



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 118949

(13) C2

(51) МПК

C07K 16/46 (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 37/08 (2006.01)

A61P 11/06 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО  
ЕКОНОМІЧНОГО  
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ  
УКРАЇНИ

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки: а 2013 10544  
(22) Дата подання заявки: 14.10.2008  
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 10.04.2019  
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 07291259.5, 61/037,128  
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 15.10.2007, 17.03.2008  
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: EP, US  
(41) Публікація відомостей про заявку: 25.03.2014, Бюл.№ 6  
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.04.2019, Бюл.№ 7  
(62) Номер та дата подання попередньої заявки, з якої виділено заявку, позначену кодом (21): а201005855, 14.10.2008

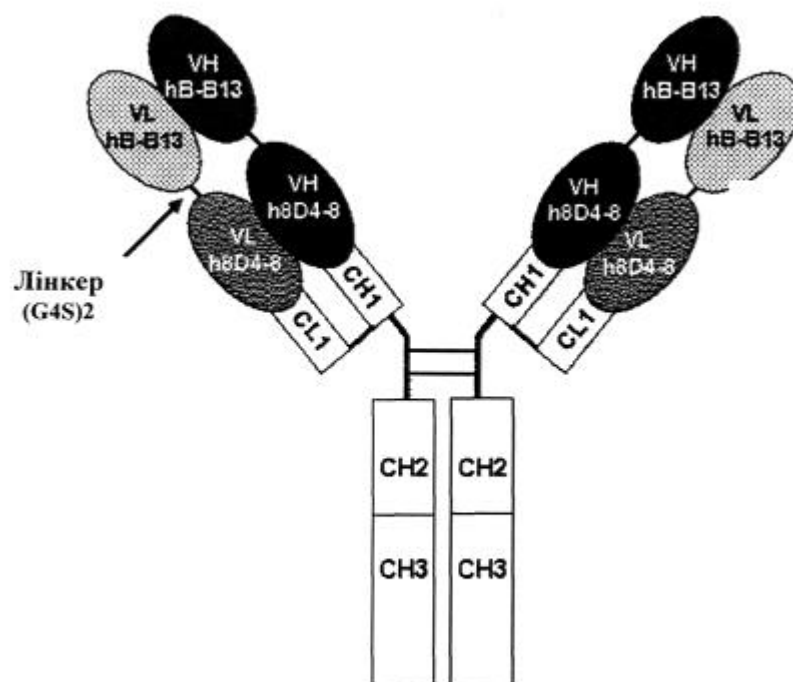
(72) Винахідник(и):  
Рао Ерколе (DE),  
Міколь Венсан (FR),  
Лі Даньсі (US),  
Круйп Йохен (DE),  
Девісон Меттью (US)  
(73) Власник(и):  
САНОФІ,  
54, Rue La Boetie, 75008 Paris, France (FR)  
(74) Представник:  
Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр.  
№115  
(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:  
US 5928904 A, 27.07.1999  
WO 2007085815 A, 02.08.2007  
US 5705154 A, 06.01.1998  
WO 2007107349 A, 27.09.2007  
GB 2403952 A, 19.01.2005  
WO 2007080174 A, 19.07.2007  
US 2006063228 A1, 23.03.2006  
US 2007071675 A1, 29.03.2007  
HART T.K. et al. Preclinical efficacy and safety of pascolizumab (SB 240683): A humanized anti-interleukin-4 antibody with therapeutic potential in asthma. Clinical and experimental immunology, Wiley-Blackwell publishing LTD, GB, 2002, Vol. 130, no. 1, P. 93 – 100

## (54) АНТИТІЛО, ЩО ЗВ'ЯЗУЄТЬСЯ З IL-4 І IL-13, І ЙОГО ЗАСТОСУВАННЯ

### (57) Реферат:

Винахід стосується антитіла, яке специфічно зв'язується з IL-4 і IL-13, фармацевтичної композиції, що містить таке антитіло, молекули нуклеїнової кислоти, вектора, клітини-хазяїна, та способу лікування IL-4 і/або IL-13 опосередкованого захворювання у ссавця.

UA 118949 C2



Винахід стосується нових антитіл анти-IL-4, антитіл анти-IL-13 і біспецифічних антитіл анти-IL-4/анти-IL-13 і до їх застосування для поліпшення стану, лікування або профілактики захворювань або розладів у ссавців, включаючи людину, викликаних аномальною активністю або аномальним метаболізмом IL-4 і (або) IL-13. Розглянуте антитіло може блокувати зв'язування і (або) передачу сигналу ліганду, наприклад IL-4 або IL-13, з рецептором або комплексом рецептора, наприклад IL-4R $\alpha$ , IL-4R $\alpha$ 1 і IL-4R $\alpha$ 2. Розкривається інформація про профілактичні, імунодіagnostичні і діагностичні препарати, що містять розглянуті антитіла, і їх застосування в межах методів профілактики або лікування таких захворювань ссавців, включаючи людину, що викликані аномальним метаболізмом і (або) активністю лімфоїдних і нелімфоїдних клітин, включаючи моноцити, фібробласти і ендотеліальні клітини. До таких захворювань належать аутоімунні хвороби, а також хвороби, викликані або такі, що характеризуються запальними процесами, наприклад алергічна астма і дерматит.

Інтерлейкін-4 (IL-4) є плейотропним цитокином, що має широкий спектр біологічних впливів на лімфоїдні В- і Т-клітини, а також багато нелімфоїдних клітин, у тому числі моноцити, ендотеліальні клітини і фібробласти. Наприклад, IL-4 стимулює проліферацію декількох ліній клітин, залежних від IL-2 і IL-3, індукуює експресію молекул II класу головного комплексу гістосумісності в дрімаючих В-клітинах і підсилює секрецію IgG4 і IgE В-клітинами людини. IL-4 пов'язаний з імунною відповіддю Th2-типу і продукується Th2-клітинами, а також стимулює їхню диференціацію. Передбачається, що IL-4 проявляється в ряді таких захворювань, як алергія й астма.

Нещодавно був ідентифікований цитокін IL-13 (Minty, A. et al., *Nature*, 1993, 362, 248-250, і McKenzie, A. N. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1993, 90, 3735-3739), що містить 112 амінокислот, що виділяється активованими Т-лімфоцитами, В-лімфоцитами, а також мастоцитами, після їх активації.

На підставі своїх різноманітних біологічних властивостей, подібних з IL-4, IL-13 був віднесений до IL-4-подібних цитокинів. Його функції, дійсно, схожі на функції IL-4 у відношенні В-клітин (Defrance, T. et al., *J. Exp. Med.*, 1994, 179, 135-143, Punnonen, J. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 1993, 90, 3730-3734, Fior, R. et al., *Eur. Cytokine Network*, 1994, 5, 593-600), моноцитів (Muzio, M. R. F. et al., *Blood*, 1994, 83, 1738-1743, De Waal Malefyt, R. et al., *J. Immunol.*, 1993, 151, 6370-6381, Doyle, A. et al., *Eur. J. Immunol.* 1994, 24, 1441-1445, Montaner, L. J. et al., *J. Exp. Med.*, 1993, 178, 743-747, Sozzani, P. et al., *J. Biol. Chem.*, 1995, 270, 5084-5088) і інших негематопоетичних клітин (Herbert, J. M. et al., *Febs Lett.*, 1993, 328, 268-270, і Derocq, J. M. et al., *Febs Lett.* 1994, 343, 32-36). З іншого боку, на відміну від IL-4 він не робить специфічного впливу на дрімаючі або активовані Т-клітини (Zurawski, G. et al., *Immunol. Today*, 1994, 15, 19-26).

Різні прояви біологічної активності IL-13 відносно моноцитів/макрофагів, В-лімфоцитів і визначених гематопоетичних попередників докладно описані в роботах A. J. Minty, а також в оглядах з IL-13. Крім того, ряд даних свідчить про те, що даний цитокін робить плейотропний ефект на клітини інших типів. До таких негематопоетичних клітин, на які IL-13 робить прямий вплив, належать ендотеліальні і мікрогліальні клітини, кератиноцити, а також клітини карциноми нирок і товстої кишки.

Один з етапів аналізу сигналу, переданого біологічною молекулою всередині клітини, передбачає ідентифікацію її мембранного рецептора. Дослідження, проведені в цих цілях для рецептора IL-13, показали, що IL-13 і IL-4 мають загальний рецептор або принаймні деякі з компонентів загального рецепторного комплексу, а також загальні елементи ланцюга передачі сигналу (Zurawski S. M. et al., *Embo Journal*, 1993, 12, 2663-2670, Aversa, G. et al., *J. Exp. Med.*, 1993, 178, 2213-2218, Vita, N. et al., *Biol. Chem.*, 1995, 270, 3512-3517, Lefort, S. et al., *Febs Lett.*, 1995, 366, 122-126). Даний рецептор присутній на поверхні різних видів клітин у різних кількостях залежно від розглянутого типу клітини. Порівняльний розподіл рецепторів IL-13 і IL-4 розглядалося в роботах A. J. Minty (*Interleukin-13 for Cytokines in Health and Disease*. Eds D. G. Remick and J. S. Frie, Marcel Decker, N.Y. 1996).

Рецептори клітинної поверхні і рецепторні комплекси зв'язують IL-4 і/або IL-13 з різною афінністю. До основних компонентів рецепторів і рецепторних комплексів, що зв'язують IL-4 і/або IL-13, належать IL-4R $\alpha$ , IL-4R $\alpha$ 1 і IL-4R $\alpha$ 2. Ці ланцюги експресуються на поверхні клітин як мономери або гетеродимери IL-4R $\alpha$ /IL-4R $\alpha$ 1 (II тип IL-4R) або IL-4R $\alpha$ / $\gamma$ c (I тип IL-4R). Мономер IL-4R $\alpha$  і гетеродимер IL-4R $\alpha$ / $\gamma$ c зв'язують IL-4, але не зв'язують IL-13. Мономери IL-4R $\alpha$ 1 і IL-4R $\alpha$ 2 зв'язують IL-13, але не зв'язують IL-4. Гетеродимер IL-4R $\alpha$ /IL-4R $\alpha$ 1 зв'язує і IL-4, і IL-13 (Murata et al., *Int. J. Hematol.*, 1999, 69, 13-20).

Імунні відповіді Th2-типу стимулюють продукцію антитіл і гуморальний імунітет і розвиваються для протидії позаклітинним патогенам. Клітини Th2 є медіаторами продукції Ig

(гуморальний імунітет) і продукують IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 і IL-13 (Tanaka, et, al., Cytokine Regulation of Humoral Immunity, 251-272, Snapper, ed., John Wiley and Sons, New York (1996)). Імунні відповіді Th2-типу характеризуються генерацією визначених цитокінів (наприклад IL-4, IL-13) і специфічних типів антитіл (IgE, IgG4) і типові для алергійних реакцій, результатом яких можуть стати сльозаві очі й астматичні симптоми, наприклад запалення дихальних шляхів і скорочення м'язових клітин дихальних шляхів у легенях.

І IL-4, і IL-13 є терапевтично важливими цитокінами, що визначається їх біологічними функціями, і відіграють важливу роль у багатьох захворюваннях, у тому числі при астмі (Curr Opin Allergy Clin Immunol 2005, Vol. 5, 161-166). Було показано, що IL-4 здатні інгібувати аутоімунні захворювання, і продемонстровано, що IL-4 і IL-13 мають потенціал підсилювати протипухлинну імунну відповідь. Оскільки обидва цитокіни задіяні в патогенезі алергійних захворювань, інгібітори таких цитокінів можуть мати позитивний терапевтичний ефект.

Тому існує потреба в удосконалених агентах, що інгібують IL-4, інгібують IL-13, а також агентах, що інгібують і IL-4, і IL-13.

У даному винаході пропонуються нові гуманізовані моноклональні і біспецифічні антитіла, а також їхні фрагменти і похідні, що специфічним чином зв'язуються з IL-4 і (або) IL-13. Деякі з моно- або біспецифічних антитіл анти-IL-4 і (або) IL-13 і їхні фрагменти можуть бути змінені, для того щоб перешкодити утворенню внутрішньоланцюжкового дисульфідного зв'язку, що призводить до утворення молекули, яка зберігає стабільність у процесі одержання і використання *in vivo*. Антитіла за даним винаходом нейтралізують активність IL-4 і (або) IL-13 у біологічних аналізах, що описані в даному документі.

Винахід включає амінокислотні послідовності варіабельного важкого і легкого ланцюга антитіла і відповідні їм послідовності нуклеїнових кислот.

Інший приклад здійснення даного винаходу включає клітинні лінії і вектори, що містять послідовності антитіла даного винаходу.

Ще один приклад здійснення даного винаходу припускає використання антитіла для приготування фармацевтичного препарату для лікування захворювань і порушень, пов'язаних з функцією і метаболізмом IL-4 і (або) IL-13. Зокрема, даний винахід належить до лікування раку, аутоімунних захворювань і хвороб, викликаних або таких, що характеризуються запальними процесами, наприклад алергійної астми і дерматиту.

Додаткові особливості і переваги описані в даному документі і будуть очевидні з наведеного нижче повного опису винаходу і фігур.

#### КОРОТКИЙ ОПИС ФІГУР

На Фіг. 1 представлено схематичне зображення молекули біспецифічного антитіла анти-IL-4/IL-13, що містить чотири поліпептидні ланцюги. Два більш легкі ланцюги містять N-VL<sub>hB-B13</sub>-лінкер-VL<sub>hD4-8</sub>-CL-C (CL, константна область легкого ланцюга), два більш важкі ланцюги містять N-VH<sub>hB-B13</sub>-лінкер-VH<sub>hD4-8</sub>-CH1-CH2-CH3-C. Лінкерна послідовність (G4S)<sub>2</sub> представлена GGGSGGGGS (SEQ ID NO:6).

На Фіг. 2 наводяться амінокислотні послідовності гуманізованих варіабельних доменів антитіла B-B13 анти-IL-13 (SEQ ID NO:1 і 2) і гуманізованих варіабельних доменів антитіла 8D4-8 анти-IL-4 (SEQ ID NO:3, 4 і 5). Підкресленням виділені внесені зміни в амінокислотну послідовність. Напівжирним шрифтом виділена CDR.

#### ДОКЛАДНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

Даний винахід не обмежується конкретною методологією, протоколами, клітинними лініями, векторами або реагентами, описаними в даному документі, оскільки їх можна змінювати, не торкаючись при цьому основної ідеї й охоплення винаходу. Далі, використовувана в даному документі термінологія призначена винятково для опису конкретних здійснень і не має на увазі обмеження сфери охоплення даного винаходу. Якщо не вказане інше, усі технічні і наукові терміни і скорочення, використовувані в даному документі, мають таке саме значення, що загальновідоме рядовим фахівцям у даній галузі, до якої належить даний винахід. Будь-які методи і матеріали, аналогічні або ідентичні описаним у даному документі, можуть використовуватися в практичному застосуванні даного винаходу, і нижче наводиться опис тільки прикладів методів, пристроїв і матеріалів.

Усі публікації і патенти, що згадуються в даному документі, включаються в даний документ у силу посилання на них для цілей опису і розкриття білків, що наводяться в ньому, ферментів, векторів, клітин-хазяїнів і методологій, що можуть використовуватися в поєднанні з даним винаходом і в ньому. Разом з тим, ніякі положення даного документа не слід тлумачити як визнання того, що даний винахід не має права на більш ранній пріоритет на підставі попереднього винаходу.

Перед описом формулювань і додатків способів, пов'язаних з IL-4 і (або) IL-13, і розглянутих продуктів для відома фахівців нижче наводяться визначення деяких термінів і словосполучень.

Термін "інтерлейкін-4" (IL-4) належить до існуючого в природі або ендогенних білків ссавців IL-4, а також до білків, що мають амінокислотну послідовність, яка співпадає з існуючим у природі або відповідним ендогенним білком ссавців IL-4 (наприклад рекомбінантні білки, синтетичні білки (тобто отримані з використанням методів синтетичної органічної хімії)). Відповідно, як вказано в даному документі, термін включає зрілий білок IL-4, поліморфні або алельні варіанти, а також інші ізоформи IL-4 і модифіковані або немодифіковані форми згаданого вище (наприклад ліпідні, глікозиловані). Існуючі в природі або ендогенні IL-4 включають зрілі білки, наприклад нативний IL-4, поліморфні або алельні варіанти, а також інші ізоформи і мутантні форми, що присутні в природних умовах в організмі ссавців (наприклад, людини, нелюдиноподібні примати). Такі білки можуть витягатися або виділятися з джерела, що у природних умовах продукує, наприклад, IL-4. Такі білки і білки, що мають амінокислотну послідовність, що співпадає з існуючим у природі або відповідним ендогенним IL-4, визначають за назвою відповідного ссавця. Наприклад, якщо відповідним ссавцем є людина, білок позначають як IL-4 людини. Фахівцям у даній галузі відомі кілька мутантних білків IL-4, наприклад, описаних у заявці WO 03/038041.

Термін "інтерлейкін-13" (IL-13) належить до існуючого в природі або ендогенних білків ссавців IL-13, а також до білків, що мають амінокислотну послідовність, що співпадає з існуючим у природі або відповідним ендогенним білком ссавців IL-13 (наприклад, рекомбінантні білки, синтетичні білки (тобто отримані з використанням методів синтетичної органічної хімії)). Відповідно, як визначено в даному документі, термін включає зрілий білок IL-13, поліморфні або алельні варіанти, а також інші ізоформи IL-13 (наприклад, отримані методом альтернативного сплайсинга або за допомогою інших клітинних процесів) і модифіковані або немодифіковані форми згаданого вище (наприклад, ліпідні, глікозиловані). Існуючі в природі або ендогенні IL-13 включають зрілі білки, наприклад зрілий IL-13, поліморфні або алельні варіанти, а також інші ізоформи і мутантні форми, що присутні в природних умовах в організмі ссавців (наприклад людина, нелюдиноподібні примати). Наприклад, використовуваний тут IL-13 включає варіант IL-13 людини, в якому Arg у позиції 110 зрілого IL-13 людини заміщується на Gin (позиція 110 зрілого IL-13 відповідає позиції 130 білка попередника), що асоціюється з астмою (атопічною і неатопічною астмою) і іншими варіантами IL-13. (Heinzmann et al, Hum Mo Genet. 9:549-559 (2000).) Такі білки можуть виділятися або виділятися з джерела, що у природних умовах продукує, наприклад, IL-13. Такі білки і білки, які мають амінокислотну послідовність, що співпадає з існуючим у природі або відповідним ендогенним IL-13, визначають за назвою відповідного ссавця. Наприклад, якщо відповідним ссавцем є людина, білок позначають як IL-13 людини. Фахівцям у даній галузі відомі кілька мутантних білків IL-13, наприклад, описаних у заявці WO 03/035847.

Термін "власне кажучи ідентичні" відносно послідовності поліпептидного ланцюга антитіла може інтерпретуватися як ідентичність принаймні на 70 %, 80 %, 90 %, 95 % або більше послідовності ланцюга антитіла і поліпептидної послідовності, що зіставляється. Той самий термін відносно послідовності нуклеїнової кислоти може інтерпретуватися як послідовність нуклеотидів, що виявляє ідентичність принаймні на 85 %, 90 %, 95 %, 97 % або більше послідовності відносно послідовності, що зіставляється, нуклеїнової кислоти.

Терміни "ідентичність" або "гомологія" можуть означати відсоток основ нуклеотидів або амінокислотних залишків у послідовності кандидата, що ідентичні залишку відповідної послідовності, з яким вона порівнюється, після зіставлення послідовностей і введення пропусків, якщо необхідно, для забезпечення максимального відсотка ідентичності по всій послідовності і без урахування будь-яких консервативних заміщень у межах ідентичності послідовності. Ні N-кінцеві або C-кінцеві подовжувальні сегменти, ні вставки не слід розглядати як такі, що зменшують ідентичність або гомологію. Методи і комп'ютерні програми для зіставлення доступні і відомі фахівцям у даній галузі. Ідентичність послідовності може оцінюватися за допомогою програмного забезпечення для аналізу послідовностей.

Словосполучення і терміни "функціональний фрагмент, варіант, похідне або аналог" і їм подібні, а також їхні форми, застосовувані у відношенні антитіла або антигену, описують сполуку або молекулу, що має якісну біологічну активність, властиву розглянутому антитілу або повнорозмірному антигену. Наприклад, функціональний фрагмент або аналог антитіла анти-IL-4 може зв'язуватися з молекулою IL-4 або з молекулою, що може перешкоджати або суттєво знижувати здатність ліганду або агоніста чи антагоністичного антитіла, зв'язуватися з IL-4.

"Субституційними" варіантами називають такі, де принаймні один амінокислотний залишок у нативній послідовності вилучений і замінений іншою амінокислотою, введеною на його місце в

тому ж положенні. Заміщення можуть бути одиночними, при яких замінюється тільки одна амінокислота в молекулі, або множинними, якщо в одній і тій самій молекулі замінюються дві або більше амінокислоти. Множинні заміщення можуть проводитися в послідовних сайтах. Крім того, одна амінокислота може замінюватися декількома залишками, такий варіант містить як заміщення, так і вставки. "Інсерційними" варіантами називають такі, де одна або декілька амінокислот були введені таким чином, що виявилися безпосередньо сусідніми з тією або іншою амінокислотою в конкретному положенні нативної послідовності. Під безпосередньо сусідньою з тією або іншою амінокислотою розуміється амінокислота, зв'язана з  $\alpha$ -карбоксильною або  $\alpha$ -амінною функціональною групою амінокислоти. "Делеційними" варіантами називають такі, де вилучена одна або декілька амінокислот з нативної амінокислотної послідовності. Зазвичай в делеційних варіантах видаляють одну або дві амінокислоти в конкретній області молекули.

Термін "антитіло" використовується в найбільш широкому змісті і, зокрема, включає моноклональні антитіла (включаючи повнорозмірні моноклональні антитіла), поліклональні антитіла, мультиспецифічні антитіла (наприклад, біспецифічні антитіла), фрагменти антитіл або синтетичні поліпептиди, що містять одну або більше послідовностей CDR або похідних від CDR, за умови, що поліпептиди виявляють бажану біологічну активність. Антитіла (Ab) і імуноглобуліни (Ig) належать до глікопротеїнів, що має однакові структурні особливості. Як правило, антитіла розглядають як Ig з визначеною або розпізнаваною специфічністю. Таким чином, антитіла виявляють специфічність зв'язування з конкретною мішенню, тоді як до імуноглобулінів належать і антитіла, і інші подібні до антитіл молекули, що не мають специфічності до мішені. Антитіла за даним винаходом можуть належати до будь-якого класу (наприклад, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA і т.п.) або підкласу (наприклад, IgG<sub>b</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub>, IgA<sub>2</sub> і т.п.) (терміни "тип" і "клас", а також "підтип" і "підклас" рівнозначно використовуються у даному документі). Нативні або немутантні, тобто отримані від представника популяції без штучних маніпуляцій антитіла й імуноглобуліни зазвичай являють собою гетеротетрамерні глікопротеїни з молекулярною вагою приблизно 150000 дальтон, що складаються з двох однакових легких ланцюгів (L) і двох однакових важких ланцюгів (H). Кожен важкий ланцюг має на кінці варіабельний домен (V<sub>H</sub>), за яким іде декілька константних доменів. Кожен легкий ланцюг має на кінці варіабельний домен (V<sub>L</sub>), а на іншому кінці - константний домен. Під виразом "без штучних маніпуляцій" розуміють відсутність обробки, після якого елементи містять або експресують чужорідну антигензв'язувальну молекулу. Визначення "нативний" може належати до найбільш переважної алелі або видів, що реєструються у популяції, або до антитіла, отриманого від тварини без маніпуляцій, у зіставленні з алеллю або поліморфізмом, або варіантом, або похідним, отриманим за рахунок тієї або іншої форми маніпуляцій, наприклад мутагенезу, застосування рекомбінантних методик і т.п. для зміни амінокислоти антигензв'язувальної молекули.

Використовуваний у даному документі термін "антитіло анти-IL-4" означає антитіло або поліпептид, отриманий від нього (похідне), що специфічно зв'язується з IL-4 відповідно до визначення даного документа, у тому числі, серед інших, молекули, що інгібують або суттєво знижують рівень зв'язування IL-4 з його рецептором або інгібують активність IL-4.

Використовуваний у даному документі термін "антитіло анти-IL-13" означає антитіло або поліпептид, отриманий від нього (похідне), що специфічно зв'язується з IL-13 відповідно до визначення даного документа, у тому числі, серед інших, молекули, що інгібують або суттєво знижують рівень зв'язування IL-13 з його рецептором або інгібують активність IL-13.

Термін "варіабельний" у контексті варіабельного домену антитіл належить до визначених частин відповідної молекули, що значною мірою відрізняються своєю послідовністю від антитіл і використовуються для специфічного розпізнавання і зв'язування конкретного антитіла з його визначеною мішенню. При цьому варіабельність нерівномірно розподіляється за варіабельними доменами антитіл. Варіабельність зосереджується в трьох сегментах, що називаються визначаючими комплементарними областями (CDR; тобто CDR1, CDR2 і CDR3), також відомими як гіперваріабельні ділянки, що знаходяться у варіабельних доменах як легкого, так і важкого ланцюга. Області варіабельних доменів з більш високими рівнями збереження називають остовними областями (FR) або послідовностями. Варіабельні домени нативних важких і легких ланцюгів містять по чотирьох області FR, значною мірою мають конформацію  $\beta$ -листа і зв'язані трьома CDR, що утворюють петлі, які з'єднують, а в деяких випадках і утворюють, частину структури  $\beta$ -листа. CDR у кожному ланцюзі часто містяться поблизу один від одного областями FR, і разом з CDR іншого ланцюга сприяють формуванню шуканого (епітопа або детермінанта) сайту зв'язування антитіл (див. Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institute of Health, Bethesda, MD (1987)). Якщо не вказано інакше,

використовувана в даному документі нумерація амінокислотних залишків імуноглобуліну виробляється відповідно до системи нумерації амінокислотних залишків імуноглобуліну з роботи Kabat et al. Одна CDR може мати здатність специфічно зв'язувати когнатний епітоп.

5 Термін "шарнір", або "шарнірна область", використовуваний у даному винаході, належить до гнучкого поліпептиду, що містить амінокислоти між першим і другим константними доменами антитіла.

Визначення "фрагмент антитіла" належить до частини інтактного або повного ланцюга або антитіла, як правило, області зв'язування мішені або варіабельної області. До прикладів фрагментів антитіла, серед інших, належать фрагменти  $F_{ab}$ ,  $F_{ab'}$ ,  $F_{(ab')_2}$  і  $F_v$ . "Функціональним фрагментом" або "аналогом антитіла анти-IL-4 і (або) IL-13" називають такий фрагмент, що може перешкоджати здатності рецептора, або суттєво знижувати таку здатність, зв'язуватися з лігандом або ініціювати сигнал. Використовуваний у даному документі термін "функціональний фрагмент" є синонімом терміна "фрагмент антитіла" і при вживанні у відношенні антитіл може належати до таких фрагментів, як  $F_v$ ,  $F_{ab}$ ,  $F_{(ab')_2}$  і т.п., що здатні перешкоджати здатності рецептора, або суттєво знижувати таку здатність, зв'язуватися з лігандом або ініціювати сигнал. Фрагмент " $F_v$ " складається з димеру варіабельного домену з одним важким і одним легким ланцюгом, утвореного за допомогою нековалентної асоціації (димер  $V_H-V_L$ ). У такій конфігурації три CDR кожного варіабельного домену взаємодіють, формуючи шуканий сайт зв'язування на поверхні димеру  $V_H-V_L$ , так само як в інтактному антитілі. У сукупності такі шість CDR забезпечують специфічність зв'язування мішені на інтактному антитілі. При цьому навіть одиничний варіабельний домен (або половина  $F_v$ , що містить всього три CDR, специфічні до мішені) може мати здатність розпізнавати і зв'язувати мішень.

20 "Одноланцюжкові  $F_v$ ", фрагменти антитіл " $sF_v$ " або " $scAb$ " включають домени антитіла  $V_H$  і  $V_L$ , причому ці домени присутні в єдиному поліпептидному ланцюзі. Як правило, поліпептид  $F_v$  додатково містить поліпептидний лінкер, часто гнучку молекулу, між доменами  $V_H-V_L$ , що дозволяє  $sF_v$  утворити потрібну структуру для зв'язування мішені.

25 Термін "діатіла" належить до фрагментів антитіл із двома антигензв'язувальними сайтами, якісь фрагменти можуть включати варіабельний домен важкого ланцюга ( $V_H$ ), зв'язаний з варіабельним доменом легкого ланцюга ( $V_L$ ) у тому ж поліпептидному ланцюзі. За рахунок використання лінкера, що занадто короткий, щоб забезпечувати об'єднання двох варіабельних доменів одного і того ж ланцюга, домени діатіл змушені поєднуватися з доменами зв'язування іншого ланцюга для формування двох антигензв'язуючих сайтів.

Фрагмент  $F_{ab}$  містить варіабельні і константні домени легкого ланцюга і варіабельний і перший константний домен ( $C_{H1}$ ) важкого ланцюга. Фрагменти  $F_{ab}$  відрізняються від фрагментів  $F_{ab}$  додаванням декількох залишків у карбоксильному кінцевому закінченні домену  $C_{H1}$ , так щоб він містив один або декілька цистеїнів із шарнірної області антитіла. Фрагменти  $F_{ab}$  можуть бути отримані розщепленням дисульфідного зв'язку в цистеїнах шарнірної області продукту руйнування пепсином  $F_{(ab)_2}$ . Додаткова ферментативна і хімічна обробка антитіл може призводити до утворення інших функціональних фрагментів, що представляють інтерес.

40 Термін "лінійний Fab" належить до чотиривалентного антитіла, відповідно до опису в Miller et al. (2003), J Immunol. 170: 4854-4861. "Лінійний Fab" складається з тандема однакових доменів  $C_{H1}-V_H$ , з'єднаних однаковим легким ланцюгом у кожному положенні  $C_{H1}-V_H$ . Подібні молекули створювалися для того, щоб підвищити валентність антитіла з метою поліпшення його функціональної афінності за рахунок ефекту авідності, але вони є моноспецифічними.

45 Термін "біспецифічні антитіла ( $BsAb$ )" належить до молекул, що поєднують антигензв'язувальні сайти двох антитіл в одній молекулі. Так, біспецифічне антитіло здатне зв'язувати два різні антигени одночасно. Крім діагностичних додатків,  $BsAb$  відкривають дорогу новим терапевтичним застосуванням за рахунок переорієнтації потужної ефекторної системи на уражені хворобою області або за рахунок підвищення нейтралізуючої або стимулюючої функції антитіл.

У ході перших спроб сполучення специфічності зв'язування двох повних антитіл проти різних антигенів-мішеней у лікувальних цілях використовувалися хімічно злиті гетерокон'юговані молекули (Staerz et al. (1985), Nature 314: 628-631).

55 Біспецифічні антитіла продукувалися з вихідних гібридом за допомогою гетерогібридомних методик, і in vitro були продемонстровані властивості, подібні до тих, що спостерігаються для гетерокон'югатів (Milstein & Cuellar (1983) Nature 305:537-540).

Незважаючи на багатообіцяючі результати, отримані за допомогою гетерокон'югатів або біспецифічних антитіл, продукованих у результаті, як згадувалося вище, злиття клітин, ряд факторів робить їх непридатними для широкомасштабних терапевтичних додатків. До таких факторів належать: швидке виведення гетерокон'югатів in vivo, трудомісткі методики, необхідні

для одержання кожної з форм молекули, потреба в ретельному очищенні гетерокон'югатів від гомокон'югатів або моноспецифічних антитіл і характерні низькі виходи.

Генна інженерія всі частіше використовувалася для конструювання, модифікації і продукції антитіл або похідних антитіл з бажаним набором властивостей зв'язування і ефекторних функцій.

Була розроблена множина рекомбінантних методик для ефективної продукції BsAb, в обох випадках як фрагментів антитіла (Carter et al. (1995), *J. Hematotherapy* 4:463-470; Pluckthun et al. (1997) *Immunotechnology* 3:83-105; Todorovska et al. (2001) *J. Immunol. Methods* 248:47-66) і повнорозмірні формати IgG (Carter (2001) *J. Immunol. Methods* 248: 7-15).

Об'єднання двох різних scFv призводить до форматів BsAb з мінімальною молекулярною масою, що називають sc-BsAb або Ta-scFv (Mack et al. (1995), *Proc. Acad. Sci. USA*. 92:7021-7025; Mallender et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269:199-206). BsAb конструювалися за допомогою генетичного злиття двох scFv за рахунок забезпечуючої димеризацію функціональності, наприклад лейцинової застібки (Kostelny et al. (1992) *J. Immunol.* 148:1547-53; de Kruif et al. (1996) *J. Biol. Chem.* 271:7630-4).

Як згадувалося вище, діатілами називають невеликі фрагменти бівалентних і біспецифічних антитіл. Фрагменти включають VH, зв'язаний з VL одного і того ж поліпептидного ланцюга за рахунок лінкера, що має занадто малу довжину (менше 12 амінокислот), щоб забезпечувати можливість зв'язування між двома доменами на одному і тому ж ланцюзі. Домени змушені міжмолекулярно поєднуватися з комплементарними доменами іншого ланцюга для формування двох антигензв'язувальних сайтів. Такі димерні фрагменти антитіл, або "діатіла", є бівалентними і біспецифічними. (Holliger et al. (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90: 6444-6448). Діатіла мають розмір, близький до фрагмента Fab. Поліпептидні ланцюги доменів VH і VL, зв'язані лінкером між 3 і 12 амінокислотами, утворюють в основному димери (діатіла), тоді як у випадку лінкера між 0 і 2 амінокислотними залишками переважними виявляються тримери (триатіла) і тетрамери (тетратіла). Крім довжини лінкера, точна модель олігомеризації очевидно залежить від сполуки, а також від орієнтації V-доменів (Hudson et al. (1999), *J Immunol Methods* 231: 177-189). Передбачуваність кінцевої структури молекул діатіл винятково низька.

