретинопатії та очного ангіогенезу, і де інгібітором шляху комплементу є антитіло або його зв'язувальний фрагмент, який специфічно зв'язується з тим же епітопом, що і  
5 моноклональне антитіло 166-32, отримане з гібридами, депонованої в ATCC і позначеної HB 12476.

19. Спосіб за п. 1, де суб'єкту потрібне інгібування очної неоваскуляризації, яке впливає на власне судинну оболонку ока, ретинальний пігментований епітелій або ретинальну тканину, і де інгібітором шляху комплементу є антитіло або його зв'язувальний фрагмент, що специфічно  
10 зв'язується з тим же епітопом, що і моноклональне антитіло 166-32, отримане з гібридами, депонованої в ATCC і позначеної HB 12476.

20. Спосіб за п. 1, де очну хворобу вибирають з групи, що складається з дегенерації жовтої плями, діабетичної ретинопатії та очного ангіогенезу, і де інгібітором шляху комплементу є антитіло або його зв'язувальний фрагмент, що специфічно зв'язується з фактором D, і що  
15 вводять за допомогою парентерального введення, введення в склоподібне тіло, субкон'юнктивального введення, інтрадермального введення, внутрішньом'язового введення, інтраперитонеального введення, внутрішньовенного введення, підшкірного введення, інтраназального введення, інтратекального введення, внутрішньошлуночкового введення, епідурального введення,  
20 інгаляції, за допомогою біосумісного або біорозкладаного імплантанта з уповільненим вивільненням або імплантації інфузійного насоса.

21. Спосіб за п. 1, де очну хворобу вибирають з групи, яка складається з дегенерації жовтої плями, діабетичної ретинопатії та очного ангіогенезу, і де інгібітором шляху комплементу є антитіло або його зв'язувальний фрагмент, що зв'язується з фактором D, і що вводять в око за  
25 допомогою розчину для очної примочки, очної мазі, очного щитка або розчину очних крапель.

22. Спосіб за п. 1, який додатково включає введення імуномодуючої сполуки, протизапальної сполуки, антиангіогенної сполуки або імунопригнічуючого компонента вказаному суб'єкту, де очну хворобу вибирають з групи, яка складається з дегенерації жовтої плями, діабетичної ретинопатії і очного ангіогенезу, де інгібітором шляху комплементу є антитіло або його  
30 зв'язувальний фрагмент, що зв'язується з фактором D.

23. Спосіб за п. 1, який додатково включає проведення суб'єкту антиангіогензивної терапії, націленої на судинний ендотеліальний фактор росту (VEGF), де очне захворювання вибирають з групи, яка складається з дегенерації жовтої плями, діабетичної ретинопатії та очного ангіогенезу, де інгібітором шляху комплементу є антитіло або його зв'язувальний фрагмент, що  
35 зв'язується з фактором D.

24. Спосіб за п. 1, який додатково включає введення суб'єкту стероїду, де очне захворювання вибирають з групи, що складається з дегенерації жовтої плями, діабетичної ретинопатії та очного ангіогенезу, де інгібітором шляху комплементу є антитіло або його зв'язувальний  
40 фрагмент, що зв'язується з фактором D.

25. Спосіб за будь-яким з пп. 1-24, де дозування інгібітору шляху комплементу, що вводиться суб'єкту, становить від 0,1 до 100 мг/кг.

---

Комп'ютерна верстка Д. Шеверун

---

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

---

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