Незважаючи на те, що sc-BsAb і конструкції на основі діатіл мають цікавий клінічний потенціал, було показано, що такі нековалентно асоційовані молекули недостатньо стабільні у фізіологічних умовах. Загальна стабільність фрагмента scFv залежить від внутрішньої стабільності доменів VL і VH, а також від стабільності доменного інтерфейсу. Недостатня стабільність інтерфейсу VH-VL фрагментів scFv часто вказувалася серед основних причин необоротної інактивації scFv, оскільки проміжне розкриття інтерфейсу, що допускає пептидний лінкер, відкриває доступ до гідрофобних ділянок, що сприяють агрегуванню, а тому визначає нестабільність і низький вихід продукції (Worn and Pluckthun (2001), *J. Mol. Biol.* 305:989-1010).

Альтернативний метод приготування біспецифічних бівалентних антигензв'язувальних білків з доменів VH і VL наводиться в патенті US 5989830. Такі фрагменти антитіла з двома голівками одержують експресією двоцистронного вектора, що кодує два поліпептидні ланцюги, причому один поліпептидний ланцюг двічі містить VH у послідовності з пептидним лінкером (VH1-лінкер-VH2), а інший поліпептидний ланцюг містить комплементарні домени VL, з'єднані в послідовність пептидним лінкером (VL1-лінкер-VL2). У патенті US 5989830 було показано, що лінкер повинен складатися принаймні з 10 амінокислотних залишків.

Полівалентні білкові комплекси (PPC) зі зростаючою валентністю описані в патенті US 2005/0003403 A1. PPC містять два поліпептидні ланцюги, що зазвичай розташовуються латерально по відношенню один до одного. Кожен поліпептидний ланцюг зазвичай включає 3 або 4 "v-області", що містять амінокислотні послідовності, які здатні утворити сайт зв'язування антигену при зіставленні з відповідною v-областю на протилежному поліпептидному ланцюзі. На кожному поліпептидному ланцюзі може бути задіяно до приблизно 6 "v-областей". V-області кожного поліпептидного ланцюга зв'язані лінійно одна з одною і можуть з'єднуватися лінкерними областями, що перемешуються. При організації у формі PPC v-області на кожному поліпептидному ланцюзі утворюють індивідуальні сайти зв'язування антигену. Комплекс може містити одну або декілька зв'язуючих специфічностей.

Разом з тим при використанні таких молекул була продемонстрована схильність до агрегування, нестабільність і низький вихід експресії (Wu et al. (2001) *Prot. Eng.* 14: 1025-1033). Усі ці характерні проблеми стабільності, що можуть спостерігатися при експресії одноланцюжкових антитіл. (Worn and Pluckthun (2001), *J. Mol. Biol.* 305: 989-1010).

Тому задачею даного винаходу є одержання біспецифічного полівалентного антитіла, за допомогою якого можна уникнути утворення агрегатів. Крім того, воно повинне мати стабільність, що визначає його придатність для використання в лікувальних цілях.



Використовуваний у даному документі термін "моноклональне антитіло" належить до антитіла, отриманого з популяції значною мірою однорідних антитіл, тобто окремі антитіла, що утворюють популяцію, ідентичні, якщо не враховувати можливі природні мутації, що можуть бути присутніми у незначних кількостях.

У даному випадку до моноклональних антитіл, зокрема, належать "химерні" антитіла, в яких частина важкого і (або) легкого ланцюга ідентична або гомологічна відповідним послідовностям в антитілах, отриманим від конкретних видів або приналежних до визначеного класу або підкласу (типу або підтипу) антитіл, при цьому інший ланцюг (ланцюги) ідентичний або гомологічний відповідним послідовностям в антитілах, отриманих від інших видів або приналежних іншому класу або підкласу антитіл, а також фрагменти таких антитіл, за умови що вони виявляють бажану біологічну активність при зв'язуванні з IL-4 і (або) IL-13 або впливі на активність або метаболізм IL-4 і (або) IL-13 (патент США № 4816567; і Morrison et al., Proc Natl Acad Sci USA 81:6851 (1984)). Тому CDR одного класу антитіл можуть бути введені в FR антитіла іншого класу або підкласу.

Моноклональні антитіла мають високу специфічність, вони орієнтовані на єдиний сайт-мишень, епітоп або детермінант. Крім того, на відміну від звичайних (поліклональних) препаратів антитіл, що, як правило, містять різні антитіла, орієнтовані проти різних детермінантів (епітопів) антигену, кожне моноклональне антитіло спрямоване проти єдиного детермінанта в мішені. На додаток до специфічності, перевага моноклональних антитіл полягає в тому, що вони продукуються клітиною-хазяїном без домішок інших імуноглобулінів, що забезпечує клонування відповідного гена і мРНК, що кодує антитіло його ланцюгів. Модифікатор "моноклональне" вказує на характеристики антитіла, що було отримане зі значною мірою однорідної популяції антитіл, і не повинний інтерпретуватися як потребуючий продукції антитіла будь-яким конкретним методом. Наприклад, моноклональні антитіла для використання в даному винаході можуть бути виділені з фаг-бібліотеки антитіл за допомогою добре відомих методик або ж можуть виділятися з поліклонального препарату. Вихідні моноклональні антитіла для використання відповідно до даного винаходу можуть бути приготовлені за допомогою гібридомного методу, описаного в Kohler et al., Nature 256:495 (1975), або можуть бути отримані рекомбінантними методами, що добре відомі фахівцям у даній галузі.

Термін "полівалентне антитіло", використовуваний у даному винаході, належить до антитіла, що містить два і більше сайтів зв'язування антигену, і тому здатне одночасно зв'язувати два або більше антигени, що мають однакову або різну структуру. Термін "бівалентне" означає, що антитіло містить два антигензв'язувальні сайти. Термін "тетравалентне" означає, що антитіло містить чотири антигензв'язувальні сайти.

Термін "антигензв'язувальний сайт", що використовується в даному винаході, належить до частини антитіла, що містить область, яка специфічно зв'язує частину антигену або повний антиген і комплементарну частину антигену або повному антигену. У випадку великого за величиною антигену антитіло може зв'язуватися лише з визначеною його частиною, і таку частину називають епітопом. Антигензв'язувальний домен може забезпечуватися одним або декількома варіабельними доменами антитіла. Переважно, щоб антигензв'язувальний домен був утворений за рахунок зв'язування варіабельного домену легкого ланцюга антитіла (VL) і варіабельного домену важкого ланцюга антитіла (VH).

Використовуваний у даному винаході термін "антиген" належить до молекули або частини молекули, що здатні зв'язуватися з антитілами даного винаходу. Антиген може містити один або декілька епітопів. До прикладів антигенів, розпізнаваних антитілами даного винаходу, серед інших, належать білки сироватки, наприклад цитокіни, такі як IL-4, IL-5, IL-9 і IL-13, біологічно активні пептиди, молекули клітинної поверхні, наприклад рецептори, переносники, іонні канали, вірусні і бактеріальні білки.

Використовуваний у даному винаході термін "моноспецифічний" означає, що полівалентне антитіло даного винаходу розпізнає тільки один антиген, причому всі антигензв'язувальні сайти є ідентичними.

Використовуваний у даному винаході термін "біспецифічний" означає, що полівалентне антитіло даного винаходу розпізнає два різні епітопи на тому самому антигені або двох різних антигенах.

Використовуваний у даному винаході термін "мультиспецифічний" означає, що полівалентне антитіло даного винаходу розпізнає множину різних епітопів на тому самому антигені або множині різних антигенів.

Використовуваний у даному винаході термін "лінкер" означає пептид, пристосований для сполучення варіабельних доменів конструкцій антитіл даного винаходу. Пептидний лінкер може містити будь-які амінокислоти, при цьому перевага віддається амінокислотам гліцину (G) і

серину (S). Лінкери, що з'єднують поліпептид важкого ланцюга і поліпептид легкого ланцюга і всередині цих ланцюгів, можуть бути однаковими або відрізнятися один від одного. Крім того, лінкер може мати довжину 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 або 20 амінокислот. Переважним пептидним лінкером для доменів важкого ланцюга, а також для доменів легкого ланцюга є GGGGS. Кількість лінкерних одиниць у важкому ланцюзі й у легкому ланцюзі може бути однаковою (симетричний порядок) або відрізнятися одна від одної (асиметричний порядок).

Пептидний лінкер переважно є достатньо довгим, щоб забезпечувати належний ступінь гнучкості, що виключає вплив функціональних областей антитіла на активність один одного, наприклад, через стеричні ускладнення, щоб давати можливість для належного згортання білка, а також, за необхідності, дозволяти молекулам антитіла взаємодіяти з двома або більше, можливо, просторово вилученими один від одного рецепторами на поверхні однієї і тієї ж клітини; разом з тим, він повинен переважно бути достатньо коротким, щоб гарантувати стабільність функціональних областей антитіла всередині клітини.

Тому довжина, сполука і/або конформація пептидних лінкерів може з легкістю варіюватися фахівцями в даній галузі, для того щоб оптимізувати бажані властивості полівалентного антитіла.

У порівнянні з антитілом людини "гуманізовані" форми нелюдських (наприклад, мишачих) антитіл являють собою химерні імуноглобуліни, ланцюги імуноглобулінів або їхні фрагменти (наприклад,  $F_v$ ,  $F_{ab}$ ,  $F_{ab'}$ ,  $F_{(ab)2}$  або інших зв'язуючих мішень підпоследовностей антитіл), що містять последовності, похідні від нелюдського імуноглобуліну. Як правило, гуманізоване антитіло буде включати власне кажучи всю последовність одного, а зазвичай двох варіабельних доменів, в яких всі або власне кажучи всі області CDR відповідають областям нелюдського імуноглобуліну, і всі або власне кажучи всі області FR являють собою матричну последовність імуноглобуліну людини. Гуманізоване антитіло може також включати принаймні частину константної області імуноглобуліну ( $F_c$ ), як правило, вибраної матричної последовності імуноглобуліну людини. Як правило, основною метою є одержання молекули антитіла, що мінімально імуногенна для людини. Тому існує можливість також замінити одну або декілька амінокислот в одній або декількох CDR на такі, які будуть менш імуногенні для організму-хазяїна людини, суттєво не знижуючи специфічну функцію зв'язування однієї або декількох CDR з IL-4 і (або) IL-13. Як альтернативу можна використовувати нелюдську FR, але в ній найбільш імуногенні амінокислоти замінюються на менш імуногенні. Разом з тим вбудовування, що вище обговорювалося, у CDR не є єдиним методом одержання гуманізованого антитіла. Наприклад, модифікації одних тільки областей CDR може бути недостатньо, оскільки досить часто основні залишки можуть відігравати важливу роль у визначенні тримірної структури петель CDR і загальної афінності антитіла до свого ліганду. Тому можуть застосовуватися будь-які способи модифікації молекули нелюдського вихідного антитіла, так щоб бути менш імуногенною для людини, і повна ідентичність з антитілом людини не завжди є обов'язковою. Отже, гуманізація може також досягатися, наприклад, простим заміщенням усього лише декількох залишків, зокрема, тих, які знаходяться на поверхні молекули антитіла і не сховані всередині її структури, а тому не є легко доступними для імунної системи хазяїна. Подібний спосіб запропонований у даному документі у відношенні заміщення "мобільних" або "гнучких" залишків молекули антитіла, при цьому мета полягає в тім, щоб зменшити або пригнітити імуногенність молекули, що виходить, не впливаючи на специфічність антитіла у відношенні епітопа або детермінанта. Див., наприклад, Studnicka et al., Prot Eng 7(6):805-814, 1994; Mol Imm 44:1986-1988, 2007; Sims et al., J Immunol 151:2296 (1993); Chothia et al., J Mol Biol 196:901 (1987); Carter et al., Proc Natl Acad Sci USA 89:4285 (1992); Presta et al., J Immunol 151:2623 (1993), WO 2006/042333 і патент США №5869619.

Пропонований спосіб гуманізації заснований на впливі гнучкості молекули антитіла в процесі і у момент імунного розпізнавання. Гнучкість білка пов'язана з молекулярним рухом його молекули. Під гнучкістю білка розуміють здатність усього білка, частини білка або окремо взятого амінокислотного залишку формувати ансамбль конформацій, що значною мірою відрізняються один від одного. Дані про гнучкість білка можна одержати за результатами експериментів рентгенівської кристалографії (див., наприклад, Kundu et al. 2002, Biophys J 83:723-732.), ядерного магнітного резонансу (див., наприклад, Freedberg et al., J Am Chem Soc 1998, 120(31):7916-7923) або за результатами моделювання молекулярної динаміки (MD). Моделювання MD білка проводиться на комп'ютері і дозволяє виявити рухи всіх атомів білка за визначений період часу за допомогою розрахунку фізичних взаємодій атомів один з одним. Результатом моделювання MD є траєкторія для досліджуваного білка за період часу моделювання. Траєкторія являє собою ансамбль конформацій білка, також називаний

статичними конфігураціями, що періодично реєструються за час моделювання, наприклад кожен пікосекунду (псек). Саме за допомогою аналізу ансамблю статичних конфігурацій можна визначити гнучкість амінокислотних залишків білка. Тому гнучким залишком вважається такий, який може мати ансамбль різних конформацій у структурі поліпептиду, де такий залишок знаходиться. Методи MD відомі фахівцям у даній галузі, див., наприклад, Brooks et al. "Proteins: A Theoretical Perspective of Dynamics, Structure and Thermodynamics" (Wiley, New York, 1988). Деякі програмні продукти дозволяють проводити моделювання MD, у тому числі Amber (див. Case et al. (2005) J Comp Chem 26:1668-1688), Charmm (див. Brooks et al. (1983) J Comp Chem 4:187-217; i MacKerell et al. (1998) у "The Encyclopedia of Computational Chemistry" vol. 1:271-177, Schleyer et al., eds. Chichester: John Wiley & Sons) або Impact (див. Rizzo et al. J Am Chem Soc; 2000; 122(51):12898-12900.)

Більшість комплексів білків має порівняно протяжні і планарні сховані поверхні, і було показано, що гнучкість партнерів, які зв'язуються, забезпечує основу для їх пластичності, що дозволяє їм конформаційно адаптуватися один до одного (Structure (2000) 8, R137-R142). Відповідно, було показано, що приклади "індукованої відповідності" відіграють домінуючу роль у взаємодії білок-білок. Крім того, існує постійно поповнювана сукупність даних, які показують, що білки насправді зв'язують ліганди різних форм, розмірів і структури (Protein Science (2002) 11:184-187) і що конформаційне різноманіття, мабуть, є суттєвою складовою здатності розпізнавати різних партнерів (Science (2003) 299, 1362-1367). Гнучкі залишки беруть участь у зв'язуванні партнерів у парі білок-білок (Structure (2006) 14, 683-693).

Гнучкі залишки можуть приймати самі різні конформації, що формують ансамбль областей взаємодії, що, швидше за все, будуть розпізнаватися В-клітинами пам'яті і викликати імунітетну відповідь. Таким чином, антитіла можуть бути гуманізовані за допомогою модифікації ряду залишків основної послідовності, так щоб ансамбль конформацій і доступних областей розпізнавання в модифікованому антитілі як можна більше походив на існуючі в антитілі людини.

Це може досягатися модифікацією обмеженої кількості залишків за допомогою: (1) побудови моделі гомології вихідного моноклонального антитіла (mAb) і проведення молекулярно-динамічного моделювання (MD); (2) аналізу гнучких залишків і ідентифікації найбільш гнучких залишків у молекулі нелюдського антитіла, а також виявлення залишків або мотивів, що, швидше за все, будуть джерелом гетерогенності або реакції розпаду; (3) ідентифікації антитіла людини, що демонструє наявність найбільш схожого ансамблю зон розпізнавання, як вихідного антитіла; (4) виявлення гнучких залишків для мутації, залишків або мотивів, що, швидше за все, будуть джерелом гетерогенності і розпаду і також будуть піддаватися мутації; і (5) перевірки на наявність відомих епітопів Т- або В-клітин. Гнучкі залишки можуть виявлятися на основі розрахунків MD, що пропонуються в даному документі, з використанням моделі передбачуваного розчинника, що враховує взаємодію водного розчинника з атомами білка за період часу моделювання. Після виявлення набору гнучких залишків у варіабельних легких і важких ланцюгах визначають набір основних послідовностей важких і легких ланцюгів варіабельних областей людини, що мають близьку подібність з існуючими в розглянутому антитілі. Для цього, наприклад, можна скористатися пошуком BLAST для набору гнучких залишків по базі даних для послідовностей антитіл зародкової лінії людини. Це також може досягатися за допомогою зіставлення динаміки вихідного mAb з динамікою бібліотеки канонічних структур зародкової лінії. Залишки і сусідні залишки CDR виключаються з пошуку, для того щоб забезпечити збереження високої афінності для антигену.

Потім проводилася заміна гнучких залишків. Коли кілька залишків людини виявляли подібну гомологію, вибір визначався також природою залишків, що, швидше за все, робили би вплив на поведінку гуманізованого антитіла в розчині. Наприклад, перевага віддавалася полярним залишкам у доступних гнучких петлях, на противагу гідрофобним залишкам. Залишки, що є потенційним джерелом нестабільності і гетерогенності, також піддавали мутації, навіть якщо вони виявлялися в CDR. Сюди включаються доступні метіоніни, оскільки утворення сульфоксиду може бути наслідком взаємодії з кисневими радикалами, протеолітичне розщеплення кислото-нестійких зв'язків, наприклад у дипептиді Asp-Pro (Drug Dev Res (2004) 61:137-154), сайти деамідування, що є присутніми у доступному залишку аспарагіну, за яким іде невелика за розмірами амінокислота, наприклад Gly, Ser, Ala, His, Asn або Cys (J Chromatog (2006) 837:35-43), а також сайти N-глікозилювання, наприклад сайт Asn-X-Ser/Thr. Як правило, доступні метіоніни будуть заміщуватися лейцинами, доступні аспарагіни будуть заміщуватися глутаміном або аспартатом, або ж буде заміщуватися залишок, який іде за ними. У випадку сайту глікозилювання (Asn-X-Ser/Thr) буде замінюватися або Asn, або залишок Ser/Thr.

Результуюча композитна послідовність перевіряється на предмет присутності відомих епітопів В-клітин або лінійних епітопів Т-клітин. Пошук проводиться, наприклад, за загальнодоступною базою даних імунних епітопів (IEDB). Якщо всередині композитної послідовності виявляється відомий епітоп, шукається інший набір послідовностей людини, всередині яких виробляється заміщення.

На відміну від запропонованого в патенті США № 5639641 методу зміни поверхні (resurfacing), у пропонованому способі враховуються також імуногенні відповіді, опосередковані В- і Т-клітинами. Спосіб також дозволяє обійти проблему втрати активності, що іноді спостерігається у випадку вставок у CDR (патент США № 5530101). Крім того, у процесі інженерії і селекції також враховуються аспекти стабільності і розчинності, що дозволяє створити антитіло, оптимізоване в плані низької імуногенності, високої афінності до антигену і більш прийнятних біофізичних характеристик.

Стратегії і способи зміни поверхні антитіла, а також інші методи зниження імуногенності антитіла у різних організмах хазяїна викладені, наприклад, у патенті США № 5639641. У цілому в межах переважного способу: (1) проводиться зіставлення положень набору варіабельних областей важких і легких ланцюгів антитіла, для того щоб визначити доступні поверхневі положення важкого і легкого ланцюга варіабельної області основної послідовності, при цьому зіставлені положення для усіх варіабельних областей повинні бути принаймні приблизно на 98 % ідентичні; (2) визначається набір нелюдських доступних поверхневих амінокислотних залишків важких і легких ланцюгів варіабельної області основної послідовності, наприклад, для антитіла гризунів (або його фрагмента); (3) визначається набір доступних поверхневих амінокислотних залишків важких і легких ланцюгів варіабельної області основної послідовності, що найбільш близький набору доступних поверхневих амінокислотних залишків гризунів; і (4) набір доступних поверхневих амінокислотних залишків важких і легких ланцюгів варіабельної області основної послідовності, ідентифікований на етапі (2), замінюється набором доступних поверхневих амінокислотних залишків важких і легких ланцюгів варіабельної області основної послідовності, ідентифікованим на етапі (3), за винятком тих амінокислотних залишків, що розміщуються в межах 5А від будь-якого атома будь-якого залишку CDR антитіла гризунів, для того щоб одержати гуманізоване антитіло, наприклад антитіло гризунів, що зберігає специфічність зв'язування.

Антитіла можуть гуманізуватися на основі множини інших методик, у тому числі вставки в CDR (EPO 0239400; WO 91/09967; а також патенти США №№ 5530101 і 5585089), зміни поверхні антитіла або відновлення поверхневого доступу (EPO 0592106; EPO 0519596; Padlan, 1991, Molec Imm 28(4/5):489-498; Studnicka et al., 1994, Prot Eng 7(6):805-814; і Roguska et al., 1994, PNAS 91:969-973) і перестановки в ланцюзі (патент США № 5565332). Антитіла людини можуть готуватися з застосуванням різних методів, відомих фахівцям у даній галузі, у тому числі, серед інших, методів фаг-дисплею, див. патенти США №№ 4444887, 4716111, 5,545,806 і 5814318; і WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 і WO 91/10741, з використанням трансгенних тварин, наприклад гризунів, з використанням химерних клітин і т.п.

Терміни "гомолог антитіла" або "гомолог" належать до будь-якої молекули, що специфічним чином зв'язує IL-4 і (або) IL-13 відповідно до змісту даного документа. Таким чином, до гомологів антитіла належать нативне або рекомбінантне антитіло, модифіковане або немодифіковане; частини антитіла, що зберігають біологічні властивості, які представляють інтерес; наприклад зв'язування IL-4 або IL-13; наприклад молекули Fab або Fv; одноланцюжкове антитіло; поліпептид, що містить одну або декілька областей CDR і т.п. Амінокислотна послідовність гомолога необов'язково повинна бути ідентична послідовності існуючого в природі антитіла, але може бути змінена або модифікована включенням замісних амінокислот, введених амінокислот, вилучених амінокислот, амінокислот, що не входять у число двадцяти, які зустрічаються в білках, і т.п., для того щоб одержати поліпептид з поліпшеними або іншими корисними властивостями.

Антитілами з гомологічними послідовностями називають антитіла з амінокислотними послідовностями, що мають гомологію послідовності з амінокислотними послідовностями антитіла IL-4, IL-13 або біспецифічного антитіла IL-4/IL-13 даного винаходу. Переважно, гомологія існує з амінокислотною послідовністю варіабельних областей антитіла даного винаходу. "Гомологія послідовності" належить до послідовності амінокислот даного документа, що визначається як послідовність з гомологією приблизно 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 % або вище і, більш переважно, з гомологією принаймні близько 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % відносно іншої послідовності амінокислот, що визначається, наприклад, за методом пошуку FASTA відповідно до Pearson & Lipman, Proc Natl Acad Sci USA 85,2444-2448(1988).

Химерним антитілом називають антитіло, що містить різні частини антитіла, отриманого з різних джерел, таких як різні антитіла, різні класи антитіл, різні види тварин, наприклад антитіла, що мають варіабельну область, отриману з мишачого моноклонального антитіла, з'єднані з константною областю імуноглобуліну людини і т.п. Таким чином, гуманізоване антитіло являє собою вид химерного антитіла. Методи приготування химерних антитіл відомі фахівцям у даній галузі, див., наприклад, Morrison, 1985, Science 229:1202; Oi et al., 1986, BioTechniques 4:214; Gillies et al., 1989, J Immunol Methods 125:191-202; і патенти США Ms 5807715, 4816567 і 4816397.

До штучних антитіл належать фрагменти scFv, химерні антитіла, діатіла, триатіла, тетратіла і mm (див. огляди Winter & Milstein, 1991, Nature 349:293-299; і Hudson, 1999, Curr Opin Imm 11:548-557), кожне з них має здатність зв'язувати антиген або епітоп. В одноланцюжковому фрагменті F<sub>v</sub> (scF<sub>v</sub>), домени V<sub>H</sub> і V<sub>L</sub> антитіла зв'язані гнучким пептидом. Зазвичай лінкер являє собою пептид довжиною близько 15 амінокислот. Якщо лінкер суттєво менше, наприклад довжиною в 5 амінокислот, утворюються діатіла. Найменшою зв'язувальною одиницею антитіла є CDR, як правило CDR2 важкого ланцюга, що має достатню здатність до розпізнавання і зв'язування. Такий фрагмент називають молекулярною областю розпізнавання, або mru. Трохи таких mru можуть бути зв'язані разом з короткими лінкерними пептидами, тим самим, утворюючи штучний зв'язувальний білок з більш високою авідністю в порівнянні з окремим mru.

У сферу охоплення даного винаходу також включаються функціональні еквіваленти розглянутого антитіла. Термін "функціональні еквіваленти" включає, наприклад, антитіла з гомологічними послідовностями, гомологи антитіл, химерні антитіла, штучні антитіла і модифіковані антитіла, наприклад ті, в яких кожен функціональний еквівалент визначається здатністю зв'язуватися з IL-4 і (або) IL-13, інгібуючи здатність або функцію IL-4 і (або) IL-13 передавати сигнал, або інгібуючи зв'язування IL-4 і (або) IL-13 з його рецептором. Досвідченому фахівцю в даній галузі буде очевидно часткове накладення термінів, що позначають групи молекул, "фрагменти антитіл" і "функціональні еквіваленти". Методи приготування функціональних еквівалентів, що зберігають здатність до зв'язування IL-4 і (або) IL-13, відомі кваліфікованим фахівцям у даній галузі і викладені, наприклад, у WO 93/21319, EPO Ser. No. 239400, WO 89/09622, EPO Ser. No. 338745 і EPO Ser. No. 332424.

До функціональних еквівалентів даної заявки також належать модифіковані антитіла, наприклад антитіла, модифіковані за рахунок ковалентного зв'язку молекули будь-якого типу з антитілом. Наприклад, до модифікованих антитіл належать антитіла, що були модифіковані, наприклад глікозилюванням, ацетилюванням, PEGілюванням, деамідуванням, фосфорилюванням, амідуванням, введенням відомих захисних/блокувальних груп, протеолітичним розщепленням, зв'язком із клітинним лігандом, зв'язком з токсином або цитотоксичною групою або іншим білком і т.п. Ковалентне зв'язування необов'язково призводить до антитіла, що захищене від формування анти-ідіотипічного відгуку. Модифікація може проводитися з використанням відомих методик, у тому числі, серед інших, специфічного хімічного розщеплення, ацетилювання, формулювання, метаболічного синтезу і т.п. Крім того, модифіковані антитіла можуть містити одну або декілька неklasичних амінокислот.

Рядовим фахівцям у даній галузі відома множина методик, що дозволяють проводити оптимізацію афінності зв'язування. Як правило, такі методики включають заміщення різних амінокислотних залишків у розглянутому сайті з наступним скринінговим аналізом афінності зв'язування мутантного поліпептиду з когнатним антигеном або епітопом.

Після ідентифікації і виділення антитіла часто буває корисно одержати варіант або мутант антитіла, або мутеїн, де змінені один або декілька амінокислотних залишків, наприклад, в одній або декількох гіперваріабельних областях антитіла. В альтернативному варіанті або додатково в структуру антитіла може бути внесена одна або декілька змін (наприклад, заміщень) у залишках основної послідовності, що призводить до поліпшення афінності зв'язування мутанта антитіла з IL-4 і (або) IL-13. Прикладами залишків основної області, що можуть бути модифіковані, є ті, які прямо нековалентно зв'язують антиген (Amit et al., Science 233:747-753 (1986)); взаємодіють з конформацією CDR або впливають на неї (Chothia et al., J Mol Biol 196:901-917 (1987)); і (або) входять до складу інтерфейсу V<sub>L</sub>-V<sub>H</sub> (EP 239 400). У деяких прикладах здійснення модифікації одного або декількох таких залишків основної області призводить до поліпшення афінності зв'язування антитіла з когнатним антигеном. Наприклад, у даному прикладі здійснення винаходу можуть змінюватися від одного до приблизно п'яти залишків основної області. Іноді цього може бути достатньо, щоб одержати мутант антитіла, придатний для використання в доклінічних випробуваннях, навіть якщо не вносилися зміни в жодний із залишків гіперваріабельної області. Однак, як правило, мутант антитіла може

включати одну або декілька змін гіперваріабельної області. Константні області також можуть змінюватися, для того, щоб досягти бажаних або більш бажаних ефекторних властивостей.

Залишки гіперваріабельної області, що піддаються заміщенню, можуть змінюватися випадковим чином, особливо, якщо вихідна афінність зв'язування вихідного антитіла така, що випадковим чином одержувані мутанти антитіл можуть легко аналізуватися в процесі скринінгу на зміну зв'язування за методикою аналізу, наведеною в даному документі.

Одним з методів одержання мутантів антитіл, наприклад мутантів CDR, є "мутагенез сканування аланіну" (Cunningham & Wells, Science 244:1081-1085 (1989); i Cunningham & Wells, Proc Nat Acad Sci USA 84:6434-6437 (1991)). Один або декілька залишків гіперваріабельної області замінюються аланіновими або поліаланіновими залишками. Такий залишок (залишки) гіперваріабельної області, що виявляє функціональну чутливість до заміщень, потім модифікують, вводячи подальші або інші мутації в сайтах заміни. Таким чином, незважаючи на те, що сайт для введення варіації послідовності амінокислоти визначений, сам по собі характер мутації необов'язково заздалегідь заданий. Можна спробувати ввести аналогічні заміщення з іншими амінокислотами, залежно від бажаних властивостей сканованих залишків.

Більш систематичний метод ідентифікації амінокислотних залишків для модифікації включає вибір залишків гіперваріабельної області, задіяних у зв'язуванні IL-4 і (або) IL-13, а також тих залишків гіперваріабельної області, що слабо беруть участь або не задіяні в зв'язуванні IL-4 і (або) IL-13. Проводиться аланінове сканування залишків незв'язувальної гіперваріабельної області, причому кожен Ala мутант проходить тестування на поліпшення зв'язування з IL-4 і (або) IL-13. В іншому прикладі здійснення для модифікації вибирається той залишок (залишки), що суттєво задіяні в зв'язуванні IL-4 і (або) IL-13. Модифікація може передбачати делецію залишку або введення одного або декількох залишків у безпосередній близькості від розглянутого залишку. Однак, як правило, модифікація передбачає заміну залишку іншою амінокислотою. Перша заміна може бути консервативною. Якщо така заміна призводить до зміни біологічної активності (наприклад, афінності зв'язування), тоді можна провести наступну консервативну заміну, щоб довідатися, чи вдалося домогтися більш суттєвих змін.

Ще більш значуща зміна в лінії антитіл і прояві біологічних властивостей може бути досягнута при виборі амінокислоти, що більш помітно відрізняється за властивостями від тієї, яка зазвичай є присутньою на цьому сайті. Тому таке заміщення може проводитися при одночасному збереженні: (а) структури поліпептидного остова в зоні заміни, наприклад у вигляді листа або спіральної конформації; (б) заряду або гідрофобності молекули в мішеневому сайті, або (в) обсягу бічного ланцюга.

Наприклад, амінокислоти, що зустрічаються в природі, можуть бути підрозділені на групи на основі загальних властивостей бічного ланцюга:

(1) гідрофобні: метіонін (M або Met), аланін (A або Ala), валін (V або Val), лейцин (L або Leu) і ізолейцин (I або Ile);

(2) нейтральні, гідрофільні: цистеїн (C або Cys), серин (S або Ser), треонін (T або Thr), аспарагін (N або Asn) і глутамін (Q або Gin);

(3) кислі: аспарагінова кислота (D або Asp) і глутамінова кислота (E або Glu);

(4) основні: гістидин (H або His), лізин (K або Lys) і аргінін (R або Arg);

(5) залишки, що впливають на орієнтацію ланцюга: гліцин (G або Gly) і пролін (P або Pro);

(6) ароматичні: триптофан (W або Trp), тирозин (Y або Tyr) і фенілаланін (F або Phe).

Під неконсервативними заміщеннями може розумітися заміна однієї з амінокислот на амінокислоту з іншої групи. Під консервативними заміщеннями може розумітися заміна однієї амінокислоти на іншу всередині однієї групи.

До переважних заміщень амінокислот належать такі, які: (1) знижують схильність до протеолізу, (2) зменшують схильність до окиснення, (3) змінюють афінність зв'язування і (4) забезпечують або змінюють інші фізико-хімічні або функціональні властивості таких аналогів. Серед аналогів можуть бути присутніми різні мутанти з послідовністю, що відрізняється від існуючої в природі пептидної послідовності. Наприклад, одиничні або множинні заміни амінокислот (переважно консервативні заміни амінокислот) можуть проводитися в існуючій у природі послідовності (переважно в частині поліпептиду за межами домену (доменів), відповідального за міжмолекулярні контакти). Консервативна заміна амінокислот не повинна суттєво змінювати структурні характеристики вихідної послідовності (наприклад заміна амінокислоти зазвичай не повинна призводити до порушення спіральної конформації, що була присутня у вихідній послідовності, або ж порушувати інші елементи вторинної структури, що характеризують вихідну послідовність), виключенням є зміни загального обсягу або зміни конформації R-групи або бічного ланцюга, Proteins, Structures and Molecular Principles (Creighton,

ed., W. H. Freeman and Company, New York (1984)); Introduction to Protein Structure (Branden & Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N. Y. (1991)); i Thornton et al. Nature 354:105 (1991).

Зазвичай мутант антитіла з поліпшеними біологічними властивостями буде мати амінокислотну послідовність, що принаймні на 75 % ідентична або подібна амінокислотній послідовності важкого або легкого ланцюга варіабельного домену вихідного антилюдського антитіла IL-4 і (або) IL-13, або має принаймні 80 %-ну, принаймні 85 %-ну, принаймні 90 %-ну і часто принаймні 95 %-ну ідентичність. Ідентичність або подібність у відношенні послідовності вихідного антитіла визначається в даному документі як відсоток амінокислотних залишків у послідовності кандидата, що ідентичний (тобто той самий залишок) чи подібний (тобто амінокислотний залишок з тієї ж групи, виходячи з близьких властивостей бічного ланцюга, див. вище) залишкам вихідного антитіла після зіставлення послідовностей і введення пропусків, якщо необхідно, для забезпечення максимального відсотка ідентичності послідовності.

В альтернативному варіанті мутанти антитіла можуть бути отримані систематичною мутацією областей FR і CDR важкого і легкого ланцюгів або ж області F<sub>c</sub> антитіла анти-IL-4, анти-IL-13 або біспецифічного антитіла IL-4/IL-13. Інший метод одержання мутантів антитіла включає використання дозрівання афінності за допомогою фаг-дисплею (Hawkins et al., J Mol Biol 254:889-896 (1992) i Lowman et al., Biochemistry 30(45):10832-10838(1991)). Злиті білки оболонки бактеріофага (Smith, Science 228:1315 (1985); Scott & Smith, Science 249:386 (1990); Cwirla et al. Proc Natl Acad Sci USA 8:309 (1990); Devlin et al. Science 249:404 (1990); Wells & Lowman, Curr Opin Struct Biol 2:597 (1992); i патент США № 5223409) відомі як зручні об'єкти для зв'язування фенотипу білків або пептидів дисплею з генотипом частинок бактеріофага, що їх кодують. При використанні фаг-дисплею також відображаються домени F<sub>ab</sub> антитіл (McCafferty et al., Nature 348: 552 (1990); Barbas et al. Proc Natl Acad Sci USA 88:7978 (1991); i Garrard et al. Biotechnol 9:1373 (1991)).

Моновалентний фаг-дисплей передбачає відображення набору варіантів білка у формі злитих білків з білком оболонки бактеріофага на частинках фага (Bass et al., Proteins 8:309 (1990). Дозрівання афінності, або поліпшення рівноважної афінності зв'язування різних білків, раніше досягалося за допомогою послідовного застосування мутагенезу, моновалентного фаг-дисплею і функціонального аналізу (Lowman & Wells, J Mol Biol 234:564 578 (1993); i патент США № 5534617), наприклад, особлива увага приділялася областям CDR антитіл (Barbas et al., Proc Natl Acad Sci USA 91:3809 (1994); i Yang et al., J Mol Biol 254:392 (1995)).

Бібліотеки множини (наприклад, 10<sup>6</sup> або більше) варіантів білків, що відрізняються у визначених положеннях послідовності, можна побудувати на частинках бактеріофагів, кожна з яких містить ДНК, що кодує визначений варіант білка. Після циклів афінного очищення з використанням іммобілізованого антигену, ізолюють окремі клони бактеріофагів і на підставі ДНК визначають амінокислотну послідовність відображуваного білка.

Після одержання мутанта антитіла можна визначити біологічну активність даної молекули в порівнянні з вихідним антитілом, згідно з даними, викладеними в даному документі. Як відзначалося вище, для цього може знадобитися визначити афінність зв'язування і (або) іншу біологічну активність або фізичні властивості антитіла. У переважному здійсненні даного винаходу готується набір мутантів антитіла з наступним скринінгом афінності зв'язування для антигену. Один або декілька мутантів антитіла, що вибираються за результатами скринінгу, можуть додатково перевірятися з використанням одного або декількох інших методів аналізу біологічної активності, для того, щоб підтвердити, що мутант (мутанти) антитіла має нові або поліпшені властивості. У переважних прикладах здійснення мутант антитіла зберігає здатність зв'язування IL-4 і (або) IL-13 з афінністю зв'язування, близькою або кращою/більш високою в порівнянні з характеристиками вихідного антитіла.

Відібраний у такий спосіб мутант (мутанти) антитіла може піддаватися подальшим модифікаціям, що часто залежать від передбачуваного використання антитіла. Такі модифікації можуть включати подальшу зміну амінокислотної послідовності, злиття з гетерологічним поліпептидом (поліпептидами) і (або) ковалентні модифікації. Наприклад, залишок цистеїну, що не задіяний у збереження належної конформації мутанта антитіла, може заміщуватися, як правило, на серин, для того щоб поліпшити стійкість молекули до окиснення і попередити утворення абераційних зшивок. Навпроти, цистеїн може вводитися в структуру антитіла, для того, щоб поліпшити його стабільність (особливо, якщо як антитіло вибирається фрагмент антитіла, наприклад, фрагмент F<sub>v</sub>).

Інший тип мутанта антитіла має змінену структуру глікозилювання. З цією метою можуть віддалятися одна або декілька вуглеводних груп, що є присутніми в антитілі, і (або) додаватися один або декілька сайтів глікозилювання, яких немає в молекулі антитіла. Глікозилювання антитілу, як правило, або N-зв'язане з Asn, або O-зв'язане з Ser або Thr. Трипептидні

послідовності аспарагін-х-серин і аспарагін-х-треонін, де X - будь-яка амінокислота, крім проліну, є розповсюдженими послідовностями розпізнавання для ферментативного зв'язування вуглеводної групи з бічним ланцюгом аспарагіну. N-ацетилгалактозамін, галактоза, фукоза або ксилоза, наприклад, зв'язуються з гідроксіамінокислотою, як правило із серином або треоніном, хоча може використовуватися і 5-гідроксипролін або 5-гідроксилізін. Додавання або заміщення одного або декількох залишків серину або треоніну до послідовності вихідного антитіла може підвищити імовірність О-зв'язаного глікозилювання.

Можливо, буде бажано модифікувати антитіло даного винаходу в плані ефекторної функції, для того щоб підвищити ефективність антитіла. Наприклад, в область  $F_c$  може вводитися залишок (залишки) цистеїну, що забезпечує можливість утворення міжланцюжкового дисульфідного зв'язку в цій області. Отримане в такий спосіб гомодимерне антитіло може характеризуватися більш високою здатністю до інтерналізації і (або) комплемент-залежного лізису й антитілозалежної клітинної цитотоксичності (ADCC), див. Caron et al., J Exp Med 176:1191-1195 (1992) і Shopes, Immunol 148:2918-2922 (1993). В альтернативному варіанті може бути сконструйоване антитіло, що має подвійні області  $F_c$  і тому може забезпечувати підвищені комплемент-залежний лізис і здатність до ADCC, див. Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design 3: 219 230 (1989).

Ковалентні модифікації антитіла включаються в охоплення даного винаходу. Вони можуть проводитися за допомогою хімічного синтезу або, якщо можливо, ферментативного або хімічного розщеплення антитіла. Інші форми ковалентних модифікацій антитіла вводяться в молекулу за допомогою взаємодії вибраних амінокислотних залишків антитіла з органічним агентом, використовуваним для одержання похідних, що здатні реагувати з вибраними бічними ланцюгами або з N-кінцевим або C-кінцевим залишком.

Цистеїнілінові залишки можуть реагувати з  $\alpha$ -галоацетатами (і відповідними амінами), наприклад хлороцтовою кислотою або хлорацетамідом, з утворенням карбоксиметильних або карбоксамідометильних похідних. Похідні цистеїнілінових залишків також можна одержувати, наприклад, шляхом реакції з бромтрифторацетоном,  $\alpha$ -бром- $\beta$ -(5-імідозоїл)пропіоноювою кислотою, хлорацетилфосфатом, N-алкілмалеїмідами, 3-нітро-2-піридилдисульфідом, метил-2-піридилдисульфідом, п-хлормеркурбензоатом, 2-хлормеркур-4-нітрофенолом або хлор-7-нітробензо-2-окса-1,3-діазолом.

Похідні гістидинілінових залишків можуть бути отримані за реакцією з діетилпірокарбонатом при pH 5,5-7,0, п-Бромфенацилбромід може також використовуватися, реакцію переважно проводити в 0,1 М розчині какодилату натрію при pH 6,0.

Лізинілінові залишки і а-кінцеві залишки можуть реагувати з бурштиновим ангідридом або з ангідридами інших карбонових кислот, для того щоб змінити заряд залишків. До інших зручних реагентів для одержання похідних  $\alpha$ -аміновмісних залишків належать імідоєфіри, наприклад метилпіколінімідат, піридоксальфосфат, піридоксаль, хлорборогідрид, тринітробензолсульфонова кислота, О-метилізосечовина і 2,4-пентандіон, і амінокислота може каталізуватися трансаміназою у присутності гліоксилату.

Залишки аргініну можуть модифікуватися за реакцією з одним або декількома стандартними реагентами, наприклад фенілглюксалем, 2,3-бутандіоном, 1,2-циклогександіоном і нінгідрином. Для одержання похідних у випадку залишків аргініну часто потрібно проводити реакцію в лужному середовищі. Крім того, реагенти можуть взаємодіяти з лізином, а також з  $\epsilon$ -аміногрупою аргініну.

Специфічна модифікація залишків тирозину може проводитися за допомогою ароматичних діазонієвих сполук або тетранітрометану. Наприклад, N-ацетилімідазол і тетранітрометан використовуються для утворення О-ацетилтирозильних сполук і 3-нітропохідних, відповідно. Залишки тирозину можуть йодуватися з використанням  $^{125}\text{I}$  або  $^{131}\text{I}$ , щоб одержати мічені білки для застосування в радіоімунологічному аналізі.

Карбоксильні бічні групи (аспартил або глутаміл) можуть бути модифіковані за реакцією з карбодіімідами ( $\text{R-N}=\text{C}=\text{C-R}'$ ), де R і R' можуть бути різними алкільними групами, наприклад 1-циклогексил-3-(2-морфолініл-4-етил)карбодіімід або 1-етил-3-(4-азоній-4,4-диметилпентил)карбодіімід. Крім того, залишки аспартилу і глутамілу можуть бути трансформовані в аспарагінілінові і глутамінілінові залишки за реакцією з іонами амонію.

Глутамінілінові й аспарагінілінові залишки часто деамідують до відповідних глутамільних і аспартильних залишків, відповідно, у нейтральному або основному середовищі. Деамідована форма таких залишків входить у сферу охоплення даного винаходу.

До інших модифікацій належить гідроксилювання проліну і лізину, фосфорилювання гідроксильних груп залишків сериніл або треоніл, метилювання  $\alpha$ -аміногруп бічних ланцюгів лізину, аргініну і гістидину (Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman &



Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)), ацетилювання N-кінцевого аміну та амідування будь-якої C-кінцевої карбоксильної групи.

Інша форма ковалентної модифікації являє собою хімічне або ферментативне зв'язування глікозидів з антитілом. Такі процедури не потребують продукції антитіл у клітині-хазяїні, що виявляє глікозилувальні властивості в N-зв'язаному або O-зв'язаному глікозилуванні. Залежно від використаного методу поєднання цукор (цукри) можуть зв'язуватися з: (а) аргініном і гістидином; (б) вільними карбоксильними групами; (в) вільними сульфгідрильними групами, наприклад цистеїну; (г) вільними гідроксильними групами, наприклад серину, треоніну або гідроксипроліну; (д) ароматичними залишками, наприклад фенілаланіну, тирозину або триптофану; або (е) амідною групою глутаміну. Подібні методи описані в WO 87/05330 і в Aplin & Wriston, CRC Crit Rev Biochem, pp. 259-306 (1981).

Видалення будь-якої вуглеводної групи, що присутня у структурі антитіла, може здійснюватися хімічним або ферментативним способом. Наприклад, для хімічного деглікозилування може знадобитися подіяти на антитіло таким реагентом, як трифторметансульфонова кислота або рівноцінною сполукою, що призводить до розщеплення більшості або всіх цукрів, крім зв'язувального цукру (N-ацетилглюкозамін або N-ацетилгалактозамін), при цьому антитіло залишається інтактним. Хімічне деглікозилування описане, наприклад, у Hakimuddin et al. Arch Biochem Biophys 259:52 (1987) і в Edge et al., Anal Biochem 118:131 (1981). Ферментативне розщеплення вуглеводних груп на антитілах може здійснюватися за допомогою кожної з множини ендоглікозидаз і екзоглікозидаз, як це описано, наприклад, у Thotakura et al., Meth Enzymol 138:350 (1987).

Інша форма ковалентної модифікації антитіла включає зв'язування антитіла з одним з множини небілкових полімерів, наприклад поліетиленгліколем, поліпропіленгліколем або поліоксіалкіленами, на основі методу, наведеного в патентах США №№ 4640835; 4496689; 4301144; 4670417; 4791192 чи 4179337.

Інша переважна методика одержання мутантів або мутеїнів являє собою дозрівання афінності за допомогою фаг-дисплею (Hawkins et al., J Mol Biol 254:889-896 (1992) і Lowman et al., Biochemistry 30(45):10832-10838(1991)). Коротко, проводиться мутація декількох сайтів гіперваріабельної області (наприклад, 6-7 сайтів), щоб одержати всі можливі амінокислотні заміщення на кожному сайті. Отримані в такий спосіб мутанти антитіла моновалентно виявляються на частинках фага як злиті з білком, що знаходиться на частинках. Фаг, що експресує різні мутанти, може проходити цикл процедур селекції зв'язування з наступним виділенням і секвенуванням тих мутантів, що демонструють високу афінність.

Метод селекції нових зв'язуючих поліпептидів може спиратися на використання бібліотеки структурно зв'язаних поліпептидів. Бібліотека структурно зв'язаних поліпептидів, наприклад злитих з білком оболонки фага, виходить за допомогою мутагенезу і виявляється на поверхні частинки. Потім частинки вступають у контакт із молекулою-мішенню, і частинки з найвищою афінністю до мішені відокремлюються від таких, що мають більш низьку афінність. Частинки, які зв'язуються з високою афінністю, потім ампліфікуються за допомогою інфікування придатного бактеріального хазяїна, і стадію конкурентного зв'язування повторюють. Процес повторюють, доти поки не будуть отримані поліпептиди з бажаною афінністю.

В альтернативному варіанті мультивалентний фаг (McCafferty et al. (1990) Nature 348:552-554; і Clackson et al. (1991) Nature 352:624-628) може також використовуватися для експресії випадкових точкових мутацій (наприклад отриманих у результаті використання допускаючої помилки ДНК-полімерази) для одержання фагової бібліотеки фрагментів антитіл, що потім можуть піддаватися скринінгу для перевірки афінності до IL-4 і (або) IL-13, Hawkins et al., (1992) J Mol Biol 254:889-896.

Переважно, щоб у процесі дозрівання афінності реплікований вектор експресії залишався під суворим контролем керуючого елемента транскрипції, а умови культивування коректувалися таким чином, щоб кількість частинок, що несуть більше однієї копії злитого білка, була менше приблизно 1 %. Крім того, переважно, щоб кількість частинок, що несуть більше однієї копії злитого білка, була менше 10 % від кількості частинок, що несуть єдину копію злитого білка. Переважно, щоб така кількість була менше 20 %.

Функціональні еквіваленти можуть виходити заміною різних CDR у різних ланцюгах антитіл в основній або композитній FR, отриманій від багатьох антитіл. Так, наприклад, можливо одержати різні класи антитіл для заданого набору CDR за допомогою заміщення різних важких ланцюгів, наприклад IgG<sub>1-4</sub>, IgM, IgA<sub>1-2</sub> або IgD, для того щоб одержати типи та ізотипи антитіл IL-4 і (або) IL-13, що розрізняються. Аналогічним чином, штучні антитіла, що входять у сферу охоплення даного винаходу, можуть бути отримані за допомогою включення заданого набору CDR у цілком синтетичну основну область.

До фрагментів антитіл і функціональних еквівалентів даного винаходу належать такі молекули, що мають реєстрований рівень зв'язування з IL-4 і (або) IL-13. Реєстрований рівень зв'язування включає всі значення в діапазоні принаймні 10-100 %, переважно принаймні 50 %, 60 % або 70 %, більш переважно принаймні 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % або 99 % здатності зв'язування антитіла, що представляє інтерес. У сферу охоплення даного винаходу також включаються еквіваленти з афінністю більше 100 % у порівнянні з розглянутим антитілом.

CDR зазвичай мають велике значення для розпізнавання епітопів і зв'язування антитіла. При цьому, однак, можуть вноситися зміни в залишки, що входять до складу CDR, з одночасною відсутністю впливу на здатність антитіла розпізнавати когнатний епітоп і зв'язуватися з ним. Наприклад, можуть вноситися зміни, що не роблять впливу на розпізнавання епітопів, але проте підвищують афінність зв'язування антитіла з епітопом. У ряді досліджень наводиться огляд ефектів заміни однієї або декількох амінокислот у різних положеннях послідовності антитіла, виходячи зі знань про первинну послідовність антитіла, на їхні властивості, наприклад зв'язування і рівень експресії (Yang et al., 1995, J Mol Biol 254:392-403; Rader et al., 1998, Proc Natl Acad Sci USA 95:8910-8915; i Vaughan et al., 1998, Nature Biotechnology 16, 535-539).

Таким чином, еквіваленти розглянутого антитіла можуть бути отримані зміною послідовностей генів важкого і легкого ланцюгів у CDR1, CDR2 або CDR3, або в основних областях за допомогою таких методів, як олігонуклеотид-опосередкований сайт-напрявлений мутагенез, касетний мутагенез, ПЛР зниженої точності, перестановка в ДНК або штамми мутатора *E. coli* (Vaughan et al., 1998, Nat Biotech 16:535-539; i Adey et al., 1996, Chap. 16, pp. 277-291, у Phage Display of Peptides and Proteins, eds. Kay et al., Academic Press). Методи зміни послідовності нуклеїнової кислоти первинного антитіла можуть призводити до утворення антитіл з підвищеною афінністю (Gram et al., 1992, Proc Natl Acad Sci USA 89:3576-3580; Boder et al., 2000, Proc Natl Acad Sci USA 97:10701-10705; Davies & Riechmann, 1996, Immunotech 2:169-179; Thompson et al., 1996, J Mol Biol 256:77-88; Short et al., 2002, J Biol Chem 277:16365-16370; i Furukawa et al., 2001, J Biol Chem 276:27622-27628).

Повторювані цикли "поліпептидної селекції" можуть застосовуватися для відбору систем з все більш високою афінністю зв'язування, наприклад за допомогою селекції змін декількох амінокислот, що відбираються в ході множини циклів селекції. Після першого циклу селекції, що включає першу область селекції амінокислот у ліганді або поліпептиді антитіла, проводяться додаткові цикли селекції в інших областях або амінокислотах ліганду. Цикли селекції повторюються до досягнення бажаних характеристик афінності.

До поліпшених антитіл також належать антитіла, що мають більш досконалі характеристики, приготовлені з використанням стандартних методик імунізації тварин, утворення гібридом і селекції антитіл з певними характеристиками.

Термін "антагоніст" належить до молекули, здатної інгібувати один або декілька проявів біологічної активності молекули-мішені, наприклад передачу сигналу IL-4 і (або) IL-13. Антагоніст може перешкоджати зв'язуванню рецептора з лігандом і навпаки, виводячи з ладу або знищуючи клітини, активовані лігандом, і (або) блокуючи активацію рецептора або ліганду (наприклад активацію тирозинкінази), або передачу сигналу після зв'язування ліганду з рецептором. Антагоніст здатний цілком блокувати взаємодію рецептор-ліганд або може суттєво пригнічувати такі взаємодії.

Термін "агоніст" належить до сполуки, що включає білок, поліпептид, пептид, антитіло, фрагмент антитіла, кон'югат, велику молекулу, малу молекулу, що активує один або декілька проявів біологічної активності IL-4 і (або) IL-13. Агоністи можуть попереджати зв'язуванню рецептора з лігандом і навпаки, діючи як мітоген клітин, активованих лігандом, і (або) перешкоджаючи інактивації клітин або інгібуванню сигналу після зв'язування ліганду з рецептором. Для цілей даного винаходу всі подібні аспекти впливу агоніста вважаються еквівалентними.

Використовувані в даному документі терміни "клітина", "лінія клітин" і "клітинна культура" включають їх потомство. Також розуміється, що все потомство не може бути в точності ідентичним, наприклад за вмісту ДНК, внаслідок навмисних або випадкових мутацій. Сюди входить варіант потомства, що має такі ж функції або біологічну характеристику, що представляє інтерес, для яких проводиться скринінг у вихідних клітинах.

Термін "вектор" означає конструкцію нуклеїнової кислоти, носій, що містить нуклеїнову кислоту, трансген, чужорідний ген або ген, що представляє інтерес, що може бути функціонально зв'язаний із придатними контрольними послідовностями для експресії трансгена в організмі придатного хазяїна. До таких контрольних послідовностей, наприклад, належать промотор для проведення транскрипції, додаткова операторна послідовність для контролю такої транскрипції, послідовність, що кодує придатні сайти зв'язування мРНК на рибосомі, а

також послідовності, що контролюють зупинку транскрипції і трансляції. Вектором може бути плазміда, частинка фага або просто потенційна геномна вставка. Після трансформації в придатний хазяїн вектор може реплікуватися і функціонувати незалежно від геному хазяїна, або може в деяких випадках інтегруватися в геном клітини-хазяїна. У наведеному описі терміни

5 "плазміда" і "вектор" використовуються рівнозначно, оскільки плазміда є широко застосовуваною формою вектора. Разом з тим передбачається, що винахід включає такі інші форми векторів, що виконують еквівалентні функції носіїв, що відомі або стають відомі фахівцям у даній галузі, наприклад віруси, синтетичні молекули, що містять нуклеїнові кислоти, ліпосоми і т.п.

10 Під "ссавцем" для цілей лікування розуміється будь-яка тварина, що класифікується як ссавець, у тому числі людина, домашні і сільськогосподарські тварини, нелюдиноподібні примати, а також тварини з зоопарків, спортивні або домашні тварини, наприклад собаки, коні, кішки, корови і т.п.

Представляючи інтерес антитіла можуть піддаватися скринінгу або можуть використовуватися в методах аналізу, що описані в даному документі або відомі фахівцям у даній галузі. Часто для таких аналізів потрібний реагент, що може виявлятися доступними методами, наприклад такий, що містить мітку. Використовуваний у даному документі термін "мітка" належить до детектованої сполуки або сполуки, що прямо або побічно може кон'югуватися з молекулою або білком, наприклад антитілом. Мітка може бути сама по собі

20 детектованою (наприклад радіоізотопні мітки або флуоресцентні мітки) або, у випадку ферментативної мітки, може каталізувати хімічні зміни субстрату або сполуки, що піддаються детектуванню.

Використовуваний у даному документі термін "тверда фаза" означає неводну матрицю, до якої може прикріплюватися структура або молекула, наприклад антитіло даного винаходу.

25 Прикладами твердих фаз, що входять у сферу охоплення даного винаходу, є цілком або частково утворені зі скла (наприклад скла з контрольованою пористістю), полісахариди (наприклад агароза), поліакриламід, полістирол, полівініловий спирт і силікони. У деяких прикладах здійснення, залежно від контексту, тверда фаза може являти собою ямку в аналітичному планшеті; в інших випадках вона може використовуватися в колонці для очищення (наприклад у колонці для афінної хроматографії). Таким чином, твердою фазою може бути папір, гранули, пластикова поверхня, чип і т.п., вона може бути виготовлена з усіляких матеріалів, наприклад нітроцелюлози, агарози, полістиролу, поліпропілену, силікону і т.п., а також може мати самі різні конфігурації.

Як відомо фахівцям у даній галузі, ген або кДНК, що кодують IL-4 і IL-13, можуть клонуватися в плазміді або інший вектор експресії і експресуватися в межах кожної з декількох систем експресії відповідно до методів, добре відомих кваліфікованим фахівцям у даній галузі, див., наприклад, нижче.

Молекули нуклеїнових кислот, що кодують амінокислотну послідовність мутантів, можуть бути отримані за допомогою всіляких методів, відомих фахівцям у даній галузі. До таких методів, серед інших, належать олігонуклеотидний (або сайт-направлений) мутагенез, ПЛР-мутагенез і касетний мутагенез раніше приготовленого мутованого або немутуваного варіанта розглянутої молекули (див., наприклад, Kunkel, Proc Natl Acad Sci USA 82:488 (1985)).

Під рекомбінантною експресією антитіла даного винаходу або його фрагмента, похідного або аналога (наприклад важкого або легкого ланцюга антитіла даного винаходу, однокланового антитіла даного винаходу або антитіла мутеїну даного винаходу) розуміється конструювання вектора експресії, що містить полінуклеотид, що кодує антитіло або фрагмент антитіла, як описано в даному документі. Після одержання полінуклеотиду, що кодує молекулу антитіла, можна приготувати вектор для продукції антитіла, використовуючи технологію рекомбінантної ДНК, відому фахівцям у даній галузі. Конструюється вектор експресії,

50 який містить послідовності, що кодують антитіло, а також відповідні маркери контролю транскрипції і трансляції. До таких методів належать, наприклад, методики рекомбінантної ДНК *in vitro*, синтетичні методики і генетична рекомбінація *in vivo*.

Вектор експресії переноситься в клітину-хазяїн за допомогою стандартних методик, і трансфіковані клітини потім культивують за допомогою стандартних методик з метою одержати антитіло даного винаходу або його фрагмент. В одному з аспектів винаходу в клітині-хазяїні може проводитися спільна експресія векторів, що кодують важку і легку ланцюги, для того щоб забезпечити експресію всієї молекули імуноглобуліну, як це докладно описано в даному документі.

При експресії молекул антитіла, представлених у даному винаході, можуть

60 використовуватися найрізноманітніші системи хазяїна/вектори експресії. Такі системи експресії

являють собою носії для одержання і наступного очищення кодуєчих послідовностей, що представляють інтерес, але також являють собою клітини, що при трансформації або трансфекції відповідними кодуєчими нуклеотидними послідовностями здатні експресувати молекулу антитіла даного винаходу *in situ*. Бактеріальні клітини, наприклад *E. coli*, а також еукаріотичні клітини широко використовуються для експресії молекули рекомбінантного антитіла, особливо для експресії всієї молекули рекомбінантного антитіла. Наприклад, клітини ссавців, такі як клітини CHO, у поєднанні з вектором, наприклад, що несе основний елемент проміжного раннього гена-промотору цитомегаловірусу людини, є ефективною системою експресії антитіл (Foecking et al., *Gene* 45:101 (1986); і Cockett et al, *Bio/Technology* 8:2 (1990)). Як відомо фахівцям у даній галузі, для приготування білків, що представляють інтерес, можуть також використовуватися рослини і культури рослинних клітин, клітини комах і т.п.

Крім того, може вибиратися клітина-хазяїн, що модулює експресію введених послідовностей або модифікує і забезпечує процесинг генного продукту конкретним заданим чином. Подібні модифікації (наприклад глікозилювання) і процесинг (наприклад розщеплення) білкових продуктів можуть мати важливе значення для функціонування білка. Різні клітини-хазяїни мають характерні і специфічні механізми пост-трансляційного процесингу і модифікації білків і генних продуктів. Придатні лінії клітин або системи хазяїнів можуть вибиратися для забезпечення необхідної модифікації і процесингу експресованого представляючого інтерес антитіла. Отже, може використовуватися еукаріотична клітина-хазяїн, що має клітинний апарат для належного процесингу первинного транскрипта, глікозилювання і фосфорилювання генного продукту. До таких клітин-хазяїнів ссавців, серед інших, належать CHO, COS, 293, 3T3 клітини або міеломи.

Стабільна експресія є переважною для довгострокової високопродуктивної продукції рекомбінантних білків. Наприклад, можуть бути сконструйовані лінії клітин, що стабільно експресують молекулу антитіла. Замість використання векторів експресії, що містять вірусні джерела реплікації, клітина-хазяїн може бути трансформована за допомогою ДНК в умовах регулювання, що забезпечується відповідними елементами контролю експресії (наприклад промотором, енансером, послідовностями, термінаторами транскрипції, сайтами поліаденілування і т.п.) і селектованим маркером. Після інтродукції чужорідної ДНК сконструйованим клітин протягом одного або двох днів дають рости в збагаченому середовищі, потім їх переносять у селективне середовище. Селектований маркер у рекомбінантній плазміді додає стійкість відносно селекції і дозволяє клітинами стабільно інтегрувати плазмиду в хромосому з наступним розвитком у лінію клітин. Такі сконструйовані лінії клітин зручні не тільки для продукції антитіл, але також придатні для скринінгу й оцінки сполук, що прямо або побічно взаємодіють з молекулою антитіла.

Може використовуватися ряд систем селекції, у тому числі, серед інших, тимідинкіназа вірусу *Herpes simplex* (Wigler et al., *Cell* 11:223 (1977)), гіпоксантин-гуанінінфосфорибозилтрансфераза (Szybalska et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 48:202 (1992)), селекція глутаматсинтази в присутності метіонінсульфоксиду (Adv Drug Del Rev 58, 671, 2006, див. також веб-сайт або добірку літератури Lonza Group Ltd.), а також гени аденінфосфорибозилтрансферази (Lowy et al., *Cell* 22:817 (1980)) у клітинах tk, hgprr або aprt, відповідно. Також стійкість до антиметаболітів може використовуватися як основа для селекції наступних генів: dhfr, що забезпечує 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, що забезпечує стійкість до мікофенолової кислоти (Mulligan et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 78:2072 (1981)); neo, що забезпечує стійкість до аміноглікозиду, G-418 (Wu et al., *Biotherapy* 3:87 (1991)); hygrr, що забезпечує стійкість до гідроміцину (Santerre et al., *Gene* 30:147 (1984)). Методи, відомі фахівцям у даній галузі технології рекомбінантної ДНК, можуть стандартним чином застосовуватися для селекції бажаного рекомбінантного клону, і такі методи описані, наприклад, у Ausubel et al., eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons (1993); Kriegler, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press (1990); Dracopoli et al., eds., *Current Protocols in Human Genetics*, John Wiley & Sons (1994); і Colberre-Garapin et al., *J Mol Biol* 150:1 (1981).

Рівні експресії молекули антитіла можуть бути підвищені за допомогою векторної ампліфікації (наприклад, див. Bebbington et al., у *DNA Cloning*, Vol. 3. Academic Press (1987)). У випадку можливості ампліфікації маркера у векторній системі, що експресує антитіло, збільшення рівня інгібітору, що присутній у культурі, буде призводити до росту кількості копій маркерного гена. Оскільки ампліфікована область асоційована з геном антитіла, продукція антитіла буде також зростати (Crouse et al., *Mol Cell Biol* 3:257 (1983)).

Клітина-хазяїн може спільно трансфікуватися двома або більше векторами експресії даного винаходу, наприклад першим вектором, що кодує похідний від важкого ланцюга поліпептид, і другим вектором, що кодує похідний від легкого ланцюга поліпептид. Два вектори можуть

містити ідентичні селектовані маркери, що забезпечують рівну експресію поліпептидів важкого і легкого ланцюгів. Як альтернатива може використовуватися одиничний вектор, що кодує і здатний експресувати поліпептиди як важкого, так і легкого ланцюгів. У подібних випадках легкий ланцюг повинен розташовуватися до важкого, щоб уникнути появи надлишку токсичного вільного важкого ланцюга (Proudfoot, *Nature* 322:52 (1986); i Kohler, *Proc Natl Acad Sci USA* 77:2197 (1980)). Кодуючі послідовності для важкого і легкого ланцюгів можуть включати кДНК або геномну ДНК.

Після того як молекула антитіла даного винаходу отримана в організмі тварини, синтезована хімічним шляхом або за допомогою рекомбінантної експресії, її можна очистити за допомогою будь-якого методу, відомого фахівцям у даній галузі, застосовуваного для очищення молекули імуноглобуліну, наприклад хроматографії (наприклад іонообмінної, афінної, зокрема, що спирається на афінність IL-4 і (або) IL-13 для білка А, а також гель-фільтрацією і т.п.), центрифугування, диференціальної розчинності або за допомогою будь-якої іншої стандартної методики для очищення білків. Крім того, для спрощення процесу очищення антитіла даного винаходу або їхні фрагменти можуть бути злиті в гетерологічні поліпептидні послідовності, описані в даному документі, або ж відомі фахівцям у даній галузі.

Антитіла даного винаходу можуть бути отримані будь-яким зручним методом, відомим фахівцям у даній галузі. До антитіл даного винаходу можуть належати поліклональні антитіла, хоча через модифікацію антитіл для оптимізації застосування на людині, а також для оптимізації застосування антитіл самих по собі, моноклональні антитіла є переважними через простоту одержання й обробку конкретних білків. Методи приготування поліклональних антитіл відомі кваліфікованим фахівцям у даній галузі (Harlow et al., *Antibodies: a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. (1988)).

Антитіла даного винаходу переважно включають моноклональні антитіла. Моноклональні антитіла можуть бути приготовлені за допомогою гібридомних методик, наприклад описаних у Kohler et al., *Nature* 256:495 (1975); патент США № 4,376,110; Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. (1988) і Hammerling et al., *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas*, Elsevier (1981), методик рекомбінантної ДНК, наприклад приготування і використання трансфектом, або інших методів, відомих фахівцям у даній галузі. Інші приклади методів, що можуть використовуватися для продукції моноклональних антитіл, серед інших, включають, гібридомні методики В-клітин людини (Kosbor et al., *Immunology Today* 4:72 (1983); i Cole et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 80:2026 (1983)), і EBV-гібридомну методику (Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, pp. 77-96, Alan R. Liss (1985)). Такі антитіла можуть належати до будь-якого класу імуноглобулінів, у тому числі IgG, IgM, IgE, IgA і IgD, а також до будь-якого їх підкласу. Гібридами, що продукують mAb даного винаходу, можуть культивуватися *in vitro* або *in vivo*.

У межах гібридомної моделі організм хазяїна, наприклад миші, гуманізованої миші, трансгенної миші з генами імунної системи людини, хом'ячка, кролика, щура, верблюда або будь-якої іншої придатної тварини-хазяїна, імунізується з метою активувати лімфоцити, що продукують або здатні продукувати антитіла, що специфічно зв'язуються з IL-4 або IL-13. В альтернативному варіанті лімфоцити можуть бути імунізовані *in vitro*. Потім лімфоцити зливають із клітинами міеломи за допомогою придатного реагенту для злиття, наприклад поліетиленгліколю, для того щоб утворити клітини гібридами (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, pp. 59-103 (1986)).

Як правило, при готуванні продукуючих антитіла гібридом використовуються лімфоцити периферичної крові (PBL), якщо бажано одержати клітини людського походження, або ж клітини селезінки або лімфатичних вузлів, якщо необхідні клітини, що походять від ссавців, крім людини. Іморталізовані лінії клітин зазвичай являють собою трансформовані клітини ссавців, зокрема, клітини міеломи, отримані від гризунів, бика або людини. Зазвичай використовують лінію клітин міеломи щурів або мишей. Клітини гібридами можуть культивуватися в придатному культуральному середовищі, що переважно містить одну або декілька сполук, що інгібують ріст або виживання незлитих, іморталізованих клітин. Наприклад, якщо в батьківських клітинах був відсутній фермент гіпоксантингуанінфосфорибозилтрансферази (HGPRT або HPRT), культуральне середовище для гібридом, як правило, буде містити гіпоксантин, аміноптерин і тимідин ("середовище HAT") - речовини, що перешкоджають росту HGPRT-дефіцитних клітин.

До переважних ліній іморталізованих клітин належать такі, які ефективно беруть участь у злитті, підтримують стабільно високий рівень продукції антитіла відібраними антитіло-продукуючими клітинами і чутливі до середовища, наприклад до середовища HAT. До таких ліній клітин міеломи належать лінії міеломи миші, наприклад отримані з мишачих пухлин MOPC-21 і MPC-11, що поставляються Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif, а також

клітини SP2/O, FO або X63-Ag8-653, що поставляються American Type Culture Collection, Manassas, VA.

Описувалася також продукція моноклональних антитіл людини з ліній клітин мієломи людини і мишащо-людських клітин гетеромієломи (Kozbor, J Immunol 133:3001 (1984); i Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc, pp. 51-63 (1987)). Може також використовуватися лінія клітин мієломи миші NSO (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, Wilshire, UK).

В альтернативному варіанті для одержання гібридом пропонується використовувати електричне злиття замість хімічного. Разом злиття В-клітини можуть бути іморталізовані з використанням, наприклад вірусу Епштейна-Барр чи іншого трансформуючого гена, див., наприклад, Zurawaki et al., у Monoclonal Antibodies, ed., Kennett et al., Plenum Press, pp. 19-33. (1980). Можуть також використовуватися трансгенні миші і миші з важким комбінованим імунodefіцитом (SCID), яким трансплантовані В-лімфоцити людини.

Культуральне середовище, в якому вирощують клітини гібридами, аналізується на предмет продукції моноклональних антитіл, направлених проти IL-4 і (або) IL-13. Специфічність зв'язування моноклональних антитіл, продукованих клітинами гібридами, може визначатися за імунопреципітацією або аналізом зв'язування in vitro, наприклад радіоімунологічним аналізом (RIA), флуороцитометричним аналізом (FACS) твердофазним або імуноферментним аналізом (ELISA). Перераховані методики відомі в даній галузі, і ними володіє будь-який фахівець у даній галузі. Афінність зв'язування моноклонального антитіла з IL-4 і (або) IL-13 може, наприклад, визначатися аналізом по Скетчарду (Munson et al., Anal Biochem 107:220 (1980)).

Після ідентифікації клітин гібридами, що продукують антитіла з бажаною специфічністю, афінністю і (або) активністю, клони можуть бути субклоновані з використанням процедур серійних розведень і культивуватися за допомогою стандартних методів (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, pp. 59-103 (1986)). До придатних культуральних середовищ, наприклад, належить модифіковане Дульбекко середовище Ігла (D-MEM) або середовище RPMI-1640. Крім того, клітини гібридами можуть вирощуватися in vivo у формі асцитних пухлин в організмі тварини.

Моноклональні антитіла, що продукуються субклонами, належним чином відокремлюються або виділяються з культурального середовища, асцитної рідини або сироватки з застосуванням стандартних процедур очищення імуноглобуліну, наприклад білка А-сефароза, білка G-сефароза, хроматографії на гідроксіпатиті, гель-фільтраційної хроматографії, гель-електрофорезу, діалізу або афінної хроматографії.

У даній галузі існує широка розмаїтість методик продукції моноклональних антитіл, а тому винахід не обмежується тільки їх продукцією в гібридомах. Наприклад, моноклональні антитіла можуть бути приготовлені на основі методик рекомбінантної ДНК, наприклад, подібних описаній в патенті США № 4816567. У даному контексті термін "моноклональне антитіло" належить до антитіла, отриманого від єдиного еукаріотичного, фагового або прокаріотичного клону.

ДНК, що кодує моноклональні антитіла даного винаходу, легко виділяється і секвенується з використанням стандартних процедур (наприклад із застосуванням олігонуклеотидних зондів, що здатні специфічно зв'язуватися з генами, які кодують важкий і легкий ланцюги мишачих антитіл або цього ж ланцюга людини, гуманізовані або з інших джерел) (Innis et al. у PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic (1990), i Sanger et al., Proc Natl Acad Sci 74:5463 (1977)). Клітини гібридом служать як джерело такої ДНК. Після виділення ДНК може вводиться у вектори експресії, що потім трансфікуються в клітини-хазяїни, наприклад клітини E. coli, клітини NS0, клітини COS, клітини яєчників китайського хом'ячка (CHO) або клітини мієломи, що в інших ситуаціях не продукують імуноглобуліновий білок, для того щоб досягти синтезу моноклональних антитіл у рекомбінантних клітинах-хазяїнах. ДНК може також модифікуватися, наприклад за допомогою підстановки константних доменів кодуючої послідовності важких і легких ланцюгів людини замість гомологічних послідовностей миші (патент США № 4816567; i Morrison et al., Proc Natl Acad Sci USA 81:6851 (1984)) або ж ковалентного зв'язування кодуючої послідовності імуноглобуліну із усією або частиною кодуючої послідовності неімуноглобулінового поліпептиду. Такий неімуноглобуліновий поліпептид можна використовувати замість константних доменів антитіла даного винаходу або варіабельних доменів одного із сайтів комбінування IL-4 або IL-13 антитіла даного винаходу, так щоб утворити химерне бівалентне антитіло.

Антитіла можуть бути моновалентними. Методи приготування моновалентних антитіл добре відомі фахівцям у даній галузі. Наприклад, один з методів передбачає рекомбінантну експресію легкого ланцюга імуноглобуліну і модифікованого важкого ланцюга. Важкий ланцюг зазвичай обрізається в будь-якій точці області F<sub>c</sub>, для того щоб попередити утворення перехресних

зшивок у важкому ланцюзі. В альтернативному варіанті відповідні цистеїнові залишки замінюються іншим амінокислотним залишком або видаляються, для того щоб перешкодити перехресним зшивкам.

Фрагменти антитіла, що розпізнають специфічні епітопи, можуть бути отримані з використанням відомих методик. Такі фрагменти традиційно одержують методом протеолітичного руйнування інтактних антитіл (див., наприклад, Morimoto et al., J Biochem Biophys Methods 24:107 (1992); і Brennan et al., Science 229:81 (1985)). Наприклад, фрагменти  $F_{ab}$  і  $F_{(ab)_2}$  даного винаходу можуть бути отримані протеолітичним розщепленням молекул імуноглобуліну під дією таких ферментів, як папаїн (для одержання фрагментів  $F_{ab}$ ) або пепсин (для одержання фрагментів  $F_{(ab)_2}$ ). Фрагменти  $F_{(ab)_2}$  містять варіабельну область, константний домен легкого ланцюга і домен  $C_{H1}$  важкого ланцюга. Разом з тим ці фрагменти можуть бути отримані прямо з рекомбінантних клітин-хазяїнів. Наприклад, фрагменти антитіла можуть бути виділені з фагової бібліотеки антитіла. В альтернативному варіанті фрагменти  $F_{(ab)_2}$ -SH можуть бути прямо виділені з *E. coli* і хімічно зв'язуватися з утворенням фрагментів  $F(ab')_2$  (Carter et al., BioTechnology 10:163 (1992)). Відповідно до іншого підходу фрагменти  $F_{(ab)_2}$  можуть бути прямо виділені з культури рекомбінантних клітин-хазяїнів. Досвідченому експериментатору будуть очевидні й інші методики одержання фрагментів антитіл. В інших прикладах здійснення переважним антитілом є одноланцюжковий фрагмент  $F_v$  ( $F_v$ ) (WO 93/16185).

Для деяких додатків, у тому числі застосування антитіл в організмі людини *in vivo* і аналітичних методах детектування *in vitro*, може виявитися переважним використовувати химерні, гуманізовані або людські антитіла. Методи одержання химерних антитіл відомі фахівцям у даній галузі, див., наприклад, Morrison, Science 229:1202 (1985); Oi et al., BioTechniques 4:214 (1986); Gillies et al., J Immunol Methods 125:191 (1989); і патенти США №№ 5807715; 4816567 і 4816397.

Гуманізовані антитіла одержують з молекул антитіл, що продукуються організмами, крім людини, і зв'язуються з IL-4 і (або) IL-13, причому одна або декілька їх CDR введена в області FR молекули імуноглобуліну людини. Антитіла можуть гуманізуватися на основі множини методик, відомих фахівцям у даній галузі, у тому числі, наприклад, вставки в CDR (EPO 239400; WO 91/09967; і патенти США №№ 5225539; 5530101 і 5585089), зміни поверхні антитіл (resurfacing) (EPO 592106; EPO 519596; Padlan, Molecular Immunology 28:489 (1991); Studnicka et al., Protein Engineering 7:805 (1994); і Roguska et al., Proc Natl Acad Sci USA 91:969 (1994)), і перестановки в ланцюзі (патент США № 5565332).

Гуманізоване антитіло містить один або декілька амінокислотних залишків, джерелом яких є будь-який організм, крім людського. Не присутні в людини амінокислотні залишки часто називають "імпортованими" залишками, що зазвичай беруть з "імпортованого" варіабельного домену. Гуманізація може в основному проводитися з використанням методів Вінтера зі співробітниками (Jones et al., Nature 321:522 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323 (1988); і Verhoeven et al., Science 239:1534 (1988)), за допомогою заміщення нелюдських CDR ділянок або послідовностей CDR відповідними послідовностями антитіла людини. Відповідно, такі "гуманізовані" антитіла є химерними (патент США № 4816567), в яких значно менша ділянка в порівнянні з інтактним варіабельним доменом людини заміщена на відповідну послідовність організму, що не є людським. На практиці гуманізовані антитіла зазвичай являють собою антитіла людини, в яких деякі залишки CDR і, можливо, деякі залишки FR заміщені аналогічними сайтами антитіл гризунів. Константна область важкого ланцюга і шарнірна область можуть бути взяті від будь-якого класу або підкласу, для того, щоб досягти бажаного ефекту, наприклад конкретної ефекторної функції.

Часто остовні залишки остовних областей людини можуть бути замінені відповідним залишком CDR донорного антитіла, для того, щоб змінити і, по можливості, поліпшити зв'язування антигену. Остовні заміщення визначають за методами, відовими фахівцям у даній галузі, наприклад за допомогою моделювання взаємодій CDR і остовних залишків, для того щоб визначити остовні залишки, що мають важливе значення для зв'язування антигену, а також шляхом зіставлення послідовності для ідентифікації незвичайних остовних залишків у конкретних положеннях, див., наприклад, патент США № 5585089; і Riechmann et al., Nature 332:323 (1988).

Крім того, переважно, щоб гуманізовані антитіла зберігали високу афінність до IL-4 і (або) IL-13, а також зберігали або набували інші сприятливі біологічні властивості. Таким чином, гуманізовані антитіла готуються в межах процесу аналізу вихідних послідовностей і різних концептуальних гуманізованих продуктів за допомогою тримірних моделей вихідних і гуманізованих послідовностей. Тримірні моделі імуноглобулінів широко доступні і відомі фахівцям у даній галузі. Існують комп'ютерні програми, що візуально представляють і

відображають можливі тримірні конформаційні структури вибраних кандидатів імуноглобулінових послідовностей. Вивчення зображень дозволяє проводити аналіз ймовірної ролі різних залишків у функціонуванні імуноглобулінової послідовності-кандидата, тобто аналіз залишків, що впливають на здатність імуноглобуліну-кандидата зв'язувати IL-4 і (або) IL-13.

5 Таким чином, можуть відбиратися і комбінуватися залишки FR з реципієнтної і імпортованої послідовностей, для того щоб максимізувати бажану характеристику антитіла, наприклад афінність до антигену-мішені, що зросла, хоча саме залишки CDR прямо і найбільш істотним чином впливають на зв'язування IL-4 або IL-13. Області CDR також можуть модифікуватися, так щоб містити одну або декілька амінокислот, що відрізняються від отриманих з вихідного

10 антитіла, від якого була взята CDR, для того щоб забезпечити посилення або появу нових цікавих властивостей, наприклад зв'язування з більшою афінністю або більшою авідністю.

Можна проводити маніпуляції і вносити зміни у певні частини константних областей антитіла, для того щоб надати гомологам, похідним, фрагментам і іншим елементам антитіла властивості, що відрізняються від спостережених у вихідному антитілі або переважні в порівнянні з ним. Так, наприклад, багато антитіл IgG4 утворюють внутрішньоланцюжкові дисульфідні зв'язки в околицях шарнірної області. Внутрішньоланцюжковий зв'язок здатний

дестабілізувати вихідну бівалентну молекулу з утворенням моновалентних молекул, що містять важкий ланцюг з асоційованим легким ланцюгом. Такі молекули можуть знову асоціюватися, але вже випадковим чином.

20 Відзначалося, що модифікація амінокислот у шарнірній області молекул IgG4 може знизити ймовірність утворення внутрішньоланцюжкового зв'язку, тим самим стабілізуючи молекулу IgG4, що зведе до мінімуму ймовірність утворення біспецифічних молекул. Подібна модифікація може виявитися корисною, якщо використовуваним для лікування антитілом є молекула IgG4, оскільки стабільність, що зросла, буде зводити до мінімуму ймовірність дисоціації молекули в процесі одержання і виробництва, а також і *in vivo*. Моновалентне антитіло може не мати такої ж

25 ефективності, що і бівалентна вихідна молекула. Наприклад, якщо пацієнту вводиться бівалентний IgG4, відсоток бівалентного IgG4 спадає до приблизно 30 % за двотижневий період. Заміщення амінокислоти в положенні 228 збільшує стабільність IgG4. Серії, що знаходиться в положенні 228, може бути замінений на іншу амінокислоту, наприклад на одну з інших 19 амінокислот. Така зміна може бути зроблена, зокрема, у випадку рекомбінантних антитіл, де кодуєча послідовність нуклеїнової кислоти може бути мутована, для того щоб одержати амінокислоту, що заміняє, у положенні 228. Наприклад, компонент S може бути замінений на пролін.

Інший набір амінокислот, придатний для модифікації, включає амінокислоти в шарнірній

35 області, що впливають на зв'язування молекули, яка містить важкий ланцюг з рецептором, що зв'язується з F<sub>c</sub>, і інтерналізацію зв'язаного антитіла. У молекулах IgG1 до таких амінокислот належно залишки з приблизно 233 по приблизно 237 (Glu-Leu-Leu-Gly-Gly); (SEQ ID NO:49) із приблизно 252 по приблизно 256 (Met-Ile-Ser-Arg-Thr) (SEQ ID NO:50) і з приблизно 318 (Glu) по приблизно 331 (Pro), включаючи, наприклад, Lys<sub>320</sub>, Lys<sub>322</sub> і Pro<sub>329</sub>.

40 Використання повністю антитіл людини особливо бажано при терапевтичному впливі на людей-пацієнтів. Антитіла людини можуть готуватися з застосуванням різних методів, відомих фахівцям у даній галузі, у тому числі методів фаг-дисплею, описаних вище, з використанням бібліотеки антитіл людини, отриманих з імуноглобулінових послідовностей людини, див. патенти США №№ 4444887 і 4716111; і WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 і WO 91/10741. Методики з робіт Cole et al. і Boerder et al. також можуть застосовуватися для приготування моноклональних антитіл людини (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss (1985); і Boerner et al., J Immunol 147:86 (1991)).

Антитіла людини можуть бути також отримані з використанням трансгенних мишей, що 50 нездатні до експресії функціональних ендогенних імуноглобулінів, але які також експресують певні гени імуноглобуліну людини. Наприклад, генні комплекси важкого і легкого ланцюгів імуноглобуліну людини можуть вводитися в ембріональні стовбурові клітини миші випадковим чином або за допомогою гомологічної рекомбінації. В альтернативному варіанті варіабельна область людини, константна область і D-область можуть вводитися в мишачі ембріональні стовбурові клітини на додаток до генів важкого і легкого ланцюга людини. Мишачі гени важкого і легкого ланцюга імуноглобуліну можна перевести в нефункціональний стан окремо або одночасно з введенням локусів імуноглобуліну людини за допомогою гомологічної рекомбінації. Зокрема, гомозиготна делеція в області JH перешкоджає ендогенній продукції антитіла. Модифіковані ембріональні стовбурові клітини розмножують і проводять їх мікроін'єкцію в 60 бластоцисти для одержання химерних мишей. Від химерних мишей потім виводять гомозиготне



потомство, що експресує антитіла людини, див., наприклад, Jakobovitis et al., Proc Natl Acad Sci USA 90:2551 (1993); Jakobovitis et al., Nature 49 362:255 (1993); Bruggermann et al., Year in Immunol 7:33 (1993); і Duchosal et al, Nature 355:258 (1992)).

Трансгенні миші звичайним чином піддаються імунізації цитокином IL-4 або IL-13, наприклад повною послідовністю IL-4 або IL-13 або її частиною. Моноклональні антитіла, орієнтовані проти IL-4 і IL-13, можуть бути отримані від імунізованих трансгенних мишей за допомогою стандартної гібридомної технології. Трансгени імуноглобуліну людини, накопичені трансгенними мишами, реорганізуються під час диференціації В-клітин і потім піддаються класовому переключенню і соматичній мутації. Таким чином, за допомогою даної методики є можливість продукувати терапевтично застосовні антитіла IgG, IgA, IgM і IgE. Огляд див. у роботі Lonberg et al., Int Rev Immunol 13:65-93 (1995). Обговорення продукції антитіл людини і моноклональних антитіл людини і протоколів одержання таких антитіл: див., наприклад, WO 98/24893; WO 92/01047; WO 96/34096 і WO 96/33735; EPO No. 0 598 877; і патенти США №№ 5413923; 5625126; 5633425; 5569825; 5661016; 5545806; 5814318; 5885793; 5916771 і 5939598. Крім того, такі компанії як Amgen (Fremont, CA), Genpharm (San Jose, CA) і Medarex, Inc. (Princeton, NJ) можуть залучатися для постачання антитіл людини, націлених проти IL-4 і (або) IL-13, з використанням технології, що аналогічна наведеній вище.

Крім того, mAb людини можуть бути приготовлені імунізацією мишей, яким трансплантовані лейкоцити периферичної крові людини, спленоцити або кістковий мозок (наприклад, методика тріом XTL Biopharmaceuticals, Israel). Повністю антитіла людини, що розпізнають вибраний епітоп, можуть бути отримані з використанням методики, що називається "направленою селекцією". У межах цього підходу відібране нелюдське моноклональне антитіло, наприклад мишаче антитіло, використовується для направленої селекції повністю антитіла людини, що розпізнає той самий епітоп (Jespersen et al., Bio/technology 12:899 (1988)).

При використанні рекомбінантних методик варіант антитіла може продукуватися внутрішньоклітинно, у периплазматичному просторі, або прямо секретуватися в середовище. Якщо варіант антитіла продукується внутрішньоклітинно, на першому етапі можна відокремити залишки частинок, хазяїни або фрагменти після лізису, наприклад за допомогою центрифугування або ультрафільтрації. У роботі Carter et al., Bio/Technology 10:163 (1992) описана процедура ізолювання антитіл, що секретуються в периплазматичний простір *E. coli*. Коротко, клітинну пасту обробляють ацетатом натрію (pH 3,5) і EDTA. Залишки клітин можна видалити центрифугуванням. Якщо варіант антитіла секретують у середовище, супернатант від такої системи експресії зазвичай спочатку концентрують за допомогою комерційно доступних фільтрів для концентрації білків, наприклад системи ультрафільтрації Amicon або Millipore Pellicon. Для інгібування протеолізу може додаватися інгібітор протеази, наприклад PMSF, а також можна включити антибіотики, щоб перешкодити росту випадкових забруднювачів.

Препарат антитіл, приготовлений із клітин, може очищуватися з використанням, наприклад, хроматографії на гідроксіапатиті, гель-електрофорезу, діалізу й афінної хроматографії. Придатність білка А або білка G як афінного ліганду залежить від виду і ізотипу будь-якого домену F<sub>c</sub> імуноглобуліну, що міститься у варіанті антитіла. Білок А може застосовуватися для очищення антитіл, в основі яких лежать важкі ланцюги IgG1, IgG2 або IgG4 людини (Lindmark et al., J Immunol Meth 62:1 (1983)). Білок G може використовуватися для ізотипів мишей і IgG3 людини (Guss et al., EMBO J 5:1567 (1986)). Як матриця, з яким зв'язується афінний ліганд, найчастіше використовується агароза, але існують і інші матриці. Механічно міцні матриці, наприклад скло з регульованою пористістю або полі(стирол-дивініл)бензол, допускають використання більш високих швидкостей потоку і дозволяють досягати більш коротких часів обробки в порівнянні з агарозою. Якщо у варіант антитіла включений домен CH3, для очищення зручно використовувати смолу Bakerbond ABXTM (JT Baker; Phillipsburg, NJ). Залежно від виділюваного антитіла і його варіанта можуть також застосовуватися інші методики очищення білка, наприклад фракціонування на іонообмінній колонці, осадження етанолом, зворотно-фазова ВЕРХ, хроматографія на силікагелі, хроматографія на гепарин-агарозі, хроматографія на аніонообмінній або катіонообмінній смолі (наприклад на колонці з поліаспарагіновою кислотою), хроматофокусування, SDS-PAGE і осадження сульфатом амонію.

Після будь-якої стадії (стадій) попереднього очищення можна провести хроматографію з гідрофобною взаємодією при низьких pH для суміші, що містить антитіло, яке представляє інтерес, або його варіант і домішки, в умовах елюювання буфером при pH в інтервалі приблизно 2,5-4,5, що переважно проводиться при низьких концентраціях солей (наприклад в інтервалі приблизно 0-0,25 М солі).

Антитіла даного винаходу можуть бути біспецифічними. Біспецифічні антитіла можуть бути моноклональними, переважно антитілами людини або гуманізованими антитілами, що мають

специфічність зв'язування принаймні двох різних антигенів. У переважному здійсненні біспецифічне антитіло, його фрагмент і т.д. демонструє специфічності зв'язування, спрямовані на IL-4 і IL-13.

Методи приготування біспецифічних антитіл добре відомі фахівцям у даній галузі. Зазвичай рекомбінантна продукція біспецифічних антитіл основана на спільній експресії пар важкий ланцюг/легкий ланцюг двох імуноглобулінів, причому два важкі ланцюги мають різні специфічності (Milstein et al., *Nature* 305:537 (1983)). Внаслідок випадкового розподілу важких і легких ланцюгів імуноглобуліну гібридами (квадрами) продукують можливу суміш десяти різних молекул антитіл, з яких лише одна має правильну біспецифічну структуру. Очищення потрібної молекули зазвичай проводиться за допомогою декількох стадій афінної хроматографії. Аналогічні процедури описані в заявці WO 93/08829 і в роботі Traupecker et al., *EMBO J* 10:3655 (1991). Інші методи приготування біспецифічних антитіл приводяться, наприклад, у Kufer et al., *Trends Biotech* 22:238-244, 2004.

Варіабельні домени антитіла з бажаними специфічностями зв'язування можуть зливатися з послідовностями константних доменів імуноглобулінів. Злиття переважно проводиться з константним доменом важкого ланцюга імуноглобуліну, що містить принаймні частину шарнірних областей CH2 і CH3-. Принаймні в одному з продуктів злиття може міститися константна область першого важкого ланцюга (CH1), що включає сайт, необхідний для зв'язування легкого ланцюга. ДНК, що кодують продукти злиття важкого ланцюга імуноглобуліну, і, якщо бажано, легкий ланцюг імуноглобуліну вводяться в різні вектори експресії і спільно трансформуються в придатному організмі хазяїна. Більш докладно про одержання біспецифічних антитіл можна довідатися, наприклад, у роботі Suresh et al., *Meth Enzym* 121:210 (1986).

Гетерокон'югати антитіл також складають частину даного винаходу. Гетерокон'югати антитіл складаються з двох ковалентно зв'язаних антитіл. Такі антитіла, наприклад, були запропоновані для орієнтування клітин імунної системи на небажані клітини (патент США № 4676980). Передбачається, що антитіла можуть бути приготовлені *in vitro* за допомогою відомих методів синтетичної хімії білків, у тому числі з застосуванням агентів для перехресних зшивок. Наприклад, імунотоксини можуть конструюватися за допомогою реакції дисульфідного обміну або за рахунок утворення тіоефірного зв'язку. Прикладами придатних для цього реагентів є імінотіолат і метил-4-меркаптобутиримідат, а також запропоновані, наприклад, у патенті США № 4676980.

Крім того, можна одержати однодоменні антитіла до IL-4 і (або) IL-13. Приклади подібної технології були описані в заявці WO9425591 для випадку антитіл, отриманих з важкого ланцюга Ig верблюда, а також у US20030130496, де обговорюється виділення однодоменних повністю антитіл людини з фагових бібліотек.

В альтернативному варіанті методики, описані при одержанні одноланцюжкових антитіл (патент США № 4946778; Bird, *Science* 242:423 (1988); Huston et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 85:5879 (1988); і Ward, et al., *Nature* 334:544 (1989)), можуть бути адаптовані для одержання одноланцюжкових антитіл. Одноланцюжкові антитіла утворюються за допомогою зв'язування фрагментів важкого і легкого ланцюгів області F<sub>v</sub> через амінокислотний місток з утворенням одноланцюжкового поліпептиду. Можна також використовувати методики зборки функціональних фрагментів F<sub>v</sub> у *E. coli* (Skerra et al., *Science* 242:1038 (1988)).

Даний винахід включає антитіла, рекомбінантно злиті або хімічно кон'юговані (у тому числі ковалентно і нековалентно кон'юговані) з поліпептидом. Злиті або кон'юговані антитіла даного винаходу можуть використовуватися для простоти очищення, див., наприклад, WO 93/21232; EP 439095; Naramura et al., *Immunol Lett* 39:91 (1994); патент США № 5474981; Gillies et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 89:1428 (1992); і Fell et al., *J Immunol* 146:2446 (1991). Амінокислотна послідовність маркера може являти собою гексагістидиновий пептид, наприклад подібний до маркера у векторі pQE (QIAGEN, Inc., Chatsworth, CA), серед інших, багато з яких комерційно доступні, Gentz et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 86:821 (1989). До інших пептидних маркерів, зручних для очищення, серед інших, відносяться маркер "HA", що відповідає епітопа, отриманому з гемаглютинувального білка грипу (Wilson et al., *Cell* 37:767 (1984)) і маркер "flag".

Можна також створити одноланцюжкові пептидні зв'язуючі молекули, в яких області важкого і легкого ланцюга F<sub>v</sub> з'єднані одна з одною. Одноланцюжкові антитіла ("scF<sub>v</sub>") і метод їх конструювання описані, наприклад, у патенті США № 4946778. В альтернативному варіанті аналогічними способами можна сконструювати і експресувати F<sub>ab</sub>. Всі повністю або частково антитіла людини можуть бути менш імуногенними, ніж повністю мишачі моноклональні антитіла, фрагменти й одноланцюжкові антитіла також можуть бути менш імуногенними.

Антитіла або фрагменти антитіл можуть виділятися з фагових бібліотек антитіл, отриманих за допомогою методик, описаних у McCafferty et al., Nature 348:552 (1990). Clarkson et al., Nature 352:624 (1991) і Marks et al., J Mol Biol 222:581 (1991) розглядають виділення антитіл миші й антитіл людини, відповідно, з використанням фагових бібліотек. У наступних публікаціях описана продукція високоафінних (в інтервалі нм) антитіл людини за допомогою перестановки в ланцюзі (Marks et al., Bio/Technology 10:779 (1992)), а також метод комбінаторної інфекції і рекомбінація *in vivo* як стратегії побудови дуже великих фагових бібліотек (Waterhouse et al., Nucl Acids Res 21:2265 (1993)). Таким чином, подібні методики є практичною альтернативою традиційним гібридомним методикам в одержанні моноклональних антитіл.

Потенційні антитіла анти-IL-4 і (або) IL-13 аналізувалися методами твердофазного імуоферментного аналізу (ELISA), FACS, вестерн-блоттингом або іншими імуохімічними методами, відомими фахівцям у даній галузі.

Щоб визначити, чи зв'язується той або інший конкретний гомолог антитіла з людським IL-4 і (або) IL-13, можна використовувати будь-який стандартний метод аналізу зв'язування. До зручних методів аналізу зв'язування IL-4 і IL-13 належать аналіз FACS, аналіз ELISA, поверхневий плазмонний резонанс (Biacore), радіоімунологічні методи аналізу і їм подібні, які детектують зв'язування антитіла з IL-4 і (або) IL-13 і виникаючі в результаті функції. Для таких аналізів зручні розглянуті тут такі, що мають повну довжину і розчинні форми IL-4 і IL-13 людини. Зв'язування антитіла або гомолога з IL-4 і (або) IL-13, або з його розчинними фрагментами, можна легко реєструвати за рахунок використання другого антитіла, специфічного до імуоглобулінів виду, від якого отримане антитіло або гомолог.

Щоб встановити, чи блокує в помітному ступені те чи інше антитіло або гомолог зв'язування з IL-4 і (або) IL-13, можна скористатися будь-яким зручним методом конкурентного аналізу. До придатних методів аналізу, наприклад, належать методи ELISA, методи FACS, радіоімунологічні методи аналізу і їм подібні, які дозволяють кількісно визначити здатність антитіла або гомолога конкурувати з IL-4 і (або) IL-13. Переважно, оцінюється здатність ліганду блокувати зв'язування міченого IL-4 і (або) IL-13 людини з іммобілізованим антитілом або гомологом.

Антитіла даного винаходу можуть описуватися або характеризуватися з точки зору епітопа (епітопів) або частини (частин) IL-4 і (або) IL-13, що антитіло розпізнає або з яким воно специфічно зв'язується. Епітоп (епітопи) або частина (частини) поліпептидів, як описано в даному документі, можуть характеризуватися, наприклад за N-кінцевими і C-кінцевими положеннями, за довжиною безперервного ланцюга амінокислотних залишків, конформаційними епітопами і т.п.

Антитіла даного винаходу можуть також описуватися або характеризуватися за перехресною реакційною здатністю. У сферу охоплення даного винаходу також включаються антитіла, що зв'язують поліпептиди IL-4 і (або) IL-13, що характеризуються принаймні 95 %, принаймні 90 %, принаймні 85 %, принаймні 80 %, принаймні 75 %, принаймні 70 %, принаймні 65 %, принаймні 60 %, принаймні 55 % і принаймні 50 % ідентичністю (яка розраховується за допомогою методів, відомих фахівцям у даній галузі й описаних у даному документі) у порівнянні з IL-4 і (або) IL-13.

Антитіла даного винаходу можуть також описуватися або характеризуватися за афінністю зв'язування з представляючими інтерес IL-4 і (або) IL-13. Антитіла анти-IL-4 і (або) анти-IL-13 можуть зв'язуватися з  $K_D$  менше приблизно  $10^{-7}$  М, менше приблизно  $10^{-6}$  М або менше приблизно  $10^{-5}$  М. Більш висока афінність зв'язування розглянутого антитіла може бути більш бажана, наприклад з рівноважною константою дисоціації  $K_D$  від приблизно  $10^{-8}$  до приблизно  $10^{-15}$  М, від приблизно  $10^{-8}$  до приблизно  $10^{-12}$  М, від приблизно  $10^{-9}$  до приблизно  $10^{-11}$  М або від приблизно  $10^{-8}$  до приблизно  $10^{-10}$  М. У даному винаході також пропонуються антитіла, які конкурентно інгібують зв'язування антитіла з епітопом даного винаходу, що визначається будь-яким методом, відомим фахівцям у даній галузі, для реєстрації конкурентного зв'язування, наприклад описаними в даному документі методами імунологічного аналізу. У переважних прикладах здійснення антитіло конкурентно інгібуює зв'язування з епітопом принаймні на 95 %, принаймні на 90 %, принаймні на 85 %, принаймні на 80 %, принаймні на 75 %, принаймні на 70 %, принаймні на 60 % або принаймні на 50 %.

У сферу охоплення даного винаходу також включаються кон'югати, що містять антитіло, яке представляє інтерес. Кон'югати складаються з двох основних компонентів: розглянутого антитіла і другого компонента, яким може бути зв'язувальний клітини агент, цитотоксичний агент і т.п.

Використовуваний у даному документі термін "зв'язувальний клітини агент" належить до речовини, що специфічно розпізнає і зв'язує молекулу на поверхні клітини. Так, як зв'язувальна клітина агента може виступати антиген CD, патогенний антиген, наприклад вірусний антиген,

диференціювальний антиген, раковий антиген, клітинноспецифічний антиген, тканинспецифічний антиген, Ig або подібна до Ig молекула і т.п.

Зв'язуючі клітини агенти можуть бути будь-якого типу, що відомий у даний час або стає відомим у майбутньому, до них належать пептиди, небілкові сполуки, сахариди, нуклеїнові кислоти, ліганди, рецептори і т.п., або їх комбінації. Зв'язуючим клітини агентом може бути будь-яка сполука, що зв'язує клітину як специфічним, так і неспецифічним чином. Як правило, як агент може виступати антитіло (особливо моноклональне антитіло), лімфокіни, гормони, фактори росту, вітаміни, молекули-переносники поживних речовин (наприклад трансферин) чи будь-яка інша зв'язуюча клітину молекула або речовина.

До інших прикладів зв'язуючих клітину агентів, що можуть використовуватися в даному винаході, належать: поліклональні антитіла, моноклональні антитіла і фрагменти антитіл, наприклад,  $F_{ab}$ ,  $F_{ab}'$ ,  $F_{(ab)2}$  і  $F_v$  (Parham, J. Immunol. 131:2895-2902 (1983); Spring et al., J. Immunol. 113:470-478 (1974); і Nisonoff et al., Arch. Biochem. Biophys. 89: 230-244 (1960)).

Другим компонентом також може бути цитотоксичний агент. Використовуваний у даному документі термін "цитотоксичний агент" належить до речовини, що пригнічує або блокує функціонування або ріст клітин і (або) викликає деструкцію клітин. Так, як цитотоксичний агент може виступати таксол, майтансиноїд, наприклад DM1 або DM4, CC-1065 або CC-1065 аналог, рицин, мітоміцин C і т.п. У деяких прикладах здійснення цитотоксичний агент, подібно до будь-якого зв'язуючого агента кон'югата даного винаходу, ковалентно зв'язаний з антитілом, що представляє інтерес, прямо або через розщеплюваний або нерозщеплюваний лінкер.

Прикладами придатних майтансиноїдів є майтансинол і аналоги майтансинолу. Майтансиноїди пригнічують утворення мікроканальців і найвищою мірою токсичні для клітин ссавців.

До прикладів придатних аналогів майтансинолу належать такі, що мають модифіковане ароматичне кільце, а також аналоги з модифікаціями в інших положеннях. Такі придатні для використання майтансиноїди пропонуються в патентах США №№ 4424219; 4256746; 4294757; 4307016; 4313946; 4315929; 4331598; 4361650; 4362663; 4364866; 4450254; 4322348; 4371533; 6333410; 5475092; 5585499 і 5846545.

Приклади придатних аналогів майтансинолу з модифікованим ароматичним кільцем включають: (1) C-19-дехлор (патент США № 4256746) (одержуваний, наприклад, ЛАН-відновленням ансамітоцину P2); (2) C-20-гідрокси (або C-20-деметил) +/- C-19-дехлор (патенти США № 4361650 і 4307016) (одержуваний, наприклад, деметилюванням з використанням стрептоміцетів або актиноміцетів чи дехлоруванням із застосуванням літійалюмінійгідриду (ЛАН)); і (3) C-20-деметокси, C-20-ацилокси (-OCOR), +/- дехлор (патент США № 4294757) (одержуваний ацилюванням під дією ацилхлоридів).

Приклади придатних аналогів майтансинолу з модифікаціями в інших положеннях включають: (1) C-9-SH (патент США № 4424219) (одержуваний за реакцією майтансинолу з  $H_2S$  або  $P_2S_5$ ); (2) C-14-алкоксиметил (деметокси/ $CH_2OR$ ) (патент США № 4331598); (3) C-14-гідроксиметил або ацилоксиметил ( $CH_2OH$  або  $CH_2OAc$ ) (патент США № 4450254) (одержуваний з нокардій); (4) C-15-гідрокси/ацилокси (патент США № 4364866) (одержуваний конверсією майтансинолу стрептоміцетами); (5) C-15-метокси (патенти США № 4313946 і 4315929) (що виділяється з *Trewia nudiflora*); (6) C-18-N-деметил (патенти США № 4362663 і 4322348) (одержуваний деметилюванням майтансинолу стрептоміцетами); і (7) 4,5-деокси (патент США № 4371533) (одержуваний відновленням майтансинолу під дією трихлористого титану/ЛАН).

Цитотоксичні кон'югати можуть бути отримані методами *in vitro*. Для зв'язування цитотоксичного агента, ліків або проліків з антитілом, як правило, використовується лінкерна група. Придатні лінкерні групи відомі фахівцям у даній галузі, до них належать дисульфідні групи, тіоефірні групи, кислотонестійкі групи, фотолабільні групи, групи, нестійкі до впливу пептидази, а також групи, нестійкі до впливу естерази. Наприклад, кон'югати можуть конструюватися за допомогою реакції дисульфідного обміну або за рахунок утворення тіоефірного зв'язку між антитілом, що представляє інтерес, і ліками або проліками.

Як обговорювалося вище, у даному винаході пропонуються послідовності виділених нуклеїнових кислот, що кодують описані в даному документі антитіло або його функціональний фрагмент або варіант, конструкції векторів, що включають нуклеотидну послідовність, що кодує зв'язувальну частину антитіла або функціонального фрагмента IL-4 і (або) IL-13 даного винаходу, клітини-хазяїни, що несуть такий вектор, а також рекомбінантні методи продукції такого поліпептиду.

Вектор, як правило, складається з компонентів, відомих фахівцям у даній галузі, і зазвичай, серед інших, включає один або декілька перерахованих нижче елементів: сигнальна

послідовність, точка початку реплікації, один або декілька маркерів або генів селекції, послідовності, що сприяють і (або) стимулюють трансляцію, енхансер і т.п. Таким чином, вектори експресії містять нуклеотидну послідовність, що функціонально зв'язана з такими придатними транскрипційними або трансляційними регуляторними нуклеотидними послідовностями, наприклад похідними генів ссавців, мікробів, вірусів або комах. До прикладів додаткових регуляторних послідовностей належать оператори, рибосомальні сайти зв'язування мРНК і (або) інші відповідні послідовності, що контролюють транскрипцію і трансляцію, наприклад їх ініціювання і припинення. Нуклеотидні послідовності є "функціонально зв'язаними", якщо регуляторна послідовність має функціональне відношення до нуклеотидної послідовності відповідного поліпептиду. Так, нуклеотидна послідовність промотору функціонально зв'язана, наприклад, з послідовністю важкого ланцюга антитіла, якщо нуклеотидна послідовність промотору контролює транскрипцію такої нуклеотидної послідовності.

Крім того, у вектори експресії можуть вбудовуватися послідовності, що кодують відповідні сигнальні пептиди, які зазвичай не є природним чином зв'язаними з послідовностями важкого і (або) легкого ланцюгів антитіла. Наприклад, нуклеотидна послідовність сигнального пептиду (секреторний лідер) може бути злита всередині рамки з поліпептидною послідовністю, так щоб антитіло секретувалося у периплазматичний простір або в середовище. Сигнальний пептид, що діє в передбачуваних клітинах-хазяїнах, підсилює позаклітинну секрецію відповідного антитіла або його частини. Сигнальний пептид може відщеплюватися від поліпептиду при виділенні антитіла з клітини. Приклади таких секреторних сигналів добре відомі і включають, наприклад, описані в патентах США № 5698435; 5698417 і 6204023.

Як вектор може виступати плазмід, одноланцюжковий або дволанцюжковий вірусний вектор, одноланцюжкова або дволанцюжкова РНК або ДНК фагового вектора, фагмід, або будь-який інший носій представляючого інтерес трансгена. Такі вектори можуть вводитися в клітини як полінуклеотиди, з використанням добре відомих методик введення ДНК і РНК у клітини. Вектори, у випадку фагових або вірусних векторів, також можуть вводитися в клітини у формі вірусу в оболонці або в капсулі з використанням добре відомих методик інфекції і трансдукції. Вірусні вектори можуть бути компетентними або дефективними відносно реплікації. В останньому випадку розмноження вірусу буде, як правило, проходити тільки в комплементарних клітинах-хазяїнах і з використанням множинних векторів, що несуть різні вірусні компоненти, необхідні для продукції частинок. Безклітинні системи трансляції можуть також застосовуватися для продукції білка з використанням РНК, отриманих з існуючих конструкцій ДНК (див., наприклад, WO 86/05807 і WO 89/01036; і патент США № 5122464).

Експресія антитіл даного винаходу може здійснюватися в будь-якій клітині-хазяїні. До прикладів клітин-хазяїнів, придатних для використання в даному винаході, належать прокаріотичні, дріжджові або вищі еукаріотичні клітини, і сюди, серед інших, входять мікроорганізми, наприклад бактерії (зокрема *E. coli*, *B. subtilis*, ентеробактер, ервінії, клібсієли, протеус, сальмонели, сератії і шигели, а також паличкоподібні бактерії, псевдомонади і стрептоміцети), трансформовані за допомогою векторів експресії рекомбінантної ДНК бактеріофага, плазмідної ДНК або космідної ДНК, що містять кодуючі послідовності представляючого інтерес антитіла; дріжджі (наприклад сахароміцети, пічіа, актиноміцети, кльовероміцети, шизосахароміцети, кандиди, триходерма, нейроспора і гіфоміцети, такі як нейроспора, пеніцил, толіпокладіум і аспергіли), трансформовані за допомогою рекомбінантних векторів експресії дріжджів, що містять кодуючі антитіла послідовності; клітинні системи комах, інфіковані рекомбінантними векторами експресії вірусу (наприклад, бакуловірусу), що містять кодуючі антитіла послідовності; рослинні клітинні системи, інфіковані рекомбінантними векторами експресії вірусу (наприклад, вірус мозаїки кольорової капусти, CaMV; або вірус тютюнової мозаїки, TMV) або трансформовані векторами експресії рекомбінантної плазмід (наприклад, плазмід Ті), що містять кодуючі послідовності антитіла; або ж клітинні системи ссавців (наприклад, клітини COS, CHO, BHK, 293 або 3T3), що несуть рекомбінантні конструкції експресії, які містять промотори, отримані з геному клітин ссавців (наприклад, промотор металотіонеїну) або з вірусів ссавців (наприклад, пізній промотор аденовірусу або 7.5K промотор вірусу вісповакцини).

Вектори експресії для використання в прокаріотичних клітинах-хазяїнах зазвичай включають один або декілька фенотипічних селектованих маркерних генів. Фенотипічний селектований маркерний ген, наприклад, являє собою ген, що кодує білок, який забезпечує стійкість відносно антибіотиків або задовольняє аутотрофні вимоги. До прикладів придатних для використання векторів експресії для прокаріотичних клітин-хазяїнів належать отримані на основі комерційно доступних плазмід, наприклад серії векторів pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden), pGEM (Promega Biotec, Madison, WI), pET (Novagen, Madison, WI) і pRSET (Invitrogen,

Carlsbad, CA) (Studier, J Mol Biol 219:37 (1991); i Schoepfer, Gene 124:83 (1993)). До промоторним послідовностей, що зазвичай використовуються для рекомбінантних векторів експресії прокаріотичних клітин-хазяїнів, належать T7, (Rosenberg et al., Gene 56:125 (1987)),  $\beta$ -лактамаза (пеніциліназа), промоторна система лактози (Chang et al., Nature 275:615 (1978); i Goeddel et al., Nature 281:544 (1979)), промоторна система триптофану (Trp) (Goeddel et al., Nucl Acids Res 8:4057 (1980)), i tac-промотор (Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory (1990)).

У дріжджових векторах часто присутня послідовність точки початку реплікації, наприклад, від плазміди дріжджів 2(x, автономно реплікована послідовність (ARS), область промотору, послідовності поліаденілування, послідовності припинення транскрипції i ген селектованого маркера. До придатних промоторних послідовностей для векторів дріжджів, серед інших, належать промотори металотіонеїну, 3-фосфогліцераткінази (Hitzeman et al., J Biol Chem 255:2073 (1980)) або інші гліколітичні ферменти (Holland et al., Biochem 17:4900 (1978)), наприклад енолаза, гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа, гексокіназа, піруватдекарбоксилаза, фосфофруктокіназа, глюкозо-6-фосфатізомераза, 3-фосфогліцератмутаза, піруваткіназа, триозофосфатізомераза, фосфоглюкозоізомераза i глюкостіназа. Інші придатні вектори i промотори для використання в експресії дріжджів докладно описані в роботі Fleer et al., Gene 107:285 (1991). Інші придатні промотори i вектори для дріжджів i протоколів трансформації дріжджів добре відомі фахівцям у даній галузі. Протоколи трансформації дріжджів також добре відомі. Один з таких протоколів описаний у Hinnen et al., Proc Natl Acad Sci 75:1929 (1978), де проводиться відбір трансформантів  $\text{Trp}^+$  у селективному середовищі.

Застосовна будь-яка клітинна культура еукаріотів, як з культури хребетних, так i безхребетних. До прикладів клітин безхребетних належать клітини рослин i комах (Luckow et al., Bio/Technology 6:47 (1988); Miller et al., Genetic Engineering, Setlow et al., eds., vol. 8, pp. 277-9, Plenum Publishing (1986); i Maeda et al., Nature 315:592 (1985)). Наприклад, для продукції гетерологічних білків можуть використовуватися бакувірусні системи. У системі комах вірус ядерного поліедрозу Autographa californica (AcNPV) може використовуватися як вектор для експресії чужорідних генів. Вірус росте в клітинах Spodoptera frugiperda. Послідовність коду чого антитіла може клонуватися під контролем промотору AcNPV (наприклад промотору поліедрину). До інших встановленим хазяїнам належать комарі, Drosophila melanogaster i Bombyx mori. Широко доступні різноманітні вірусні штами для трансфекції, наприклад варіант L-1 AcNPV i штам Bm-5 Bombyx mori NPV. Крім того, як відомо фахівцям у даній галузі, клітинні культури рослин, наприклад бавовни, кукурудзи, картоплі, соєвих бобів, петунії, томатів i тютюну, також можуть використовуватися як хазяїни.

Використання клітин хребетних i розмноження клітин хребетних у клітинній культурі (культурі тканин) може являти собою стандартну процедуру, хоча в реальності й існують вибагливі лінії клітин, що вимагають, наприклад, спеціалізованого середовища з унікальними факторами, що харчують клітинами i т.п., див. Tissue Culture, Kruse et al., eds., Academic Press (1973). Приклади придатних для використання ліній клітин-хазяїнів ссавців включають клітини нирок мавпи; клітини мезонефроса людини; клітини нирок новонародженого хом'ячка; клітини яєчників китайського хом'ячка/-DHFR (CHO, Urlaub et al., Proc Natl Acad Sci USA 77:4216 (1980)); мишачі клітини Сертолі; клітини карциноми шийки матки людини (наприклад HeLa); клітини нирок собаки; клітини легені людини; клітини печінки людини; клітини пухлини молочної залози мишей i клітини NS0.

Клітини-хазяїни трансформують за допомогою векторів для продукції антитіл i культивують у стандартному поживному середовищі, що містить фактори росту, вітаміни, мінеральні речовини i т.п., а також індуктори, що підходять для використовуваних клітин i векторів. Широко застосовувані послідовності промотору i послідовності енхансера одержують з вірусу поліоми, аденовірусу 2, вірусу мавп 40 (SV40) i цитомегаловірусу людини (CMV). Послідовності ДНК, отримані з вірусного геному SV40, можуть використовуватися для підготовки інших генетичних елементів для експресії структурної генетичної послідовності в клітинах-хазяїнах ссавців, наприклад отриманих з SV40, ранніх i пізніх промоторів, енхансера, сайтів сплайсинга i поліаденілування. Вірусні ранні i пізні промотори особливо зручні, оскільки i той, i інший достатньо просто одержати з вірусного геному у вигляді фрагмента, що також може містити вірусну точку початку реплікації. У продажу є комерційно доступні стандартні вектори експресії для використання в клітинах-хазяїнах ссавців.

Для культивування клітин-хазяїнів придатні комерційно доступні середовища, наприклад середовище Хема F10, мінімальне підтримуюче середовище (MEM), RPMI-1640 i модифіковане Дульбекко середовище Ігла (DMEM). Крім того, будь-яке середовище з описаних у Ham et al.,

Meth Enzymol 58:44 (1979) і Barnes et al., Anal Biochem 102:255 (1980), і в патентах США №№ 4767704; 4657866; 4560655; 5122469; 5712163 чи 6048728, може використовуватися як культуральне середовище для клітин-хазяїнів. Кожне з цих середовищ може при необхідності бути доповнене гормонами і (або) іншими факторами росту (такими як інсулін, трансферин або епідермальний фактор росту), солями (наприклад хлоридами, зокрема хлоридами натрію, кальцію або магнію; і фосфатами), буферами (наприклад HEPES), нуклеотидами (наприклад аденозин і тимідин), антибіотиками, мікроелементами (які визначаються як неорганічні сполуки, що зазвичай є присутніми у кінцевих концентраціях, що лежать у мікромолярному діапазоні), а також глюкозою або еквівалентним їй джерелом енергії. Залежно від поставленої мети можуть включатися і будь-які інші необхідні добавки у відповідних концентраціях. Умови культивування, наприклад температура, рН і т.п., як відомо фахівцям у даній галузі, підходять для клітин і забезпечують бажану експресію трансгена.

За допомогою будь-якого методу, відомого фахівцям у даній галузі, можна одержати представляючі інтерес полінуклеотиди і визначити нуклеотидну послідовність таких полінуклеотидів. Наприклад, якщо відома нуклеотидна послідовність антитіла, полінуклеотид, який кодує антитіло, може бути складений з хімічно синтезованих олігонуклеотидів (наприклад, як це описано в Kutmeier et al., Bio/Techniques 17:242 (1994)), а потім зв'язані з лігандами полінуклеотиди ампліфікують, наприклад, за допомогою ПЛР.

Як альтернативу можна створити полінуклеотид, що кодує антитіло, з нуклеїнової кислоти, що експресує, та або інша клітина. Якщо клон, що містить нуклеїнову кислоту, що кодує конкретне антитіло, недоступний, але послідовність молекули антитіла відома, нуклеїнову кислоту, що кодує імуноглобулін, можна одержати з придатного джерела, наприклад бібліотеки, що може бути специфічною для продукуючих антитіло клітин, наприклад клітин гібридами, відібраних для експресії антитіла даного винаходу. Для ПЛР-ампліфікації можуть бути підготовлені придатні праймери. Ампліфіковані нуклеїнові кислоти, отримані за допомогою ПЛР, можуть потім клонуватися в репліковані вектори клонування за допомогою будь-якого методу, відомого фахівцям у даній галузі.

Після того як нуклеотидна послідовність і відповідна послідовність антитіла встановлені, можливі маніпуляції нуклеотидною послідовністю антитіла, для того щоб одержати еквіваленти, що представляють інтерес, описані в даному винаході, з використанням методів маніпуляції нуклеотидними послідовностями, що відомі фахівцям у даній галузі, наприклад методики рекомбінантної ДНК, сайт-направлений мутагенез, ПЛР і т.п. (див., наприклад, Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory (1990); і Ausubel et al., eds., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1998), для того щоб одержати антитіла, що містять різні амінокислотні послідовності, наприклад для проведення заміщень, делецій і (або) вставок амінокислот.

Амінокислотна послідовність важкого і (або) легкого ланцюгів варіабельного домену може аналізуватися на предмет ідентифікації послідовностей CDR за допомогою добре відомих методів, наприклад зіставленням з відомими амінокислотними послідовностями інших важких і легких ланцюгів варіабельних областей, для того щоб визначити області гіперваріабельності послідовності. Застосовуючи стандартні методики рекомбінантної ДНК, можна ввести одну або декілька CDR в остовні області, наприклад в остовні області білка людини, для того щоб гуманізувати нелюдське антитіло, як описано вище. Полінуклеотид, що представляє інтерес, отриманий за рахунок комбінації остовних областей і однієї або декількох CDR, кодує антитіло, що специфічно зв'язує IL-4 і (або) IL-13 або принаймні його ED домен. Такі методи, наприклад, можуть використовуватися для проведення замінів або делецій амінокислот для одного або декількох цистеїнових залишків варіабельної області, що беруть участь в утворенні внутрішньоланцюжкового дисульфідного зв'язку, для того, щоб одержати молекулу антитіла без одного або декількох внутрішньоланцюжкових дисульфідних зв'язків.

Антитіла або фрагменти антитіла за даним винаходом можуть бути використані для виявлення IL-4 і (або) IL-13, а значить, і клітин, що експресують IL-4 і (або) IL-13, у біологічному зразку як *in vitro*, так і *in vivo*. В одному з прикладів здійснення антитіла анти-IL-4 і (або) IL-13 даного винаходу використовується, для того щоб встановити присутність і рівень IL-4 і (або) IL-13 у тканинах або у клітинах, виділених із тканини. Рівні IL-4 і (або) IL-13 у тканині або зразку біопсії можна визначати, наприклад, за допомогою імуноаналізу для антитіл або фрагментів антитіл даного винаходу. Тканина або проба її біопсії можуть заморожуватися або фіксуватися. Такі ж або інші методи можуть використовуватися, щоб встановити інші властивості IL-4 і (або) IL-13, наприклад його рівень, клітинну локалізацію, рівні мРНК, їх мутації і т.п.

Описаний вище спосіб, наприклад, може використовуватися для діагностики раку в пацієнта, що підданий ризику виникнення раку або в якого передбачається рак, при цьому рівень IL-4 і

(або) IL-13, реєстрований у згаданого пацієнта, зіставляється з нормальним у здорового пацієнта або зі стандартом. Розглянутий аналіз також може використовуватися для діагностики артриту або інших аутоімунних захворювань, для яких характерна інфільтрація і концентрація В-клітин поряд з розвитком диференційованої лімфоїдної тканини.

У даному винаході також пропонуються моноклональні антитіла, гуманізовані антитіла і їхні фрагменти, що зв'язують епітопи, в які вводиться мітка для наступного використання в дослідницьких або діагностичних додатках. У деяких прикладах здійснення мітка є радіоактивною, також як мітка використовується флуорофор, хромофор, контрастний агент або іон металу.

Пропонується також спосіб діагностики, в якому згадані мічені антитіла або їхні фрагменти, що зв'язують епітоп, вводяться пацієнту, у якого передбачається рак, артрит, аутоімунне захворювання або інші опосередковані IL-4 і (або) IL-13 хвороби, і вимірюється або відслідковується розподіл мітки в організмі пацієнта.

Антитіла або їхні фрагменти, пропоновані в даному винаході, можуть використовуватися як агенти для афінного очищення. У цьому процесі антитіла іммобілізують на твердій фазі, наприклад смолі з декстраном або агарозою або на фільтрувальному папері, за допомогою методів, відомих фахівцям у даній галузі. Іммобілізоване антитіло обробляється зразком, що містить IL-4 і (або) IL-13 або несущі його клітини, що піддаються очищенню, після чого підкладку промивають придатним розчинником, що видалить практично весь матеріал зі зразка, крім IL-4 і (або) IL-13 або клітин, що піддаються очищенню, оскільки вони зв'язані з іммобілізованим антитілом, що становить інтерес для даного винаходу. Нарешті, підкладку промивають іншим придатним розчинником, таким як гліциновий буфер, pH 5,0, що забезпечує вивільнення IL-4 і (або) IL-13 або клітин з розглянутого антитіла.

Для діагностичних додатків розглянуте антитіло, як правило, буде позначатися контрастною речовиною. Існує множина різних міток, що, загалом, можна згрупувати в наступні категорії: (а) радіоізотопи, наприклад  $^{35}\text{S}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$  і  $^{131}\text{I}$  (антитіло може позначатися радіоізотопом на основі методик, наприклад, описаних у роботі *Current Protocols in Immunology*, Vol. 12, Coligen et al., ed., Wiley-Interscience, New York (1991), і радіоактивність може вимірюватися на основі сцинтиляційного рахунка); (б) флуоресцентні мітки, наприклад хелати рідкоземельних металів (хелати Європію), флуоресцеїн і його похідні, родамін і його похідні, дансил, лісамін, фікоеритрин і Техаський червоний, флуоресцентні мітки можуть кон'югуватися з антитілом за допомогою методики, викладеної, наприклад, у *Current Protocols in Immunology*, як згадувалося вище, причому флуоресценція може кількісно визначатися за допомогою флуориметра; і (в) існують також мітки у вигляді субстратів різних ферментів (патент США № 4275149 містить огляд), причому фермент, як правило, каталізує хімічну трансформацію хромогенного субстрату, що може визначатися за допомогою різних методик, наприклад, фермент може каталізувати зміну кольору субстрату, що може реєструватися спектрофотометрично, або ж фермент може впливати на флуоресценцію або хемілюмінесценцію субстрату. Відомі методи кількісного визначення зміни флуоресценції, наприклад за допомогою люмінометра, або ж реєстрації передачі енергії від мітки флуоресцентному акцептору. До прикладів ферментативних міток належать люциферази (наприклад люцифераза світлячка і бактеріальна люцифераза; патент США № 4737456), люциферин, 2,3-дигідрофалазіндіони, малатдегідрогеназа, уреаза, пероксидаза, наприклад пероксидаза з хрому (HRPO), лужна фосфатаза,  $\beta$ -галактозидаза, глюкоамілаза, лізоцим, сахаридоксидази (наприклад глюкозоксидаза, галактозоксидаза і глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа), гетероциклічні оксидази (наприклад уриказа і ксантинооксидаза), лактопероксидаза, мікропероксидаза і т.п. Методики кон'югування ферментів з антитілами описані в O'Sullivan et al., *Meth Enz*, ed. Langone & Van Vunakis, Academic Press, New York, 73 (1981).

На випадок використання таких міток існують придатні субстрати, наприклад: (i) для пероксидази з хрому з перекисом водню як субстрату, причому перекис водню окиснює попередник барвника (наприклад ортофенілєндіамін (OPD) або 3,3',5,5'-тетраметилбензидінгідрохлорид (ТМВ)); (ii) для лужної фосфатази (AP) як хромогенний субстрат виступає п-нітрофенілфосфат; і (iii) для  $\beta$ -D-галактозидази ( $\beta$ -D-Gal) використовується хромогенний субстрат (наприклад п-нітрофеніл- $\beta$ -D-галактоза) або флуорогенний субстрат, наприклад 4-метилумбеліферил- $\beta$ -D-галактозидаза.

Кваліфікованим фахівцям у даній галузі доступні й інші поєднання ферментів-субстратів. Загальний огляд див. у патентах США № 4275149 і 4318980.

У деяких випадках мітка непрямым чином кон'югується з антитілом. Наприклад, антитіло може кон'югуватися з біотином, і кожний зі згаданих вище репортерів може кон'югуватися з авідином або навпаки. Біотин селективно зв'язується з авідином, і в цих умовах мітка може



посередньо кон'югуватися з антитілом. В альтернативному варіанті для одержання непрямої кон'югації мітки антитіло зв'язується з невеликим гаптенем (наприклад дігоксином), і один з різних видів міток або репортерів, згаданих вище, кон'югується з антитілом анти-дигоксину. Таким чином, використовуючи друге антитіло, можна провести непряму кон'югацію мітки з антитілом або мутеїном.

В іншому прикладі здійснення винаходу в антитіло необов'язково вводиться мітка, і його наявність може реєструватися за допомогою іншої форми другого антитіла - міченого антитіла, що зв'язується з розглянутим антитілом.

Антитіла даного винаходу можуть використовуватися в будь-якому відомому методі аналізу, наприклад аналізі конкурентного зв'язування, прямих і непрямих сендвічевих аналізах і аналізах імунопреципітації. Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques (CRC Press, Inc. 1987).

Аналіз конкурентного зв'язування спирається на здатність міченого стандарту конкурувати з досліджуванним зразком у процесі зв'язування з обмеженою кількістю антитіла. Кількість антигену у досліджуваному зразку зворотно пропорційна кількості стандарту, що зв'язується з антитілами. Щоб спростити визначення кількості стандарту, що виявляється зв'язаним, антитіла, як правило, до або після конкурентної взаємодії переводять у нерозчинну форму. У результаті стандартний і випробовуваний зразки, що зв'язані з антитілами, можуть без важкості відокремлюватися від стандарту і досліджуваного зразка, що залишаються незв'язаними.

Сендвічевий аналіз припускає використання двох антитіл, кожне з яких у стані зв'язуватися з різними імуногенними частинами, детермінантами або епітопами мішені, що детектується. У сендвічевому методі випробовуваний зразок, зв'язується з першим антитілом, прямо або непрямо іммобілізованим на твердій підкладці, після чого друге антитіло, позначене прямим або непрямим чином, зв'язується з зафіксованим випробовуваним зразком, тим самим утворюючи нерозчинний тричастинний комплекс, див., наприклад, патент США № 4376110. Друге антитіло може бути саме по собі позначене реєстрованою міткою (прямий сендвічевий метод) або може детектуватися з використанням антиімуноглобулінового антитіла або іншого придатного компонента зв'язаної пари (наприклад антитіло/антиген, рецептор/ліганд, фермент/субстрат), що позначений детектованою міткою (непрямий сендвічевий метод). Наприклад, одним з видів сендвічевого аналізу є метод ELISA, у цьому випадку як детектована мітка виступає фермент.

У сферу охоплення даного винаходу також входять набори, наприклад, які включають антитіла, їхні фрагменти, гомологи, їхні похідні і т.п., такі як мічені або цитотоксичні кон'югати, а також інструкції з застосування антитіла, кон'югата для знищення визначених видів клітин і т.п. В інструкціях можуть міститися вказівки з використання антитіла, кон'югата і т.п. *in vitro*, *in vivo* чи *ex vivo*. Антитіло може знаходитися в рідині або у твердій формі, як правило, ліофілізованій. Набір може містити інші придатні реагенти, наприклад буфер, відновлений розчин і інші необхідні інгредієнти для передбачуваного використання. Передбачається, що набір буде являти собою упаковану комбінацію реагентів у заздалегідь установлених кількостях з інструкціями з їх застосування, наприклад у лікувальних цілях для проведення діагностичних аналізів. Якщо в антитіло вводиться мітка, наприклад ферменту, набір може включати субстрати і кофактори, необхідні для ферменту (наприклад, попередник субстрату, що забезпечує утворення реєстрованого хромофору або флуорофору). Крім того, у набір можуть включатися інші добавки, наприклад стабілізатори, буфери (наприклад, блок-буфер або лізисний буфер) і т.п. Відносні кількості різних реагентів можна змінювати, для того, щоб у наборі були присутні концентрати розчинів реагентів, що забезпечує користувачу гнучкість, економію місця, реагентів і т.п. Реагенти можуть поставлятися у вигляді твердих порошків, зазвичай ліофілізованих, разом з наповнювачами, що після розчинення утворюють розчин реагенту у належній концентрації.

Антитіла даного винаходу можуть бути використані для лікування ссавців. В одному з прикладів здійснення антитіло або його еквівалент, що представляють інтерес, вводяться ссавцю, крім людини, наприклад з метою одержати доклінічні дані. До прикладів ссавців, крім людини, що можуть одержувати препарат, належать нелюдиноподібні примати, собаки, кішки, гризуни й інші ссавці, на яких проводяться доклінічні дослідження. Такими ссавцями можуть бути апробовані моделі тварин для тієї або іншої хвороби, яку передбачається лікувати за допомогою антитіла, або ж вони можуть використовуватися для вивчення токсичності розглянутого антитіла. У кожному з таких прикладів здійснення для ссавця можуть проводитися дослідження наростаючої дози.

Як лікарський препарат може використовуватися антитіло в присутності або за відсутності другого компонента, наприклад терапевтичного агента, кон'югованого з ним, вводиться без добавок або у поєднанні з цитотоксичним фактором (факторами). Даний винахід присвячений

терапії антитілами, що припускає введення антитіл за даним винаходом тварині, ссавцю або людині для лікування опосередкованих IL-4 і (або) IL-13 хвороб, порушень або станів.

Використовуваний у даному винаході термін "лікування" належить до терапевтичного лікування і до профілактичних і запобіжних заходів. Він позначає попередження, лікування, припинення, згладжування, пом'якшення, зведення до мінімуму, пригнічення або зупинку згубних ефектів хворобливого стану, прогресування хвороби, збудника захворювання (наприклад, бактерії або вірусу) або іншого аномального стану.

Тому даний винахід також включає полівалентні антитіла, у тому числі біспецифічні антитіла анти-IL-4/IL-13, зі зв'язаними з ними діагностично або терапевтично функціональними ефекторними молекулами, атомами або іншими фрагментами. Наприклад, антитіло може містити радіоактивну діагностичну мітку або радіоактивний цитотоксичний атом, або метал, або цитотоксичні компоненти, наприклад ланцюг рицину, що зв'язуються з ним для цілей *in vivo* діагностики або лікування раку.

Крім того, антитіла даного винаходу можуть використовуватися в імуноферментному аналізі, у методах очищення, а також в інших методах, де використовуються імуноглобуліни або їхні фрагменти. Такі застосування добре відомі фахівцям у даній галузі.

Відповідно, у винаході також пропонуються препарати, що містять антитіла анти-IL-13 і/або анти-IL-4 або їхні фрагменти відповідно до винаходу в зручному поєднанні з фармацевтично прийнятним носієм, розріджувачем або наповнювачем, що прийнято застосовувати в даній галузі.

Використовуваний у даному винаході термін "фармацевтичний препарат" належить до сполук різних препаратів. Сполуки, що містять терапевтично ефективні кількості полівалентних антитіл, являють собою стерильні рідкі розчини, рідкі суспензії або ліофілізовані варіанти і можуть містити стабілізатори або наповнювачі.

Використовуваний у даному винаході термін "порушення" належить до будь-якого стану, на який може зробити сприятливий вплив лікування антитілами даного винаходу. Сюди відносяться хронічні і гострі порушення або захворювання, у тому числі такі патологічні стани, що визначають схильність ссавця і, зокрема, людини до розглянутого порушення. Серед множини прикладів порушень, лікування яких передбачається в даному винаході, різні форми раку, запалення, аутоімунні захворювання, інфекції, серцево-судинні захворювання, респіраторні захворювання, неврологічні захворювання і метаболічні захворювання.

Антитіла даного винаходу можуть використовуватися для лікування, пригнічення або профілактики різних захворювань, наприклад алергійних захворювань, опосередкованих Th2 захворювань, опосередкованих IL-13 захворювань, опосередкованих IL-4 захворювань і/або опосередкованих IL-4/IL-13 захворювань. Прикладами таких захворювань є хвороба Ходжкіна, астма, алергічна астма, atopічний дерматит, atopічна алергія, виразковий коліт, склеродерма, алергійний риніт, ідіопатичний легеневий фіброз ХОЗЛЗ, хронічне відторгнення трансплантата, викликаний блеомицином легеневий фіброз, радіаційно-індукований легеневий фіброз, легенева гранулома, прогресуючий системний склероз, шистосомоз, фіброз печінки, рак нирок, лімфома Беркітта, хвороба Ходжкіна, не-Ходжкінська лімфома, синдром Сезарі, астма, септичний артрит, герпетиформний дерматит, хронічна ідіопатична уртикарія, виразковий коліт, склеродерма, гіпертрофічне рубцювання, синдром Уіппла, доброякісна гіперплазія простати, легеневий розлад, при якому певну роль грає рецептор IL-4, стан, при якому певну роль грає опосередковане рецептором IL-4 порушення епітеліального бар'єра, порушення травної системи, при якому певну роль грає рецептор IL-4, алергічна реакція на той або інший лікарський препарат, хвороба Кавасакі, серпоподібноклітинна анемія, синдром Черджа-Стросс, дифузійний токсичний зоб, прееклампсія, синдром Шегрена, аутоімунний лімфопроліферативний синдром, аутоімунні гемолітична анемія, стравохід Барретта, аутоімунний увеїт, туберкульоз, муковісцидоз, алергійний бронхолегеневий мікоз, хронічне обструктивне захворювання легень, індуковані блеомицином пневмопатія і фіброз, легеневий альвеолярний протеїноз, синдром в'ялотекучої дихальної недостатності, саркоїдоз, синдром Джоба, ідіопатичний гіпереозинофільний синдром, аутоімунне утворення шкірних наривів, звичайна пухирчатка, бульозний пемфігоїд, злоякісна міастенія, синдром хронічної втоми, нефроз.

Термін "алергійне захворювання" належить до патологічного стану, при якому пацієнт гіперсенситивізований до речовини, що зазвичай не є імуногенним і формує імунологічну реакцію на таку речовину. Алергійне захворювання зазвичай характеризується активацією мастоцитів за допомогою IgE, що призводить до запальної відповіді (наприклад, локальна відповідь, системна відповідь), причому її симптоми можуть бути різними: від безпечних, як нежить, до небезпечного для життя анафілактичного шоку і смерті. Приклади алергійних

захворювань, серед інших, включають алергійний риніт (наприклад сінна лихоманка), астма (наприклад, алергійна астма), алергійний дерматит (наприклад, екзема), контактний дерматит, харчова алергія й уртикарія (кропивниця).

Використовуваний у даному документі термін "опосередковане Th2 захворювання" належить до захворювання, при якому патологія виникає (повністю або частково) за рахунок імунної відповіді (імунна відповідь Th2-типу), регульованої за допомогою Т-лімфоцитів CD4<sup>+</sup>Th2, що зазвичай продукують IL-4, IL-5, IL-9 і IL-13. Імунна відповідь Th2-типу асоціюється з продукцією певних цитокінів (наприклад, IL-4, IL-13) і певних класів антитіл (наприклад, IgE), а також зв'язується з гуморальним імунітетом. Опосередковані Th2 захворювання характеризуються наявністю підвищених рівнів цитокінів Th2 (наприклад, IL-4, IL-13) і/або визначених класів антитіл (наприклад, IgE), а також включають, наприклад, алергійні захворювання (наприклад, алергійний риніт, atopічний дерматит, астма (наприклад, atopічна астма), алергійне захворювання дихальних шляхів (АЗДШ), анафілактичний шок, кон'юнктивіт), аутоімунні захворювання, пов'язані з підвищеними рівнями IL-4 і/або IL-13 (наприклад, ревматоїдний артрит, хвороба відторгнення трансплантата організмом хазяїна, захворювання нирок (наприклад, нефритичний синдром, вівчаковий нефрит)), а також інфекції, пов'язані з підвищеними рівнями IL-4 і/або IL-13 (наприклад, вірусні, паразитичні, грибові (наприклад *C. albicans*) інфекції). Певні форми раку пов'язані з підвищеними рівнями IL-4 і/або IL-13 або асоціюються з IL-4-індукованою і/або IL-13-індукованою проліферацією ракових клітин (наприклад, В-клітинна лімфома, Т-клітинна лімфома, множинна міелома, карцинома голови і шиї, рак молочної залози і рак яєчників). Такі форми раку можна лікувати, пригнічувати або попереджати за допомогою ліганду даного винаходу.

Використовуваний у даному документі термін "рак" належить до фізіологічного стану у ссавців, зокрема людини, що зазвичай характеризується нерегульованим ростом клітин. Приклади раку, серед іншого, включають карциному, лімфому, бластоми, саркому і лейкомію.

Використовуваний у даному документі термін "аутоімунне захворювання" належить до незлоякісного захворювання або розладу, що виникає у власних тканинах пацієнта, і направлено проти його власних тканин. До прикладів аутоімунних захворювань або порушень, серед інших, належать запальні реакції, наприклад запальні шкірні захворювання, у тому числі псоріаз і дерматит; алергійні стани, наприклад екзема й астма; інші стани, у тому числі інфільтрація Т-клітин і хронічні запальні реакції; атеросклероз; цукровий діабет (наприклад, цукровий діабет I типу або інсулінозалежний цукровий діабет); розсіяний склероз і запальний розлад центральної нервової системи (ЦНС).

Антитіла даного винаходу можуть використовуватися як сполуки для індивідуального введення або в поєднанні з іншими терапевтичними агентами. Антитіла можуть використовуватися в комбінаційній терапії з існуючими препаратами IL-13 (наприклад існуючі агенти IL-13, наприклад анти-IL-4R $\alpha$ 1, пастка IL-4/13, анти-IL-13) з антитілом анти-IL-4 і існуючими агентами IL-4 (наприклад анти-IL-4R, мутеїн IL-4, пастка IL-4/13) з антитілом анти-IL-13 і антитілами IL-4 (наприклад WO05/0076990 (CAT), WO03/092610 (Regeneron), WO00/64944 (Genetic Inst.) і WO2005/062967 (Tanox)).

Антитіла даного винаходу можуть вводитися і/або включатися до складу разом з одним або декількома додатковими лікарськими або активними агентами. Якщо ліганд вводиться разом з додатковим лікарським агентом, то його можна вводити до, одночасно або після введення додаткового агента. Як правило, ліганд і додатковий агент вводяться таким чином, який дозволяє забезпечувати перекривання терапевтичного ефекту. До додаткових агентів, що можуть вводитися або включатися до складу разом з лігандом даного винаходу, належать, наприклад, різні імунотерапевтичні препарати, наприклад циклоспорин, метотрексат, адриаміцин або цисплатин, антибіотики, антигрибкові засоби, протівірусні агенти і імунотоксини. Наприклад, якщо антагоніст вводиться для профілактики, пригнічення або лікування запалення легень або респіраторного захворювання (наприклад астми), він може вводитися разом з інгібіторами фосфодіестерази (наприклад інгібітори фосфодіестерази-4), бронходилататорами (наприклад  $\beta$ 2-агоністи, антихолінергіки, теофілін), бета-агоністами короткочасної дії (наприклад альбутерол, сальбутамол, бамбутерол, фенотер[сигма]1, ізоегерин, ізопротенерол, лева[іота]бутерол, метапротенерол, пірбутерол, тербуталін і торнлат), бета-агоністами тривалої дії (наприклад формотерол і сальметерол), антихолінергіки короткочасної дії (наприклад ипратропій бромід і окситропій бромід), антихолінергіки тривалої дії (наприклад тіотропій), теофілін (наприклад сполуки короткочасної дії, сполуки тривалої дії), стероїди інгаляційного застосування (наприклад беклометазон, будесонід, флунізолід, флутиказон пропіонат і триамцинолон), стероїди перорального застосування (наприклад метилпреднізолон, преднізолон, преднізолон і преднізон), комбінація бета-агоністів

короткочасної дії з антихолінергіками (наприклад альбутерол/сальбутамол/іпратопій і фенотерол/іпратопій), поєднання бета-агоністів тривалої дії зі стероїдами інгаляційного застосування (наприклад сальметерол/флутиказон і формотерол/будесонід) і муколітичні агенти (наприклад ердостеїн, ацетилцистеїн, бромгексин, сарбоцистеїн, гу'афенсин і йодований гліцерин).

До інших придатних агентів для спільної терапії, що можуть вводитися разом з антитілом даного винаходу для профілактики, пригнічення або лікування астми (наприклад алергійної астми), належать кортикостероїди (наприклад беклометазон, будесонід, флутиказон), хромоглікат, недокромил, бета-антагоністи (наприклад сальбутамол, тербуталін, бамбутерол, фенотерол, репротерол, толубутерол, сальметерол, фомтеро), зафірлукаст, сальметерол, преднізон, преднізолон, теофілін, зілейтрон, монтелукаст і модифікатори лейкотрієну. Ліганди даного винаходу можуть спільно вводитися з різноманітними агентами для спільної терапії, придатними для лікування захворювань (наприклад захворювань, опосередкованих Th-2, опосередкованих YL-A, опосередкованих IL-13, опосередкованих IL-4, а також раку), у тому числі цитокіни, анальгетики/антипіретики, протиблювотні засоби і препарати для хіміотерапії.

Антитіла даного винаходу можуть поставлятися у формі фармацевтично прийнятних сполук, що відомі фахівцям у даній галузі або описані в даному документі. Термін "фізіологічно прийнятний", "фармацевтично прийнятний" і т.п. означає затверджений розпорядничим органом федерального уряду або уряду штату або внесений у Фармакопею США або іншу загальноприйнятну фармакопею для використання на тваринах і, особливо, на людині.

Антитіла анти-IL-4, анти-IL-13 і біспецифічні антитіла анти-IL-4/анти-IL-13 можуть вводитися ссавцю, зокрема людині, будь-яким прийнятним способом. До методів введення, серед інших, належать парентеральний, підшкірний, внутрішньочеревинний, внутрішньолегеневий, інтраназальний, епідуральний, інгаляція й оральні шляхи, а також, якщо це бажано у випадку імунодепресивного лікування, передбачається введення всередину ураженої ділянки. Парентеральні вливання включають внутрішньом'язове, внутрішньошкірне, внутрішньовенне, внутрішньоартеріальне або внутрішньочеревинне введення. Антитіла або сполуки можуть вводитися будь-яким придатним способом, наприклад вливанням або болюсною ін'єкцією, абсорбцією через епітеліальні або шкірно-слизові оболонки (наприклад слизова оболонка ротової порожнини, слизова оболонка прямої кишки і кишечника і т.п.) і можуть вводитися разом з іншими біологічно-активними агентами. Введення може бути системним або місцевим. Крім того, може бути бажаним вводити терапевтичні антитіла або сполуки даного винаходу в центральну нервову систему будь-яким зручним методом, у тому числі за допомогою інтравентрикулярної ін'єкції та ін'єкції в область хребетного каналу; причому інтравентрикулярну ін'єкцію може полегшити інтравентрикулярний катетер, наприклад з'єднаний з резервуаром, наприклад з резервуаром Оммайа. Крім того, антитіло зручно вводити імпульсними вливаннями, особливо у випадку доз антитіла, що знижуються. Переважно, дозування проводиться ін'єкцією, переважно за допомогою внутрішньовенних або підшкірних ін'єкцій, частково залежно від того, чи носить введення короткочасний або тривалий характер.

Відомі різні системи доставки, і вони можуть використовуватися для введення антитіла даного винаходу, наприклад інкапсуляція в ліпосоми, мікрочастинки, мікрокапсули (див. Langer, Science 249:1527 (1990); Treat et al., у Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer; Lopez-Berestein et al., eds., p. 353-365 (1989); і Lopez-Berestein, там же, p. 317-327), а також рекомбінантні клітини, здатні експресувати сполуки, опосередкований рецепторами ендцитоз (див., наприклад, Wu et al., J Biol Chem 262:4429 (1987)); конструювання нуклеїнової кислоти в межах ретровірусного або іншого вектора і т.п.

Активні інгредієнти можуть також захоплюватися в приготовлені мікрокапсули, наприклад за допомогою методик коацервації або міжфазної полімеризації, наприклад мікрокапсули гідроксиметилцелюлози або желатину і мікрокапсули поліметилметакрилату, відповідно, у колоїдні системи доставки ліків (наприклад ліпосоми, мікросфери альбуміну, мікроемульсії, наночастинки і нанокапсули) або в макроемульсії. Такі методики описані в Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, A. Osal, Ed. (1980).

Може також застосовуватися пульмональна доставка, наприклад з використанням інгалятора або аерозольного апарата, а також сполуки, що містить агент для переведення в аерозоль. Антитіло також може вводитися в легені пацієнта у формі сухої порошкової сполуки, див., наприклад, патент США № 6514496.

В одному з конкретних прикладів здійснення може бути бажано вводити лікувальні антитіла або сполуки даного винаходу місцево, у зону, що потребує лікування; цього можна домогтися різними методами, наприклад, серед інших, місцевою інфузією, місцевим застосуванням, за допомогою ін'єкції, катетера, за допомогою супозиторію або імплантата, причому згаданий

імплант може бути виготовлений з пористого, непористого або желатиноподібного матеріалу, у тому числі являти собою мембрану, наприклад, силастикову мембрану або волокна. Переважно при введенні антитіла даного винаходу звертати особливу увагу на використання матеріалів, що не адсорбують і не абсорбують білок.

У ще одному прикладі здійснення антитіло може доставлятися в системі контрольованого вивільнення. В одному з прикладів здійснення може використовуватися насос (див. Langer, *Science* 249:1527 (1990); Sefton, *CRC Crit Ref Biomed Eng* 14:201 (1987); Buchwald et al., *Surgery* 88:507 (1980); і Saudek et al., *N Engl J Med* 321:574 (1989)). В іншому прикладі здійснення можуть застосовуватися полімерні матеріали (див. *Medical Applications of Controlled Release*, Langer et al., eds., CRC Press (1974); *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen et al., eds., Wiley (1984); Ranger et al., *J Macromol Sci Rev Macromol Chem* 23:61 (1983); див. також Levy et al., *Science* 228:190 (1985); During et al., *Ann Neurol* 25:351 (1989); і Howard et al., *J Neurosurg* 71:105 (1989)). У ще одному прикладі здійснення система контрольованого вивільнення може розміщуватися в безпосередній близькості від терапевтичної мішені.

Лікувальні препарати поліпептиду або антитіла можуть готуватися для збереження у формі ліофілізованих сполук або водних розчинів за допомогою змішування поліпептиду бажаного ступеня чистоти з можливими "фармацевтично прийнятними" носіями, розчинниками, наповнювачами або стабілізаторами, що зазвичай використовуються в даній галузі, наприклад буферними реагентами, стабілізуючими реагентами, консервантами, ізотоніфікаторами, неіоногенними детергентами, антиоксидантами й іншими різноманітними добавками, див. *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16th ed., Osol, ed. (1980). Такі добавки, як правило, нетоксичні для організму хазяїна в застосовуваних дозах і концентраціях, а значить, наповнювачі, розріджувачі, носії і т.п. є фармацевтично прийнятними.

"Виділене", або "очищене" антитіло в достатньому ступені вільне від клітинного матеріалу або інших забруднюючих білків із клітинного або тканинного джерела або середовища, з якого отриманий білок, або в достатньому ступені вільні від хімічних попередників або інших хімічних речовин при одержанні шляхом хімічного синтезу. Вираз "у достатньому ступені вільні від клітинного матеріалу" включає препарати антитіла, в яких даний поліпептид/білок відділений від клітинних компонентів клітин, з яких він виділений або отриманий при рекомбінації. Таким чином, антитіло, у достатньому ступені вільне від клітинного матеріалу, включає препарати антитіла, що містять менше ніж приблизно 30 %, 20 %, 10 %, 5 %, 2,5 % або 1 % (сухої ваги) забруднюючого білка. У тому випадку, коли антитіло отримане за допомогою рекомбінантних методик, також переважно, якщо воно буде в достатньому ступені вільне від культурального середовища, тобто якщо культуральне середовище складає менше ніж приблизно 20 %, 10 %, 5 %, 2,5 % або 1 % від обсягу препарату білка. У тому випадку, коли антитіло одержують при хімічному синтезі, переважно, щоб воно було в достатньому ступені вільне від хімічних попередників або інших хімічних речовин і реагентів, тобто щоб розглянуте антитіло було відділене від хімічних попередників або інших хімічних речовин, використаних у синтезі білка. Відповідно, такі препарати антитіла містять менше ніж приблизно 30 %, 20 %, 10 %, 5 % або 1 % (сухої ваги) хімічних попередників або хімічних речовин, відмінних від розглянутого антитіла. У переважному прикладі здійснення даного винаходу проводиться виділення або очищення антитіла.

Наведений в даному документі вираз "від низьких до невизначених рівнів агрегування" належить до зразків, що містять не більше 5 %, не більше 4 %, не більше 3 %, не більше 2 %, не більше 1 % і часто не більше 0,5 % агрегатів за вагою білка, що визначається, наприклад, високоефективною гель-проникною хроматографією (ВЕГПХ).

Використовуваний у даному документі термін "від низьких до невизначених рівнів фрагментації" належить до зразків, що містять не менше 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % або 99 %, сумарного білка, наприклад в одному піці, що визначається ВЕГПХ, або в 2 (двох) піках (важкий ланцюг і легкий ланцюг), обумовлених, наприклад, за допомогою відновного капілярного гель-електрофорезу (rCGE) і таких, що не містять інших одиничних піків з більше 5 %, більше 4 %, більше 3 %, більше 2 %, більше 1 % або більше 0,5 % сумарного білка кожний. Використовуваний у даному документі термін rCGE належить до капілярного гель-електрофорезу в умовах відновлення, достатніх для відновлення дисульфідних зв'язків в антитілі або молекулі типу антитіла, або похідній молекулі.

Використовувані в даному документі терміни "стабільність" і "стабільний" у контексті рідкого препарату, що містить антитіло IL-4 і (або) IL-13 або його зв'язувальний фрагмент, належать до стійкості антитіла або його антиген-зв'язувального фрагмента в препараті до термічного або хімічного розгортання, агрегування, деградації або фрагментації в конкретних умовах

виробництва, одержання, транспортування і збереження. "Стабільні" препарати даного винаходу зберігають біологічну активність не менше ніж на 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % або 99,5 % у конкретних умовах виробництва, одержання, транспортування і збереження. Стабільність згаданого препарату антитіла може оцінюватися за ступенем агрегування, деградації або фрагментації з застосуванням методів, відомих кваліфікованим фахівцям у даній галузі, у тому числі, серед інших, rCGE, гель-електрофорез у поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію (SDS-PAGE) і ВЕГПХ, у порівнянні зі стандартом.

Термін "носії" належить до розріджувача, ад'юванту, наповнювача або носія, з яким вводиться лікарський препарат. Такими фізіологічними носіями можуть бути стерильні рідини, наприклад вода й олії, у тому числі нафтового, тваринного, рослинного або синтетичного походження, наприклад арахісова олія, соєва олія, мінеральна олія, кунжутна олія і подібні їм олії. При внутрішньовенному введенні лікарського препарату переважним носієм є вода. Фізіологічні розчини і водні розчини декстрази і гліцерину також можуть використовуватися як рідкі носії, особливо для ін'єкційних розчинів. До придатних фармацевтичних наповнювачів належать крохмаль, глюкоза, лактоза, сахароза, желатин, солод, рис, борошно, крейда, силікагель, стеарат натрію, гліцеринмоностеарат, тальк, хлорид натрію, сухе зняте молоко, гліцерин, пропіленгліколь, вода, етанол і подібні їм речовини. Якщо бажано, сполука може також містити невеликі кількості змочувальних речовин або емульгаторів, або буферних речовин для підтримки рН. Такі препарати можуть мати форму розчинів, суспензій, емульсій, таблеток, пігулок, капсул, порошків, лікарських форм із тривалим вивільненням речовини, депо і їм подібних. Сполука може мати форму супозиторію зі стандартними зв'язувальними і носіями, наприклад тригліцеридами. Препарати для перорального застосування можуть включати стандартні носії, як такі, що належать до фармацевтичної категорії манітол, лактоза, крохмаль, стеарат магнію, сахарин натрію, целюлоза, карбонат магнію і т.п. Приклади придатних носіїв описані в "Remington's Pharmaceutical Sciences, " Martin. Такі сполуки будуть містити ефективну кількість антитіла, переважно в очищеній формі, поряд з відповідною кількістю носія, для того щоб забезпечити форму для належного введення пацієнту. Як відомо фахівцям у даній галузі, сполука буде створюватися таким чином, щоб відповідати способу введення.

Буферні реагенти допомагають підтримувати рН в інтервалі, що наближається до фізіологічних умов. Буфери переважно присутні в концентраціях в інтервалі від приблизно 2 мм до приблизно 50 мм. Як придатні буферні реагенти даного винаходу можуть використовуватися як органічні, так і неорганічні кислоти і їх солі, наприклад цитратні буфери (наприклад, суміш моонатрію цитрат-динатрію цитрат, суміш лимонна кислота-тринатрію цитрат, суміш лимонна кислота-моонатрію цитрат і т.п.), сукцинатні буфери (наприклад, суміш бурштинова кислота-моонатрію сукцинат, суміш бурштинова кислота-гідроксид натрію, суміш бурштинова кислота-динатрію сукцинат і т.п.), тартратні буфери (наприклад, суміш винна кислота-натрію тартрат, винна кислота-калію тартрат, суміш винна кислота-гідроксид натрію і т.п.), фумаратні буфери (наприклад, суміш фумарова кислота-моонатрію фумарат, суміш фумарова кислота-динатрію фумарат, суміш моонатрію фумарат-динатрію фумарат і т.п.), глюконатні буфери (наприклад, суміш глюконова кислота-глюконат натрію, суміш глюконова кислота-гідроксид натрію, суміш глюконова кислота-глюконат калію і т.п.), оксалатні буфери (наприклад суміш щавлева кислота-оксалат натрію, суміш щавлева кислота-гідроксид натрію, суміш щавлева кислота-оксалат калію і т.п.), лактатні буфери (наприклад суміш молочна кислота-лактат натрію, суміш молочна кислота-гідроксид натрію, суміш молочна кислота-лактат калію і т.п.) і ацетатні буфери (наприклад суміш оцтова кислота-ацетат натрію, суміш оцтова кислота-гідроксид натрію і т.п.). Можуть застосовуватися фосфатні буфери, карбонатні буфери, гістидинові буфери, солі триметиламіну, наприклад Tris, HEPES, а також інші подібні їм відомі буфери.

Для уповільнення росту мікроорганізмів можуть додаватися консерванти, які можна використовувати в кількостях в інтервалі 0,2 %-1 % (ваг/об). До консервантів, придатних для використання в даному винаході, належать фенол, бензиловий спирт, м-крезол, метилпарабен, пропілпарабен, октадецилдиметилбензиламонійхлорид, галоїди бензалконію (наприклад хлорид, бромід і йодид), гексаметонійхлорид, алкілпарабени, наприклад метил- або пропілпарабен, катехол, резорцинол, циклогексанол і 3-пентанол.

Ізотоніфікатори вводяться, для того щоб забезпечити фізіологічну ізотонічність рідких препаратів даного винаходу, до таких належать багатоатомні цукрові спирти, переважно, триатомні або більш високі цукрові спирти, наприклад гліцерин, еритритол, арабітол, ксилитол, сорбітол і манітол. Багатоатомні спирти можуть бути присутніми у кількостях від приблизно 0,1 % до приблизно 25 %, за вагою, переважно від 1 % до 5 % з урахуванням відносних кількостей інших інгредієнтів.

Стабілізаторами називають широку категорію наповнювачів, функції яких змінюються від формоутворюючих речовин до добавок, солібілізуючих лікарський препарат або сприятливих попередженню або денатурації адгезії до стінок ємності. Як характерні стабілізатори можуть виступати багатоатомні цукрові спирти; амінокислоти, наприклад аргінін, лізин, гліцин, глутамін, аспарагін, гістидин, аланін, орнітин, L-лейцин, 2-фенілаланін, глутамінова кислота, треонін і т.п., органічні цукри або цукрові спирти, наприклад лактоза, трегалоза, стахіоза, арабітол, еритритол, манітол, сорбітол, ксилітол, рибітол, міоїнозитол, галактитол, гліцерин і їм подібні, у тому числі циклітоли, наприклад інозитол; поліетиленгліколь; полімери амінокислот; сірковмісні відновники, наприклад сечовина, глутатіон, ліпоева кислота, тіогліколят натрію, тіогліцерин, α-монотіогліцерин і тіосульфат натрію; поліпептиди з низькою молекулярною вагою (тобто <10 залишків); білки, наприклад альбумін сироватки людини, альбумін бичачої сироватки, желатин або імуноглобуліни; гідрофільні полімери, наприклад полівінілпіролідон, сахариди, моносахариди, наприклад ксилоза, маноза, фруктоза, глюкоза; дисахариди, наприклад лактоза, мальтоза і сахароза; трисахариди, наприклад рафіноза; полісахариди, наприклад декстран і т.п. Стабілізатори присутні в інтервалі від 0,1 до 10000 ваг/ваг на одну частину активного білка.

До додатковим різним наповнювачам належать формоутворюючі агенти (наприклад крохмаль), хелатувальні агенти (наприклад EDTA), антиоксиданти (наприклад аскорбінова кислота, метіонін або вітамін E) і допоміжні розчинники.

Наведені в даному документі сполуки також можуть містити більше одного активного компонента, якщо необхідно для індивідуальних показань при лікуванні, переважно компоненти, що мають взаємодоповнюючу активність, що не роблять несприятливого впливу один на одний. Наприклад, може бути бажано додатково ввести імунодепресант. Подібні молекули належним чином присутні в складі в кількостях, що ефективні для передбачуваної мети.

Використовуваний у даному документі термін "поверхнево-активні речовини" належить до органічних сполук, що мають амфіпатичну структуру, а саме, що складається з груп із протилежними характеристиками розчинності, як правило з жиророзчинного вуглеводневого ланцюжка і водорозчинної іонної групи. Залежно від заряду поверхнево-активної групи поверхнево-активні речовини можуть підрозділятися на аніонні, катіонні і неіоногенні. Поверхнево-активні речовини часто застосовуються як змочувальні, емульгувальні, солібілізувальні і диспергувальні агенти для різних лікарських сполук і препаратів біологічних матеріалів.

Неіоногенні поверхнево-активні речовини або детергенти (також відомі як "змочувальні речовини") можуть додаватися, для того щоб сприяти солібілізації лікарського засобу, а також щоб захистити лікарський білок від викликаного струшуванням агрегування, що також дозволяє піддавати сполуку впливу поверхневого зсуву, не викликаючи денатурації білка. До придатних неіоногенних поверхнево-активних речовин належать полісорбати (20, 80 і т.п.), поліоксамери (184, 188 і т.п.), поліолі Pluronic® і моноефіри поліоксіетиленсорбітану (TWEEN-20®, TWEEN-80® і т.п.). Неіоногенні поверхнево-активні речовини можуть бути присутніми у кількостях в інтервалі від приблизно 0,05 мг/мл до приблизно 1,0 мг/мл, переважно від приблизно 0,07 мг/мл до приблизно 0,2 мг/мл.

Використовуваний у даному документі термін "неорганічна сіль" належить до будь-якої сполуки, яка не містить вуглець, що утворюється в результаті заміни деяких або всіх кислих воднів або кислоти металом або групою, що виступає як метал, і часто використовуваної як речовина для коректування тонічності в лікарських сполуках і препаратах з біологічних матеріалів. Найбільш розповсюдженими неорганічними солями є NaCl, KCl, Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> і т.п.

Даний винахід включає рідкі сполуки, що мають стабільність при температурах, характерних для комерційних холодильників і морозильників, що використовуються в кабінетах лікаря або лабораторіях, наприклад від приблизно -20 °C до приблизно 5 °C, причому згадана стабільність оцінюється, наприклад, за високоефективною гель-проникною хроматографією (ВЕГПХ), для цілей збереження, наприклад, протягом приблизно 60 днів, приблизно 120 днів, приблизно 180 днів, приблизно року, приблизно 2 років або більше. Рідкі сполуки даного винаходу також виявляють стабільність, що оцінюється, наприклад, за ВЕГПХ, при кімнатних температурах принаймні протягом декількох годин, наприклад однієї години, двох годин або приблизно трьох годин до моменту застосування.

У сферу охоплення терміна "мала молекула" і аналогічних термінів, серед інших, входять пептиди, пептидоміметики, амінокислоти, аналоги амінокислот, полінуклеотиди, аналоги полінуклеотидів, нуклеотиди, аналоги нуклеотидів, органічні або неорганічні сполуки (наприклад, у тому числі гетероорганічні і (або) металоорганічні сполуки), що мають молекулярну вагу менше ніж приблизно 10000 грам на моль, органічні або неорганічні сполуки, що мають молекулярну вагу менше ніж приблизно 5000 грам на моль, органічні або неорганічні

сполуки, що мають молекулярну вагу менше ніж приблизно 1000 грам на моль, органічні або неорганічні сполуки, що мають молекулярну вагу менше ніж приблизно 500 грам на моль, а також солі, ефіри й інші фармацевтичні прийнятні форми таких сполук.

Тому у випадку раку антитіла даного винаходу можуть вводитися по окремої або в поєднанні з іншими препаратами для лікування раку, включаючи стандартні хімотерапевтичні ліки (паклітаксель, карбоплатин, цисплатин і доксорубіцин), анти-EGFR агенти (гефитиніб, ерлотиніб і цетуксимаб), антиангіогенні агенти (бевакузумаб і сунітиніб), а також імуномодулятори, наприклад, інтерферон-а і талідомід.

Використовувані в даному винаході визначення "терапевтичний агент" або "терапевтичні агенти" належать до будь-якого агента (агентів), що можуть використовуватися при лікуванні, контролі або пом'якшенні синдромів захворювань, порушень, розладів і т.п., пов'язаних з аберантними метаболізмом і активністю IL-4 і (або) IL-13.

Крім того, антитіла даного винаходу можуть кон'югуватися з різними ефекторними молекулами, наприклад гетерологічними поліпептидами, ліками, радіонуклідами або мотоксинами, див., наприклад, WO 92/08495; WO 91/14438; WO 89/12624; патент США № 5314995; і ЕРО 396387. Антитіло або його фрагмент можуть кон'югуватися з терапевтичним агентом, наприклад цитотоксином (наприклад цитостатичним або цитопатичним агентом), терапевтичним агентом або іоном радіоактивного металу (наприклад  $\alpha$ -активним ізотопом, таким як  $^{213}\text{Bi}$ ). До цитотоксинів або цитотоксичних агентів належать будь-які речовини, що впливають на клітини. До прикладів належать паклітаксол, цитохалазин В, граміцидін D, етидій бромід, еметин, мітоміцин, етопозид, тенопозид, вінкрисдин, вінбластин, колхицин, доксорубіцин, даунорубіцин, дигідроксиантрацидін, мітоксантрон, мітраміцин, актиноміцин D, 1-дегідротестостерон, глюкокортикоїди, прокаїн, тетракаїн, лідокаїн, пропранолол і пуроміцин, а також їхні аналоги або гомологи. До терапевтичних агентів, серед інших, належать антиметаболіти (наприклад метотрексат, 6-меркаптопурин, 6-тіогуанін, цитарабін, 5-фторурацил і декарбазин), алкілувальні агенти (наприклад мехлоретамін, хлорамбуцил, мельфалан, кармустин (BSNU) і ломустин (CCNU), циклофосфамід, бусульфамід, дибромманітол, стрептозоцин, мітоміцин С і цис-дихлородіаміноплатина (II) (DDP) цисплатин), антрацикліни (наприклад даунорубіцин, дауноміцин і доксорубіцин), антибіотики (наприклад дактиноміцин, актиноміцин, блеоміцин, мітраміцин і антраміцин (AMC)), а також антимітотичні агенти (наприклад вінкрисдин і вінбластин).

Методики кон'югації такої терапевтичної функції з антитілами добре відомі, див., наприклад, Arnon et al., у *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Reisfeld et al. (eds.), p. 243-56 Alan R. Liss (1985); Hellstrom et al., у *Controlled Drug Delivery*, 2nd ed., Robinson et al., eds., p. 623-53, Marcel Dekker (1987); Thorpe, у *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al., eds., p. 475-506 (1985); *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection and Therapy*, Baldwin et al., eds., p. 303-16, Academic Press (1985); і Thorpe, et al., *Immunol Rev* 62:119 (1982). Як альтернатива антитіло може кон'югуватися з другим антитілом з утворенням гетерокон'югата антитіла, наприклад біфункціонального антитіла, див., наприклад, патент США № 4676980.

Кон'югати даного винаходу можуть використовуватися для модифікації заданої біологічної відповіді, терапевтичний агент або лікарський препарат не повинні розглядатися такими, що обмежуються класичними хімічними терапевтичними агентами. Наприклад, як лікарський препарат може виступати білок або поліпептид, що має бажану біологічну активність. До таких білків можуть, наприклад, належати токсин, такий як абрин, рицин А, екзотоксин псевдомонад або дифтеричний токсин; білок, наприклад фактор некрозу пухлини, а-інтерферон, р-інтерферон, фактор росту нервів, тромбоцитарний фактор росту, активатор тканинного плазміногена, агент апоптоза, наприклад TNF-а, TNF-р, AIM I (WO 97/33899), AIM II (WO 97/34911), ліганд Fas (Takahashi et al., *Int Immunol*, 6:1567 (1994)), VEGF (WO 99/23105); тромботичний агент; антиангіогенний агент, наприклад ангіостатин або ендостатин; або модифікатори біологічної відповіді, наприклад лімфокіни, інтерлейкін-1 (IL-1), інтерлейкін-2 (IL-2), інтерлейкін-6 (IL-6), гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулюючий фактор (GM-CSF), гранулоцитарний колонієстимулюючий фактор (GCSF) або інші фактори росту.

Препарати для введення *in vivo* повинні бути стерильними. Цього можна досягти, наприклад, фільтрацією через стерильні фільтрувальні мембрани. Наприклад, рідкі препарати даного винаходу можуть стерилізуватися фільтрацією через фільтр 0,2 мкм або 0,22 мкм.

Можуть готуватися препарати з уповільненим вивільненням. До характерних прикладів препаратів з уповільненим вивільненням належать напівпроникні матриці твердих гідрофобних полімерів, що містять антитіло, ці матриці являють собою формовані вироби, наприклад плівки або матриці. Приклади матриць з уповільненим вивільненням включають поліефіри, гідрогелі (наприклад полі(2-гідроксіетилметакрилат), полівініловий спирт)), полілактиди (патент США №



3773919), співполімери L-глутамінової кислоти і етил- $\gamma$ -глутамату, етиленвінілацетат, який не розкладається, співполімери молочної кислоти-гліколевої кислоти, які розкладаються (наприклад ін'єкційні мікросфери, що складаються із співполімеру молочної кислоти-гліколевої кислоти) і полі-D-(-)-3-гідроксимаєляна кислота. Такі полімери, як етиленвінілацетат і молочна кислота-гліколева кислота, забезпечують вивільнення молекул протягом більше 100 днів, тоді як деякі гідрогелі вивільняють білки протягом більш короткого часу. Можна створити раціональні стратегії для стабілізації залежно від характерних механізмів. Наприклад, якщо встановлено, що механізм агрегування пов'язаний з утворенням міжмолекулярного зв'язку S-S за рахунок тіодисульфідного обміну, стабілізація може досягатися за рахунок модифікації сульфгідрильних залишків, люфілізації з кислих розчинів, контролю вмісту води, використання необхідних добавок, заміни амінокислот і розробки спеціальних сполук полімерних матриць.

Сполука, що містить антитіло або його варіант, буде формулюватися, дозуватися і вводитися таким способом, що відповідає належними принципами медичної практики. До факторів, що у даному випадку необхідно приймати до уваги, належать конкретне порушення, предмет лікування, конкретний ссавець або людина, що одержує лікування, клінічний стан конкретного пацієнта, причина захворювання, зона доставки агента, метод введення, схема введення й інші фактори, відомі лікарям. "Терапевтична ефективна кількість" антитіла або варіанта, що буде при цьому вводитися, визначається наведеними вище міркуваннями, і може являти собою мінімальну кількість, необхідну для попередження, пригнічення або лікування захворювання, стану або порушення, опосередкованого IL-4 і (або) IL-13.

Антитіло або його варіант можуть бути включені до складу разом з одним або декількома агентами, використовуваними в даний час для профілактики або лікування розглянутого захворювання. Ефективна кількість таких інших агентів залежить від кількості антитіла, що присутня у складі, виду розладу або лікування й інших факторів, що вище обговорювалися. Вони, як правило, використовуються в тих самих дозуваннях і з тими самими методами введення, що застосовувалися в описаному вище тексті або ж складають приблизно від 1 до 99 % від дозувань, що застосовувалися до цього.

Використаний у даному документі термін "ефективна кількість" належить до кількості ліків (наприклад профілактичного або терапевтичного агента), достатнього для зменшення гостроти і (або) тривалості захворювання, опосередкованого IL-4 і (або) IL-13, пригнічення одного або декількох його симптомів, попередження розвитку захворювання, опосередкованого IL-4 і (або) IL-13, або початку регресії захворювання, або достатнього для попередження розвитку, рецидивів, або початку прогресу захворювання, опосередкованого IL-4 і (або) IL-13, або одного чи декількох його симптомів, або посилення профілактичного і (або) терапевтичного ефекту (ефектів) інших ліків (наприклад іншого терапевтичного агента), застосовуваного для лікування захворювання, опосередкованого IL-4 і (або) IL-13.

Кількість лікарського антитіла або його фрагмента, що буде ефективна при використанні або лікуванні конкретного захворювання або стану, буде залежати від природи розладу або захворювання і може визначатися стандартними клінічними методиками. По можливості, спочатку *in vitro* можна одержати криву дозової залежності і фармацевтичні склади даного винаходу. При наявності придатної моделі тварин можна знову досліджувати криву дозової залежності, і використовувати її для екстраполяції придатної дози для людини, спираючись на практичні методи, відомі фахівцям у даній галузі. Разом з тим, виходячи з загальних знань у даній галузі, лікарський препарат, що ефективно стимулює зниження запального ефекту, наприклад, може забезпечувати місцеві концентрації лікарського засобу між 5 і 20 нг/мл, і, переважно, між приблизно 10 і 20 нг/мл.

У переважному прикладі здійснення водний розчин лікарського поліпептиду, антитіла або його фрагмента може вводитися за допомогою підшкірної ін'єкції. Кожну дозу можна змінювати в межах від приблизно 0,5 мг до приблизно 50 мг на кілограм ваги тіла, або, більш переважно, від приблизно 3 мг до приблизно 30 мг на кілограм ваги тіла. Дозування можна визначити емпірично для конкретного захворювання, групи пацієнтів, способу введення і т.п. з використанням фармацевтичних методів, відомих фахівцям у даній галузі.

Схему дозування для підшкірного введення можна змінювати від разу на тиждень до разу на день, залежно від набору клінічних факторів, включаючи характер захворювання, ступінь гостроти хвороби і чутливості пацієнта до терапевтичного агента.

У даному винаході пропонуються способи приготування рідких препаратів антитіла або його IL-4 і (або) IL-13-зв'язувального фрагмента, причому згадані способи включають концентрування фракції очищеного антитіла до кінцевої концентрації приблизно 15 мг/мл, приблизно 20 мг/мл, приблизно 30 мг/мл, приблизно 40 мг/мл, приблизно 50 мг/мл, приблизно 60 мг/мл, приблизно 70 мг/мл, приблизно 80 мг/мл, приблизно 90 мг/мл, приблизно 100 мг/мл,

приблизно 200 мг/мл, приблизно 250 мг/мл, приблизно 300 мг/мл або більше, з використанням, наприклад, напівпроникної мембрани з відповідним відсіканням молекулярної ваги (мв) (наприклад відсіканням 30 кД для його  $F_{(ab')^2}$  фрагментів; і відсіканням 10 кД для  $F_{ab}$  фрагментів).

5 Крім того, даний винахід включає стабільні рідкі препарати розглянутої продукції, що підвищували напіввиведення *in vivo*. Так, період напіввиведення розглянутого антитіла з організму, переважно, людини, більше 3 днів, більше 7 днів, більше 10 днів, більше 15 днів, більше 25 днів, більше 30 днів, більше 35 днів, більше 40 днів, більше 45 днів, більше 2 місяців, більше 3 місяців, більше 4 місяців, більше 5 місяців або більше.

10 Для збільшення тривалості перебування антитіла в сироватці *in vivo* можуть використовуватися різні методики. Наприклад, інертні полімерні молекули, такі як поліетиленгліколь (PEG) з високою молекулярною вагою, можуть зв'язуватися з антитілом через багатофункціональний лінкер або без нього, або за допомогою сайт-специфічної кон'югації PEG з N-кінцевим або з C-кінцевим закінченням антитіла, або через  $\epsilon$ -аміногрупи, що є присутніми у лізінних залишках. Можна утворювати такі похідні лінійного або розгалуженого полімеру, що забезпечують мінімальну втрату біологічної активності. Ступінь кон'югації можна чітко відслідковувати за SDS-PAGE і за допомогою мас-спектрометрії, щоб забезпечити належну кон'югацію молекул PEG з антитілами. Непрореагований PEG можна відокремити від кон'югатів антитіла о-PEG за допомогою фільтрації або іонообмінної хроматографії. Похідні від PEG антитіла можуть також досліджуватися на предмет активності зв'язування, а також ефективності *in vivo*, для чого можуть використовуватися методи, відомі фахівцям у даній галузі, наприклад, описані в даному документі методи імуноаналізу.

20 Антитіло, що має підвищений рівень напіввиведення *in vivo*, може також отримуватися за допомогою проведення однієї або декількох модифікацій амінокислот (наприклад заміни, вставок або делецій) у константний домен IgG, або його FcR-зв'язувальний фрагмент (наприклад  $F_c$  або фрагмент шарнірної області домену  $F_c$ ), див., наприклад, WO 98/23289; WO 97/34631; і патент США № 6277375.

Крім того, антитіло можна кон'югувати з альбуміном з утворенням антитіла, більш стабільного *in vivo* або такого, що має більш тривалий період напіввиведення *in vivo*. Методики добре відомі фахівцям у даній галузі, див., наприклад, WO 93/15199, WO 93/15200 і WO 01/77137; а також ЕРО 413622. Антитіло можна також модифікувати, наприклад, за допомогою глікозилювання, ацетилювання, фосфорилювання, амідування, введення відомих захисних/блокуючих груп, протеолітичного розщеплення, зв'язування з клітинним лігандом або іншим білком і т.п.

35 В одному з прикладів здійснення препарат складають згідно зі стандартними процедурами для лікарських препаратів, що готуються для внутрішньовенного введення в організм людини. Як правило, сполуки для внутрішньовенного введення являють собою розчини в стерильному ізотонічному водному буфері. У необхідних випадках сполука може також включати солюбілізуючий агент і місцевий анестетик, наприклад лідокаїн або інший "каїновий" анестетик, для зменшення болю в місці введення. Зазвичай інгредієнти поставляються або окремо, або змішуються у формі одиничного дозування, наприклад у вигляді сухого ліофілізованого порошку, або безводного концентрату в герметичному контейнері, наприклад в ампулі або в пакеті з зазначенням кількості активного агента. У випадках, коли сполука повинна вводитися за допомогою вливання, вона може поставлятися з флаконом для вливання, що містить стерильну воду або фізіологічний розчин фармацевтичної категорії чистоти. Якщо сполука вводиться за допомогою ін'єкції, може поставлятися ампула зі стерильною водою або фізіологічним розчином для ін'єкції, наприклад у наборі, так що інгредієнти можна змішувати перед введенням.

У винаході також передбачається, що рідкий препарат даного винаходу поміщується в герметичний контейнер, наприклад ампулу або пакет із зазначенням кількості розглянутого продукту. Рідкі препарати даного винаходу можуть знаходитися в герметичному контейнері з зазначенням кількості і концентрації антитіла або фрагмента антитіла. Рідкі препарати даного винаходу можуть поставлятися в герметичному контейнері, що містить принаймні 15 мг/мл, 20 мг/мл, 30 мг/мл, 40 мг/мл, 50 мг/мл, 60 мг/мл, 70 мг/мл, 80 мг/мл, 90 мг/мл, 100 мг/мл, 150 мг/мл, 200 мг/мл, 250 мг/мл чи 300 мг/мл антитіла IL-4 і (або) IL-13, наприклад в обсязі, рівному 1 мл, 2 мл, 3 мл, 4 мл, 5 мл, 6 мл, 7 мл, 8 мл, 9 мл, 10 мл, 15 мл або 20 мл.

55 Випускається виріб, до складу якого входять засоби для лікування описаних вище розладів. Виріб являє собою контейнер і ярлик. До придатних контейнерів належать, наприклад, пляшки, флакони, шприци і пробірки. Контейнери можуть виготовлятися із самих різних матеріалів, наприклад скло або пластик. Контейнер містить сполуку, що придатна для діагностики, профілактики або лікування стану або захворювання, опосередкованого IL-4 і (або) IL-13, і може

мати стерильний отвір для відбору (наприклад як контейнер може використовуватися мішок з розчином для внутрішньовенного введення або флакон із пробкою, що проколюється голкою для підшкірної ін'єкції). На ярлику, що знаходиться на контейнері або додається до нього, вказується, що сполука використовується для лікування певного стану. Виріб також може включати другий контейнер, що містить фармацевтично прийнятний буфер, наприклад фосфатно-буферний фізіологічний розчин, розчин Рінгера і розчин декстрази. Виріб також може включати інші матеріали, бажані з погляду комерційних додатків і користувача, включаючи буфери, розріджувачі, фільтри, голки, шприци і вкладиші з інструкціями з застосування.

Нижче для відому фахівців у даній галузі наводяться ілюстрації даного винаходу в наступних, не вичерпаних даним перерахуванням, прикладах, що описують деякі з варіантів здійснення, за допомогою яких даний винахід може бути реалізований на практиці.

#### ПРИКЛАДИ

#### ПРИКЛАД 1: СЕКВЕНУВАННЯ ДОМЕНУ Fv КЛОНУ B-B13 МОНОКЛОНАЛЬНОГО АНТИТІЛА МИШАЧОГО АНТИ-ЛЮДСЬКОГО IL-13

У наведеному методі як реагент використовували клон B-B13 моноклонального антитіла мишачого анти-IL-13, придбаний у Cell Sciences, Inc. (Кентон, Массачусетс, США). Cell Sciences є дистриб'ютором у США продукції компанії Diaclone (Безансон, Франція), що виробляє антитіло B-B13.

Амінокислотну послідовність клону B-B13 моноклонального антитіла мишачого анти-IL-13 визначали одночасно N-кінцевим секвенуванням за Едманом і мас-спектрометричним аналізом. Для одержання поліпептиду або пептидних фрагментів антитіло піддавали наступним різним процедурам, і отримані пептиди фракціонували за допомогою різних методів для приготування зразків, що потім піддавали N-кінцевому секвенуванню за Едманом й аналізували рідинною хроматографією/мас-спектрометрією (PX-МС/МС) у поєднанні з зіставленням пептидів з базою даних послідовностей білків.

Після електрофорезу в ПААГ із ДДС-На антитіла, обробленого або необробленого піроглутамінопептидазою, для розділення важкого і легкого ланцюгів проводили блотинг на полівініліденторидній мембрані (ПВДФ) з подальшим N-кінцевим секвенуванням смуг за Едманом.

Після обмеженого часткового протеолізу специфічними протеазами антитіла проводили електрофорез у ПААГ із ДДС-На і блотинг на ПВДФ мембрані і N-кінцеве секвенування смуг за Едманом.

Після обмеженого хімічного розщеплення смуг гелю електрофорезу в ПААГ із ДДС-На повного антитіла або важкого і легкого ланцюгів проводили електрофорез у ПААГ із ДДС-На і блотинг на ПВДФ мембрані і N-кінцеве секвенування смуг за Едманом.

Протеоліз смуг гелю електрофорезу в ПААГ із ДДС-На повного антитіла або важкого і легкого ланцюгів специфічними протеазами й аналіз PX/МС/МС.

Після протеолізу смуг гелю електрофорезу в ПААГ із ДДС-На важкого і легкого ланцюгів специфічними протеазами проводили хроматографічне фракціонування високого тиску на оберненій фазі (ОФ ВЕРХ) з наступним N-кінцевим секвенуванням за Едманом й аналізом фракцій PX/МС/МС.

Після обмеженого протеолізу антитіла протеазою папаїном, фракціонування смуг гелю електрофорезу в ПААГ із ДДС-На фрагмента Fd (фрагмент VH-CH1 важкого ланцюга антитіла), протеолізу специфічними протеазами проводили високоефективне хроматографічне фракціонування на оберненій фазі (ОФ ВЕРХ) з наступним N-кінцевим секвенуванням за Едманом й аналізом фракцій PX/МС/МС.

#### ПРИКЛАД 2: СЕКВЕНУВАННЯ ДОМЕНУ Fv КЛОНУ 8D4-8 МОНОКЛОНАЛЬНОГО АНТИТІЛА МИШАЧОГО АНТИ-ЛЮДСЬКОГО IL-4

Як реагент використовували клон 8D4-8 моноклонального антитіла мишачого анти-IL-4, що отримували в Biozol diagnostica Vertrieb Gmb (Ехинг, Німеччина). Biozol є дистриб'ютором у Німеччині компанії BioLegend (Сан-Дієго, Каліфорнія, США), що виробляє антитіло 8D4-8.

Амінокислотну послідовність моноклонального антитіла мишачого анти-IL-4 (клон 8D4-8) визначали одночасно N-кінцевим секвенуванням за Едманом і мас-спектрометричним аналізом (Pham et al., 2006, Anal. Biochem. 352: 77-86; Roberts et al., 2005, Anal. Chem. 67: 3613-25). Коротко, антитіло спочатку розділяли на легкий і важкий ланцюги, потім кожний ланцюг розщеплювали послідовністю специфічних протеаз або хімічним способом. Отримані пептиди розділяли оберненофазовою хроматографією й аналізували спектроскопією матричної лазерної десорбції/іонізації (MALDI) і/або PX-МС/МС. Потім для однозначного встановлення послідовності білка індивідуальні пептиди, а також інтактні важкі і легкі ланцюги піддавали секвенуванню за Едманом.

### ПРИКЛАД 3: ГУМАНІЗАЦІЯ ДОМЕНУ Fv КЛОНУ B-B13 МОНОКЛОНАЛЬНОГО АНТИТІЛА МИШАЧОГО АНТИ-ЛЮДСЬКОГО IL-13

Для гуманізації клону B13 використовували протокол гуманізації, описаний вище в даному документі. Запропонували шість гуманізованих версій, що включали мутації в CDR для

5 урахування проблемних залишків (сайт деамідування, доступний для розчинника метіонін, кислотні лабільні позиції).

Послідовності VL і VH для B-B13 зіставляли за допомогою програми BLAST по базі даних Protein Data Bank (PDB), версія липня 2007 року. Відібрали найбільш близькі амінокислотні послідовності легкого і важкого ланцюгів. Найближчим гомологом варіабельного легкого

10 ланцюга була структура 1EGJ. Найближчим гомологом варіабельного важкого ланцюга була структура 1FNS. Структури 1EGJ і 1FNS використовували для побудови гомологічної моделі варіабельних доменів, що потім мінімізували за енергією за допомогою стандартної процедури, реалізованої в середовищі Molecular Operating Environment (MOE). MOE являє собою універсальний пакет програмного забезпечення для комп'ютерної розробки ліків, що

15 постачається групою Chemical Computing. Розрахунки молекулярної динаміки (МД) для тримірної гомологічної моделі B-B13 проводили для часу 1,7 наносекунд із використанням узагальненого методу Борна з неявним розчинником. Отримані 1700 відображень траєкторії МД потім використовували для розрахунку для кожної амінокислоти B-B13 розподілу її середньоквадратичного відхилення (rmsd) у порівнянні з медіанним положенням. Статистичний

20 тест зіставлення розподілу rmsd кожної амінокислоти з глобальним rmsd розподілом потім використовували, щоб встановити, чи досить гнучка та або інша амінокислота, як було видно на МД, і чи може вона, тому, взаємодіяти з В-клітинними рецепторами і відповідати за активацію імунної відповіді. Гнучкі положення варіабельної області мишачого B-B13 зіставляли з відповідними положеннями послідовностей антитіла людини за версією бази даних ImMunoGeneTics за січень 2007 року, що була завантажена в локальну мережу. Для пошуку

25 використовували тільки ті залишки, що виявляли гнучкість, більше ніж у три рази перевищуючу середню, і кілька фланкуючих залишків, що забезпечували збереження тримірної структури цих гнучких залишків. Варіабельну область антитіла людини з найбільш близькими гнучкими залишками, де особлива увага приділялася положенням, що знаходяться близько 5,0 Å від CDR, відбирали для заміщення гнучких залишків варіабельної області мишачого антитіла B-B13. Щоб виключити проблемні залишки, деякі мутації в CDR також включали в пропонувані варіанти. Розглядали наступні мотиви послідовностей: Asp-Pro (кислотний лабільний зв'язок), Asn-X-Ser/Thr (глікозилювання), Asn-Gly/Ser/Thr (сайт деамідування в доступній області), Met (окиснення в доступній області). Для того щоб підтвердити обґрунтованість зроблених

35 допущень, отримані гуманізовані послідовності зіставляли програмою BLAST на предмет подібності з інформацією бази даних UniProtKB/Swiss-Prot. Встановили, що всі послідовності демонструють високий ступінь подібності з декількома антитілами людини. Крім того, жодна з послідовностей не містила жодного відомого епітопа В- або Т-клітин, наведених у базі даних імунних епітопів і аналітичних ресурсів (база даних IEDB).

40 Запропонували три версії важкого ланцюга (H1, H2, H3) і три версії легкого ланцюга (L1, L2, L3). Три версії легкого ланцюга одержали з CAA83271.1 (номер доступу Genebank CAA83271). Версія L1 містить 4 мутації. Версія L2 включає додаткову мутацію для видалення сайту DP (Pro99) у CDR3. L3 включає дві додаткові мутації, що знаходяться в CDR, у порівнянні з L2, що являють собою два можливі сайти деамідування (N34Q, N96A). H1, H2 і H3 версії важкого ланцюга одержали з CAC39364.1 (номер доступу Genebank CAC39364). Дана матриця не була

45 найкращою, але вона була найпридатнішою матрицею, що не містить послідовності з найвищою гомологією (>70 %) з відомою імуногенною послідовністю. Версія H1 містить 6 мутацій, і послідовність H2 включає дві додаткові мутації для урахування трьох сайтів деамідування (N60A, N73T і N83T). Послідовна нумерація амінокислот відображає їх природний порядок у білку (від N-кінцевого закінчення до С-кінцевого закінчення). H3 містить дві додаткові мутації (Y100R і D106K), які приблизно забезпечують більш високий потенціал. Для одержання гуманізованих антитіл рекомендовані шість комбінацій варіантів VL і VH: VL1xVH1, VL2xVH2, VL1xVH3, VL3xVH1, VL3xVH2 і VL3xVH3. Як показано в таблиці 1, зміни в послідовності амінокислот проводили в гуманізованих варіантах VL і VH для B13 із застосуванням методики

50 зміни поверхні (resurfacing), що викладена в розділі даної заявки з докладним описом винаходу. У лівому стовпчику перераховані вихідні амінокислоти і їхні положення в мишачому B-B 13 mAb.

Таблиця 1

Легкий ланцюг (послідовна нумерація)	(VL1)	(VL2)	(VL3)
Asn1	Asp	Asp	Asp
Asn34	Asn	Asn	Gln
Pro44	Ala	Ala	Ala
Glu83	Gln	Gln	Gln
Asp85	Glu	Glu	Glu
Asn96	Asn	Asn	Ala
Pro99	Pro	Ser	Ser
	4 мутації	5 мутацій	7 мутацій
Важкий ланцюг	(VH1)	(VH2)	(VH3)
Gln1	Glu	Glu	Glu
Ser15	Gly	Gly	Gly
Gln16	Gly	Gly	Gly
Asn60	Asn	Ala	Ala
Ser61	Asp	Asp	Asp
Asn73	Asn	Ser	Ser
Lys81	Glu	Glu	Glu
Asn83	Asn	Thr	Thr
Gln86	Arg	Arg	Arg
Tyr100	Tyr	Tyr	Arg
Asp106	Asp	Asp	Lys
	6 мутацій	9 мутацій	11 мутацій

#### ПРИКЛАД 4: ГУМАНІЗАЦІЯ ДОМЕНУ Fv КЛОНУ 8D4-8 МОНОКЛОНАЛЬНОГО АНТИТІЛА МИШАЧОГО АНТИ-ЛЮДСЬКОГО IL-4

Для гуманізації клону 8D4-8 використовували технологію гуманізації (resurfacing), описану вище в даному документі. Приготували дві гуманізовані версії. Одна версія включає одну мутацію областей CDR важкого ланцюга, яка, як передбачалося, замінювала потенційно проблематичний залишок (доступна кислотна лабільна позиція).

Послідовності VL і VH для 8D4-8 зіставляли програмою BLAST по базі даних PDB, версія липня 2007 року. Відібрали найбільш близькі амінокислотні послідовності легкого і важкого ланцюгів. Найближчим гомологом варіабельного легкого ланцюга є структура 1YDJ. Найближчим гомологом варіабельного важкого ланцюга була структура 1IQW. Структури 1YDJ і 1IQW використовували для побудови гомологічної моделі варіабельних доменів, що потім мінімізували за енергією за допомогою стандартної процедури, реалізованої в середовищі MOE.

Розрахунки молекулярної динаміки (МД) для тримірної гомологічної моделі 8D4-8 проводили для часу 1,7 наносекунд із використанням узагальненого методу Борна з неявним розчинником. Отримані 1700 відображень траєкторії МД потім використовували для розрахунку для кожної амінокислоти 8D4 розподілу її середньоквадратичного відхилення (rmsd) у порівнянні з медіанним положенням. Статистичний тест зіставлення розподілу rmsd кожної амінокислоти з глобальним rmsd розподілом потім використовували, щоб встановити, чи достатньо гнучка та або інша амінокислота, як було видно на МД, і чи може вона, тому, взаємодіяти з В-клітинними рецепторами і відповідати за активацію імунної відповіді. Гнучкі положення варіабельної області мишачого 8D4-8 зіставляли з відповідними положеннями послідовностей антитіла людини за версією бази даних ImMunoGeneTics за січень 2007 року, що була завантажена в локальну мережу. Для пошуку використовували тільки ті залишки, що виявляли гнучкість, більше ніж у три рази перевищуючу середню, і кілька фланкуючих залишків, що забезпечували збереження тримірної структури цих гнучких залишків. Для заміни гнучких залишків варіабельної ділянки мишачого антитіла 8D4-8 вибрали варіабельну область антитіла людини з найбільшим ступенем ідентичності гнучких залишків, звертаючи особливу увагу на положення, що знаходиться в межах 5,0 Å від гіперваріабельних ділянок. Потім також підготували додаткові мутації, щоб уникнути проблематичних залишків. Розглядали наступні мотиви послідовностей: Asp-Pro (кислотний лабільний зв'язок), Asn-X-Ser/Thr (глікозилювання), Asn-Gly/Ser/Thr (сайт деамідування в доступній області), Met (окиснення в доступній області). Єдиним проблематичним залишком виявився сайт DP в області CDR2 важкого ланцюга. Для того щоб підтвердити обґрунтованість зроблених допущень, отримані гуманізовані послідовності

зіставляли програмою BLAST на предмет подібності з інформацією бази даних UniProtKB/Swiss-Prot. Для всіх послідовностей одержали високий ступінь гомології з рядом антитіл людини. Крім того, жодна з послідовностей не містила жодного з відомих епітопів для В-клітин або Т-клітин, перерахованих у базі даних IEDB.

5 Запропонували два варіанти важкого ланцюга (H1, H2) і один варіант легкого ланцюга (L1). Версію L1 легкого ланцюга одержали з BAC01676.1 (номер доступу Genebank BAC01676). Версія L1 містить 3 мутації. Версії H1 і H2 важкого ланцюга одержали з BAC02418.1 (номер доступу Genebank BAC02418). Версія H1 включає 9 мутацій, і версія H2 включає додаткову мутацію для видалення сайту DP (Pro53) у CDR2. Підготували дві сполуки, VL1xVH1 і VL1xVH2.

10 У таблиці 2 показані зміни в послідовностях амінокислот, що проводили в гуманізованих варіантах VL і VH для 8D4-8 із застосуванням технології гуманізації (resurfacing). У лівому стовпчику перераховані вихідні амінокислоти і їхні положення в мишачому 8D4-8 mAb.

Таблиця 2

Легкий ланцюг (послідовна нумерація)	(VL1)	
Asn5	Thr	
Leu15	Val	
Ser39	Lys	
	3 мутації	
Важкий ланцюг	(VH1)	(VH2)
Gln10	Glu	Glu
Arg13	Lys	Lys
Thr16	Ala	Ala
Pro53	Pro	Ala
Lys65	Gln	Gln
Asp66	Gly	Gly
Arg74	Glu	Glu
Ser76	Thr	Thr
Leu93	Val	Val
Thr118	Leu	Leu
	9 мутацій	10 мутацій

15 ПРИКЛАД 5: КЛОНУВАННЯ І ГЕНЕРАЦІЯ ХИМЕРНОГО КЛОНУ В-B13  
МОНОКЛОНАЛЬНОГО АНТИ-IL-В АНТИТІЛА, ХИМЕРНОГО КЛОНУ 8D4-8  
МОНОКЛОНАЛЬНОГО АНТИТІЛА АНТИ-IL-4 І ГУМАНІЗОВАНИХ ВАРІАНТІВ

Послідовності амінокислот варіабельного важкого і легкого ланцюга клону В-B13 анти-IL-13 і клону 8D4-8 анти-IL-4 трансклювали назад у послідовність нуклеотидів і генерували, відповідно,  
20 за допомогою модифікованого протоколу ПЛР із подовженням перекривання (OE-PCR), описаного в роботі Young L. і Dong Q. (Nucl. Acids Res. (2004), 32(7), e59). Продукти ПЛР клонували в pCR®4-TOPO за допомогою комплексу клонування Invitrogen TOPO TA (кат. №45-0641) і секвенували за допомогою прямого M13 і зворотного M13 праймерів. Варіабельні домени зливали в постійний важкий (IGHG1, номер у каталозі Genebank Q569F4) або легкий (IGKC, номер у каталозі Genebank Q502W4) ланцюг, відповідно, обробляли Nhe і HindIII і кожний з них лігували в положення Nhe/HindIII вектора епісомальної експресії pXL, аналога вектора рТТ, описаного в роботі Durocher et al. (2002), Nucl. Acids Res. 30(2), E9, створюючи плазмідні для експресії ссавцями химерних важких і легких ланцюгів В-B13 і химерних важких і легких ланцюгів 8D4-8.

30 Клони експресії, що кодують гуманізовані варіанти клону В-B13 анти-IL-13 і клону 8D4-8 анти-IL-4 також синтетично генерували методом ПЛР із подовженням перекривання (OE-PCR) на основі запропонованих обмінів амінокислот оригінальних послідовностей.

Плазмідні експресії, що кодують важкий і легкий ланцюг антитіла, репродукували в E. coli DH5a. Плазмідні, використовувані для трансфекції, одержували з E. coli за допомогою комплексу  
35 Qiagen EndoFree Plasmid Mega Kit.

Для трансфекції клітини HEK29 3 Free Style (Invitrogen) сіяли по  $3 \times 10^5$  клітин на мл у 100-мл об'єм середовища FreeStyle (Invitrogen), що не містить сироватки, у 500-мл шейкерній колбі. Клітини культивували в інкубаторі при температурі 37 °C зі зволоженою атмосферою з 8 % CO<sub>2</sub> на ротаційному шейкері, що обертається зі швидкістю 110 обертів на хвилину.

40 Через три дні після висіву визначали кількість життєздатних клітин і повну кількість клітин за допомогою електронного цитометра CASY (Scharfe System Gmb). Клітини з життєздатністю

вище 90 % використовували для трансфекції з щільністю клітин  $1-1,5 \times 10^6$  клітин на мл. 100 мл клітин трансфектували в шейкерну колбу об'ємом 500 мл із сумішшю плазмід експресії з важким і легким ланцюгом ( $5 \times 10^7$  мкг ДНК на клітину) за допомогою EugeneHD (Roche) при співвідношенні ДНК:EugeneHD 2:7 в умовах, описаних виробником. Трансфектовані клітини культивували протягом 7 днів в інкубаторі при температурі 37 °C (8 % CO<sub>2</sub>) на ротаційному шейкері зі швидкістю 110 обертів на хвилину.

Планшету Nunc F96-MaxiSorp-Immuno покривали козячим антилюдським IgG (Fc-специфічним) [NatuTec A80-104A]. Антитіло розбавляли до 10 мкг/мл у карбонатному буфері для нанесення покриттів (50 мм карбонату натрію, pH 9,6) і додавали по 50 мкл на ямку. Планшету запечатували клейкою стрічкою і зберігали протягом ночі при температурі 4 °C. Планшету тричі промивали промивним буфером (PBS pH 7,4 0,1 % Tween20). 150 мкл блокуючого розчину (1 % BSA/PBS) додавали в кожну ямку планшети. Через 1 годину при кімнатній температурі планшету промивали 3 рази промивним буфером. Додавали 100 мкл зразка або стандартів (у діапазоні від 1500 нг/мл до 120 нг/мл) і залишали на 1 годину при кімнатній температурі. Планшету 3 рази промивали промивним буфером. 100 мкл козячого антилюдського IgG-FC-HRP кон'югата [NatuTec A80-104P-60], розведеного в пропорції 1:10000, додавали за допомогою інкубаційного розчину (0,1 % BSA, PBS р 7,4, 0,05 % Tween20). Через 1 годину інкубації при кімнатній температурі планшету промивали 3 рази промивним буфером. 100 мкл субстрату ABTS (10 мг таблетка ABTS (Pierce 34026) у мл розчину 0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,05 M лимонної кислоти, pH 5,0. Додавали 10 мкл 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2/10</sub> мл буфера субстрату перед використанням) у кожну з ямок до появи забарвлення. Після появи забарвлення (приблизно через 10-15 хвилин) додавали 50 мкл 1 % розчину SDS, щоб зупинити реакцію. Планшету переглядали на A405.

Білки очищували афінною хроматографією із середовищем Protein A (HiTrap™ Protein A HP Columns, GE Life Sciences). Після елюювання з колонки ацетатним буфером 100 мм із 100 мм NaCl pH 3,5 одержували моноклональні антитіла в PBS і фільтрували їх через фільтр 0,22 мкм. Концентрацію білка визначали за поглинанням на довжині хвилі 280 нм. Кожну партію аналізували за допомогою набору Protein 200 Plus LabChip на біоаналізаторі Agilent 2100 у відновних і невідновних умовах для визначення чистоти і молекулярної ваги кожної субодиниці і мономера.

#### ПРИКЛАД 6: ХАРАКТЕРИЗАЦІЯ ГУМАНІЗОВАНИХ ВАРІАНТІВ КЛОНУ В-В13 АНТИ-IL-13 І ГУМАНІЗОВАНИХ ВАРІАНТІВ КЛОНУ 8D4-8 АНТИ-IL-4

Реагенти рекомбінантних IL-13 і IL-4 людини отримували в компанії Chemicon (США). Кінетичний аналіз Віасоре виконували в такий спосіб.

Для докладної кінетичної характеристики очищених антитіл використовували технологію поверхневого плазмонного резонансу на Віасоре 3000 (GE Healthcare). Застосовували аналіз методом пастки за допомогою антитіла, специфічного до видів (наприклад, людського Fc специфічного MAB 1302, Chemicon) для захоплення й орієнтації досліджуваних антитіл. Антитіло-пастку робили нерухомим первинними амінами групами (10000 RU) на чипі дослідницького класу CM5 (GE Life Sciences) за допомогою стандартних методів. Аналізоване антитіло ловили з відрегульованим значенням RU, що призводить до максимального зв'язування аналізованої речовини при 30 RU і швидкості потоку 10 мкл/хв. Вимірювали кінетику зв'язування залежно від рекомбінантного людського IL-4 і IL-13 у діапазоні концентрацій від 0 до 50 нм у HBS EP (10 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0,005 % поверхнево-активна речовина P20) при швидкості потоку 30 мкл/хв. Поверхні чипа регенерували за допомогою 10 mM гліцину pH 2,5. Кінетичні параметри аналізували й обчислювали в програмному пакеті BIAevaluation за допомогою проточної кювети без антитіла-пастки як контрольного зразка. Для дослідження адитивного зв'язування обох антигенів застосовували автоматичний метод одночасної інжекції, в якому інjektували один антиген, а відразу після цього - суміш антигенів IL-13/IL-4.

Антитіла, що складають предмет даного винаходу, вимірювали на біологічну активність, вимірюючи інгібування проліферації клітин, опосередкованої IL-4 або IL-13. Одним словом, заявники використовували IL-4 або IL-13 для стимуляції росту клітин TF-1. TF-1 - це лінія клітин, залежна від цитокінів для росту, що реагує на багато цитокінів, у тому числі IL-4 і IL-13. Індукований ріст (у порівнянні з нормальними умовами у відсутності цитокіну) представляє біологічну активність IL-4 або IL-13. Анти-IL-4, анти-IL-13 і біспецифічні антитіла анти-IL-4/IL-13, як з'ясувалося, блокують ріст клітин TF-1, індукований IL-4 або IL-13. Крім того, біспецифічні антитіла анти-IL-4/IL-13, як було показано, блокують проліферацію клітин TF-1, індуковану комбінованою стимуляцією IL-4 і IL-13. Блокувальний ефект вимірювали залежним від дози чином з одержанням IC50 (концентрації антитіла з 50 % інгібуванням) як здатність до

нейтралізації антитілом його мішені, тобто IL-4 або IL-13. Методи, що використовувалися, докладніше описані нижче.

Клітини TF-1 (ATCC, CRL-2003) витримували в повному середовищі (DMEM з високим вмістом глюкози, 25 мМ буфера HEPES і глутаміном, 10 % FBS, ІxP/S, 1 мМ пірувату натрію), що містить тільки що доданий hGM-CSF у кінцевій концентрації 4 нг/мл. За 24 години до обробки IL-13 (15 нг/мл) або IL-4 (1 нг/мл). Клітини висівали в 96-ямковій планшеті в кількості  $0,05 \times 10^6$ /мл у повному середовищі без hGM-CSF. Послідовно розведені розчини антитіла з відповідним цитокином попередньо інкубували протягом 30 хвилин при температурі 37 °C, перше ніж додавати до клітин. Клітини культивували протягом 72 годин (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Додавали водний розчин MTS/PMS cellTiter 96. Потім клітини інкубували протягом 3 годин. Після закінчення цього періоду записували поглинання на довжині хвилі 490 нм за допомогою пристрою для читання планшет. Значення IC50 обчислювали за допомогою програми Speed.

Кінетика зв'язування й активність нейтралізації гуманізованих варіантів B-B13 показана в таблиці 3. (nt=Не тестувалося).

Таблиця 3

Антитіло	Швидкість асоціації (M <sup>-1</sup> xS <sup>-1</sup> )	Швидкість дисоціації (S <sup>-1</sup> )	KD (M)	IC50 (M)
мишаче B-B13	8,64E+05	3,73E-04	5,63E-10	Nt
chB-B13WT	1,76E+06	4,61E-04	2,61E-10	7,4E-9
huB-B13 VL1xVH1	1,74E+06	6,91E-04	3,96E-10	1,57E-8
huB-B13 VL1xVH3	1,93E+06	3,95E-04	2,05E-10	Nt
huB-B13VL2xVH2	1,13E+06	1,77E-04	1,57E-10	Nt
huB-B13 VL3xVH1	1,93E+06	3,33E-04	1,72E-10	5,2E-9
huB-B13VL3xVH2	2,55E+06	1,12E-04	4,39E-11	3,2E-9
huB-B13VL3xVH3	2,14E+06	4,05E-04	1,89E-10	Nt

Один гуманізований варіант B-B 13, huB-B13 VL3xVH2, має значно більш високу афінність у порівнянні з оригінальним мишачою B-B 13 (у 13 разів) і химерним B-B 13 (у 6 разів). Підвищена афінність може призвести до підвищеної активності й ефективності, коли ці гуманізовані антитіла анти-IL-13 будуть використовуватися для лікування хворих астмою. Крім того, гуманізовані антитіла можуть мати знижену імуногенність у порівнянні з мишачим антитілом або химерним антитілом при використанні в організмі людини.

Кінетика зв'язування й активність нейтралізації гуманізованих варіантів 8D4-8 показана в таблиці 4.

Таблиця 4

Антитіло	Швидкість асоціації (M <sup>-1</sup> xS <sup>-1</sup> )	Швидкість дисоціації (S <sup>-1</sup> )	KD (M)	IC50 (M)
мишаче 8D4-8	5,57E+06	2,17E-04	3,77E-11	9,7E-11
ch8D4-8 WT	2,49E+07	1,95E-04	7,83E-12	8,4E-11
Hu8D4-8 VL1xVH1	4,72E+07	1,55E-04	3,29E-12	4,1E-11
Hu8D4-8 VL1XVH2	2,57E+07	3,48E-04	1,39E-11	1,35E-10

Один гуманізований варіант 8D4-8, hu8D4-8 VL1xVH1, має значно більш високу афінність у порівнянні з оригінальним мишачою 8D4-8 (у 11 разів) і химерним 8D4-8 (у 2 рази). Підвищена афінність може призвести до підвищеної активності й ефективності, коли це гуманізоване антитіло анти-IL-4 буде використовуватися для лікування хворих астмою. Крім того, гуманізоване антитіло може мати знижену імуногенність у порівнянні з мишачим антитілом або химерним антитілом при використанні в організмі людини.

**ПРИКЛАД 7: КЛОНУВАННЯ І ГЕНЕРАЦІЯ ГУМАНІЗОВАНИХ БІСПЕЦИФІЧНИХ АНТИ-IL-4/IL-13**

Формат, що використовувався для експресії біспецифічних антитіл (BsAb), - варіант IgG дводоменного формату з двома голівками, описаного в патенті США 5989830. У цьому форматі молекула IgG подовжена за кінцевим N-залишком відповідного важкого або легкого ланцюга додатковим варіабельним доменом другого антитіла. Таким чином, отримувана молекула IgG являє собою гетеротетрамер, що складається з двох важких і двох легких ланцюгів. Важкі ланцюги складаються з двох варіабельних важких доменів (VH1-VH2), що походять від двох



різних антитіл, з'єднаних містком, що складається з десяти амінокислот (G4S)<sub>2</sub>, і злитих з постійним доменом IgG4. Легкі ланцюги складаються з двох варіабельних легких доменів (VL1-VL2), що походять від двох різних антитіл, з'єднаних містком, що складається з десяти амінокислот (G4S)<sub>2</sub>, і злитих з постійною каппа-ділянкою.

Послідовності для варіабельних важких і легких доменів варіантів 8D4-8 генерували ПЛР, із введенням сайту рестрикції BamHI (GGA TCC) у відповідні 5'-кінці, що кодує частину (G4S)<sub>2</sub>-(GGA TCC-8D4-8). Послідовність 3' VH гуманізованих варіантів 8D4-8 закінчувалася сайтом рестрикції Apa (що кодує перші амінокислоти домену CH1) для наступного зливання з послідовністю IGHG4 (Q569F4, з детектуванням кінцевого Lys і S241P і L248E подвійної мутації). 3'-кінець VL8D4-8 закінчувалася сайтом рестрикції BsiWI, що кодує перші дві амінокислоти постійного каппа-ланцюга для наступного зливання з IGKC (номер у каталозі Gene Bank Q502W4).

Послідовності для варіабельних важких і легких доменів варіантів B-B13 генерували ПЛР із введенням сайту рестрикції BamHI у відповідні 3'-кінці, що кодує частину (G4S)<sub>2</sub>-(B-B13)-(GGA GGC GGA GGC TCC GGA GGC GGA GGA TCC (SEQ ID NO: 7)). Обидві послідовності для VH і VL варіантів B-B13 генерували із сайтом рестрикції Nhe у відповідних 5'-кінцях з наступним стартовим кодоном ATG і послідовністю кодування лідерного пептиду.

VH B-B13 і 8D4-8 зливали за положеннями BamHI у лінкері (G4S)<sub>2</sub>. VL B-B13 і 8D4-8 зливали за положеннями BamHI у лінкері (G4S)<sub>2</sub>. Таким чином, генеровані тандеми важких і легких ланцюгів мали наступний склад.

Важкий ланцюг біспецифічного антитіла: NheI-лідерний пептид-VH-B-B13 -(G4S)<sub>2</sub>-VH 8D4-8-Apa.

Легкий ланцюг біспецифічного антитіла: NheI-лідерний пептид-VL-B-B13 -(G4S)<sub>2</sub>-VL 8D4-8-BsiWI.

Усі проміжні фрагменти ПЛР клонували в pCR®4-TOPO за допомогою комплексу для клонування Invitrogen TOPO TA (кат. №: 45-0641) і секвенували за допомогою прямих M13 і зворотних M13 праймерів.

Після перевірки послідовності тандеми з важким ланцюгом зливали по положенню Apa з послідовністю IGHG4, а перемінні тандеми з легким ланцюгом зливали по положенню BsiWI з IGKC. Отриманий дводомений важкий ланцюг і легкий ланцюг обробляли Nhe і HindIII і лігували в положення Nhe/HindIII вектора епісомальної експресії pXL, створюючи плазмиди для експресії ссавцями TBTI-важких і легких ланцюгів, відповідно.

Чотири гуманізовані біспецифічні конструкції анти-IL-4/анти-IL-13 генерували на основі наступних поєднань гуманізованих версій VH і VL B-B13 і 8D4-8, як показано в таблиці 5.

Таблиця 5

Біспецифічне антитіло анти-IL-4/анти-IL-13	Анти-IL-13 Fv	Анти-IL-4 Fv
huTBT13_1_1	B-B13VL3xVH2	8D4-8 VL1xVH2
huTBT13_2_1	B-B13VL3xVH2	8D4-8 VL1xVH1
huTBT13_1_2	B-B13VL2xVH2	8D4-8 VL1xVH2
huTBT13_2_2	B-B13VL2xVH2	8D4-8 VL1xVH1

#### ПРИКЛАД 8: ХАРАКТЕРИЗАЦІЯ ГУМАНІЗОВАНИХ БІСПЕЦИФІЧНИХ АНТИТІЛ

Аналіз активності зв'язування і нейтралізації проводили відповідно до опису, наведеним у попередніх прикладах.

У таблиці 6 показана кінетика зв'язування чотирьох гуманізованих варіантів антитіл анти-IL-4/IL-13. Усі чотири конструкції біспецифічних антитіл зв'язуються з IL-4 і IL-13 з високою афінністю.

Таблиця 6

BsAB	Афінність IL-13			Афінність IL-4		
	Швидкість асоціації (M <sup>-1</sup> xS <sup>-1</sup> )	Швидкість дисоціації (S <sup>-1</sup> )	KD(M)	Швидкість асоціації (M <sup>-1</sup> xS <sup>-1</sup> )	Швидкість дисоціації (S <sup>-1</sup> )	KD(M)
huTBTB-1_1	2,27E+06	1,70E-04	7,47E-11	2,55E+06	3,78E-04	1,48E-10
huTBTB-2_1	2,17E+06	1,69E-04	7,80E-11	4,00E+06	1,39E-04	3,47E-11
huTBT13-1_2	8,50E+05	1,64E-04	1,93E-10	2,23E+06	3,08E-04	1,38E-10
huTBTB-2_2	8,20E+05	2,12E-04	2,59E-10	3,96E+06	1,32E-04	3,32E-11

Дані про активність нейтралізації гуманізованих варіантів біспецифічного антитіла анти-IL-4/IL-13 наведені в таблиці 7. І huTBT13-1\_1, і huTBT13-2\_1 цілком нейтралізували проліферацію клітин TF-1, індуковану IL-13 або IL-4, зі значеннями IC50, наведеними нижче.

5

Таблиця 7

Антитіло	IC50 (нМ) в аналізі IL-13	IC50 (нМ) в аналізі IL-4
huTBTB-1_1	3,7	1,7
huTBT13-2_1	4,1	0,32

Добре відомо, що мутантна алель IL-13 часто пов'язана з астмою (Heinzmann A. et al., 2000, Hum Mol Genet 9, 4, p549-559). Тому була вивчена кінетика зв'язування біспецифічних антитіл з мутантним білком IL-13 (варіант IL-13 людини R112Q, PerproTech, Rocky Hill, NJ, USA). Результати показали, що huTBTB-1\_1 і huTBT13-2\_1 зв'язуються з варіантом IL-13 так само, як і з IL-13 дикого типу.

10

У таблиці 8 показана кінетика зв'язування гуманізованих молекул анти-IL-4/IL-13 з мутантним білком IL-13.

Таблиця 8

BsAB	Афінність варіанта IL13		
	Швидкість асоціації (M <sup>-1</sup> ×S <sup>-1</sup> )	Швидкість дисоціації (S <sup>-1</sup> )	KD (M)
huTBT13-1_1	9,74E+05	1,18E-04	1,21E-10
huTBT13-2_1	9,48E+05	2,00E-04	2,11E-10

15

# ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

&lt;110&gt; sanofi-aventis US Inc

Rao, Ercole

Mikol, Vincent

20

Li, Danxi

Kruip, Jochen

Davison, Matthew

&lt;120&gt; АНТИТІЛО, ЩО ЗВ'ЯЗУЄТЬСЯ З IL-4 І IL-13 І ЙОГО ЗАСТОСУВАННЯ

&lt;130&gt; US2008/020

25

&lt;160&gt; 7

&lt;170&gt; PatentIn версія 3.5

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 111

&lt;212&gt; Білок

30

&lt;213&gt; Штучна послідовність

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; гуманізована миша/ VL3 область миші

&lt;400&gt; 1

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

<210> 2

<211> 118

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> гуманізована миша/ VH2 область миші

<400> 2

5

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

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Ser  
20 25 30

Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu  
35 40 45

Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Arg Ile Asp Tyr Ala Asp Ala Leu Lys  
50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Ser Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu  
65 70 75 80

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

Arg Asp Gly Tyr Phe Pro Tyr Ala Met Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 3

<211> 108

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> гуманізована миша/ VL1 область миші

<400> 3

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

Asp Thr Ile Thr Leu Thr Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Asp Val Trp  
20 25 30

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

Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

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

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

5

10

5 <210> 4  
 <211> 124  
 <212> Білок  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> гуманізована миша/ VH1 область миші  
 <400> 4  
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30  
 Trp Ile His Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Gly Glu Thr Arg Leu Asn Gln Arg Phe  
 50 55 60  
 Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Gln Leu Arg Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Thr Arg Leu Lys Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Ser Phe Tyr Phe Asp Val  
 100 105 110  
 Trp Gly Ala Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala  
 115 120  
 10 <210> 5  
 <211> 124  
 <212> Білок  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> гуманізована миша/ VH2 область миші  
 15 <400> 5

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

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

Trp Ile His Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Met Ile Asp Ala Ser Asp Gly Glu Thr Arg Leu Asn Gln Arg Phe  
50 55 60

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

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

Thr Arg Leu Lys Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Ser Phe Tyr Phe Asp Val  
100 105 110

Trp Gly Ala Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala  
115 120

- 5 <210> 6  
<211> 10  
<212> Білок  
<213> Штучна послідовність  
<220>  
<223> лінкер  
<400> 6

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
1 5 10

- 10 <210> 7  
<211> 30  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність  
<220>  
15 <223> праймер  
<400>

7

ggaggcggag ggtccggagg cggaggatcc

30

20

## ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Біспецифічне антитіло, що специфічно зв'язується з IL-13 і IL-4, де біспецифічне антитіло містить молекулу IgG з двома легкими ланцюгами і двома важкими ланцюгами, де кожний легкий ланцюг подовжений на своєму N-кінці додатковим варіабельним доменом легкого ланцюга, і кожний важкий ланцюг подовжений на своєму N-кінці додатковим варіабельним доменом важкого ланцюга, і  
25 де:  
(а) легкі ланцюги містять амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 1, додатковий варіабельний домен легкого ланцюга містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 3, важкі ланцюги

містять амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2, і додатковий варіабельний домен важкого ланцюга містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 4;

(b) легкі ланцюги містять амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 1, додатковий варіабельний домен легкого ланцюга містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 3, важкі ланцюги містять амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2, і додатковий варіабельний домен важкого ланцюга містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 5;

(c) легкі ланцюги містять амінокислотні послідовності RASESVDSYGQSYM (SEQ ID NO: 8), LASNLES (SEQ ID NO: 9) і QQNAEDSRT (SEQ ID NO: 10), додатковий домен легкого ланцюга містить амінокислотні послідовності HASQNIDVWLS (SEQ ID NO: 14), KASNLHTG (SEQ ID NO: 15) і QQAHSYPFT (SEQ ID NO: 16), важкі ланцюги містять амінокислотні послідовності GFSLTDSSIN (SEQ ID NO: 11), DGRID (SEQ ID NO: 12) і DGYFPYAMDF (SEQ ID NO: 13), і додатковий варіабельний домен важкого ланцюга містить амінокислотні послідовності GYSFTSYWIH (SEQ ID NO: 17), IDPSDGETR (SEQ ID NO: 18) і LKEYGNYDSFYFDV (SEQ ID NO: 19); або

(d) легкі ланцюги містять амінокислотні послідовності RASESVDSYGQSYM (SEQ ID NO: 8), LASNLES (SEQ ID NO: 9) і QQNAEDSRT (SEQ ID NO: 10), додатковий варіабельний домен легкого ланцюга містить амінокислотні послідовності HASQNIDVWLS (SEQ ID NO: 14), KASNLHTG (SEQ ID NO: 15) і QQAHSYPFT (SEQ ID NO: 16), важкі ланцюги містять амінокислотні послідовності GFSLTDSSIN (SEQ ID NO: 11), DGRID (SEQ ID NO: 12) і DGYFPYAMDF (SEQ ID NO: 13), і додатковий варіабельний домен важкого ланцюга містить амінокислотні послідовності GYSFTSYWIH (SEQ ID NO: 20), IDASDGETR (SEQ ID NO: 21) і LKEYGNYDSFYFDV (SEQ ID NO: 22).

2. Біспецифічне антитіло, або фрагмент цього біспецифічного антитіла, що специфічно зв'язується з IL-13 і IL-4, де біспецифічне антитіло, або фрагмент цього біспецифічного антитіла, містить першу пару поліпептидів і другу пару поліпептидів;

де перша пара поліпептидів містить зовнішній (N-кінцевий) варіабельний домен легкого ланцюга, зв'язаний з внутрішнім (C-кінцевим) варіабельним доменом легкого ланцюга, який зв'язаний з константним доменом легкого ланцюга (CL), і друга пара поліпептидів містить зовнішній (N-кінцевий) варіабельний домен важкого ланцюга, зв'язаний з внутрішнім (C-кінцевим) варіабельним доменом важкого ланцюга, який зв'язаний з константним доменом важкого ланцюга (CH1); і

де:

(a) зовнішній (N-кінцевий) варіабельний домен легкого ланцюга включає CDR<sub>s</sub>, що містять амінокислотні послідовності RASESVDSYGQSYM (SEQ ID NO: 8), LASNLES (SEQ ID NO: 9) і QQNAEDSRT (SEQ ID NO: 10), і де зовнішній варіабельний легкий ланцюг містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 95 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 1, внутрішній (C-кінцевий) варіабельний домен легкого ланцюга включає CDR<sub>s</sub>, що містять амінокислотні послідовності HASQNIDVWLS (SEQ ID NO: 14), KASNLHTG (SEQ ID NO: 15) і QQAHSYPFT (SEQ ID NO: 16), і де внутрішній варіабельний легкий ланцюг містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 95 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 3, зовнішній (N-кінцевий) варіабельний домен важкого ланцюга включає CDR<sub>s</sub>, що містять амінокислотні послідовності GFSLTDSSIN (SEQ ID NO: 11), DGRID (SEQ ID NO: 12) і DGYFPYAMDF (SEQ ID NO: 13), і де зовнішній варіабельний важкий ланцюг містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 95 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 2, і внутрішній (C-кінцевий) варіабельний домен важкого ланцюга включає CDR<sub>s</sub>, що містять амінокислотні послідовності GYSFTSYWIH (SEQ ID NO: 17), IDPSDGETR (SEQ ID NO: 18) і LKEYGNYDSFYFDV (SEQ ID NO: 19), і де внутрішній варіабельний важкий ланцюг містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 95 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 4;

(b) зовнішній (N-кінцевий) варіабельний домен легкого ланцюга включає CDR<sub>s</sub>, що містять амінокислотні послідовності RASESVDSYGQSYM (SEQ ID NO: 8), LASNLES (SEQ ID NO: 9) і QQNAEDSRT (SEQ ID NO: 10), і де зовнішній варіабельний легкий ланцюг містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 95 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 1, внутрішній (C-кінцевий) варіабельний домен легкого ланцюга включає CDR<sub>s</sub>, що містять амінокислотні послідовності HASQNIDVWLS (SEQ ID NO: 14), KASNLHTG (SEQ ID NO: 15) і QQAHSYPFT (SEQ ID NO: 16), і де внутрішній варіабельний легкий ланцюг містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 95 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 3, зовнішній (N-кінцевий) варіабельний домен важкого ланцюга включає CDR<sub>s</sub>, що містять амінокислотні послідовності GFSLTDSSIN (SEQ ID NO: 11), DGRID (SEQ ID NO: 12) і DGYFPYAMDF (SEQ ID NO: 13), і де зовнішній варіабельний важкий ланцюг містить

амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 95 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 2, і внутрішній (С-кінцевий) варіабельний домен важкого ланцюга включає CDR<sub>s</sub>, що містять амінокислотні послідовності GYSFTSYWIH (SEQ ID NO: 17), IDASDGETR (SEQ ID NO: 21) і LKEYGNYDSFYFDV (SEQ ID NO: 19), і де внутрішній варіабельний важкий ланцюг містить

5 амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 95 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 5;

(с) зовнішній (N-кінцевий) варіабельний домен легкого ланцюга включає CDR<sub>s</sub>, що містять амінокислотні послідовності HASQNIDVWLS (SEQ ID NO: 14), KASNLHTG (SEQ ID NO: 15) і QQAHNSYPFT (SEQ ID NO: 16), і де зовнішній варіабельний легкий ланцюг містить амінокислотну

10 послідовність, яка щонайменше на 95 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 3, внутрішній (С-кінцевий) варіабельний домен легкого ланцюга включає CDR<sub>s</sub>, що містять амінокислотні послідовності RASESVDSYGQSYM (SEQ ID NO: 8), LASNLES (SEQ ID NO: 9) і QQNAEDSRT (SEQ ID NO: 10), і де внутрішній варіабельний легкий ланцюг містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 95 % ідентична амінокислотній послідовності

15 SEQ ID NO: 1, зовнішній (N-кінцевий) варіабельний домен важкого ланцюга включає CDR<sub>s</sub>, що містять амінокислотні послідовності GYSFTSYWIH (SEQ ID NO: 17), IDPSDGETR (SEQ ID NO: 18) і LKEYGNYDSFYFDV (SEQ ID NO: 19), і де зовнішній варіабельний важкий ланцюг містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 95 % ідентична амінокислотній послідовності

20 SEQ ID NO: 4, і внутрішній (С-кінцевий) варіабельний домен важкого ланцюга включає CDR<sub>s</sub>, що містять амінокислотні послідовності GFSLTDSSIN (SEQ ID NO: 11), DGRID (SEQ ID NO: 12) і DGYFPYAMDF (SEQ ID NO: 13), і де внутрішній варіабельний важкий ланцюг містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 95 % ідентична амінокислотній послідовності

SEQ ID NO: 2; або

(d) зовнішній (N-кінцевий) варіабельний домен легкого ланцюга включає CDR<sub>s</sub>, що містять амінокислотні послідовності HASQNIDVWLS (SEQ ID NO: 14), KASNLHTG (SEQ ID NO: 15) і QQAHNSYPFT (SEQ ID NO: 16), і де зовнішній варіабельний легкий ланцюг містить амінокислотну

25 послідовність, яка щонайменше на 95 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 3, внутрішній (С-кінцевий) варіабельний домен легкого ланцюга включає CDR<sub>s</sub>, що містять амінокислотні послідовності RASESVDSYGQSYM (SEQ ID NO: 8), LASNLES (SEQ ID NO: 9) і QQNAEDSRT (SEQ ID NO: 10), і де внутрішній варіабельний легкий ланцюг містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 95 % ідентична амінокислотній послідовності

30 SEQ ID NO: 1, зовнішній (N-кінцевий) варіабельний домен важкого ланцюга включає CDR<sub>s</sub>, що містять амінокислотні послідовності GYSFTSYWIH (SEQ ID NO: 17), IDASDGETR (SEQ ID NO: 21) і LKEYGNYDSFYFDV (SEQ ID NO: 19), і де зовнішній варіабельний важкий ланцюг містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 95 % ідентична амінокислотній послідовності

35 SEQ ID NO: 5, і внутрішній (С-кінцевий) варіабельний домен важкого ланцюга включає CDR<sub>s</sub>, що містять амінокислотні послідовності GFSLTDSSIN (SEQ ID NO: 11), DGRID (SEQ ID NO: 12) і DGYFPYAMDF (SEQ ID NO: 13), і де внутрішній варіабельний важкий ланцюг містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 95 % ідентична амінокислотній послідовності

40 SEQ ID NO: 2.

3. Біспецифічне антитіло, або фрагмент цього біспецифічного антитіла, за п. 1, де амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 1 і SEQ ID NO: 3 зв'язані з пептидним лінкером, і амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 2 і SEQ ID NO: 4 або SEQ ID NO: 5 зв'язані разом з пептидним лінкером.

45 4. Біспецифічне антитіло, або фрагмент цього біспецифічного антитіла, за п. 2, де амінокислотні послідовності зовнішнього варіабельного легкого ланцюга і внутрішнього варіабельного легкого ланцюга зв'язані разом з пептидним лінкером, і амінокислотні послідовності зовнішнього варіабельного важкого ланцюга і внутрішнього варіабельного важкого ланцюга зв'язані разом з пептидним лінкером.

50 5. Біспецифічне антитіло, або фрагмент цього біспецифічного антитіла, за п. 4, де пептидний лінкер складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 6.

6. Біспецифічне антитіло, або фрагмент цього біспецифічного антитіла, за п. 2, що додатково містить константні домени.

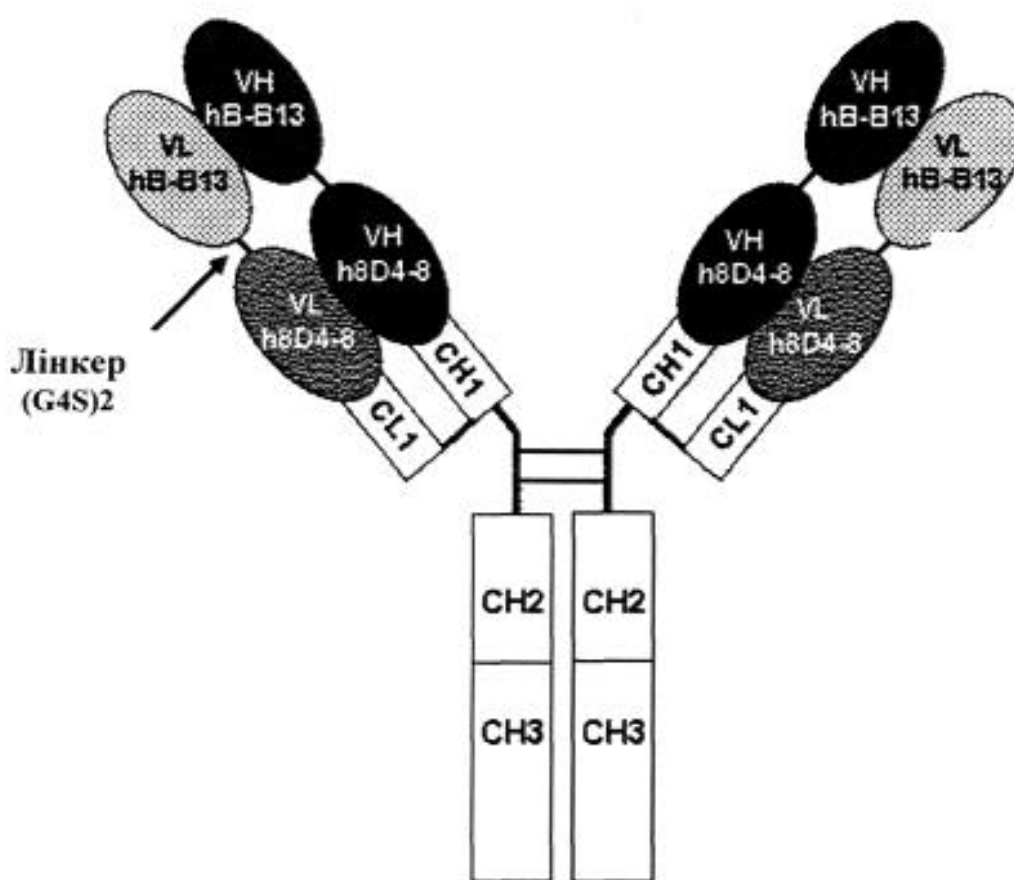
7. Біспецифічне антитіло, або фрагмент цього біспецифічного антитіла, за п. 6, де додаткові константні домени складаються з CH2 і CH3.

8. Фармацевтична композиція, яка містить біспецифічне антитіло, або фрагмент цього біспецифічного антитіла, за п. 1 або 2 і фармацевтично прийнятний носій.

9. Біспецифічне антитіло, або фрагмент цього біспецифічного антитіла, за п. 1 або 2, що додатково містить мітку, де мітка є радіоміткою, флуорофором, хромофором, засобом візуалізації і іоном металу.



10. Біспецифічне антитіло, або фрагмент цього біспецифічного антитіла, за п. 1 або 2, яке додатково кон'юговане з ефекторною молекулою.
11. Біспецифічне антитіло, або фрагмент цього біспецифічного антитіла, за п. 10, де ефекторна молекула вибрана з групи, яка складається з гетерологічних поліпептидів, лікарських засобів, радіонуклеотидів і токсинів.
12. Молекула нуклеїнової кислоти, що кодує біспецифічне антитіло, або фрагмент цього біспецифічного антитіла, за п. 1 або 2.
13. Вектор, що містить молекулу нуклеїнової кислоти за п. 12.
14. Прокаріотична, дріжджова або грибова клітина-хазяїн, що містить вектор за п. 13.
15. Спосіб лікування IL-4 і/або IL-3-опосередкованого захворювання у ссавця, що передбачає стадію введення ссавцеві терапевтично ефективної кількості біспецифічного антитіла, або фрагмента цього біспецифічного антитіла, за п. 1 або 2.
16. Спосіб за п. 15, де IL-4 і/або IL-3-опосередкованого захворювання є алергічним захворюванням, раком, астмою, захворюванням, пов'язаним з патологічною продукцією IL-4 і/або IL-13, аутоімунним захворюванням, склеродермою або ідіопатичним легеневим фіброзом.



Фіг. 1

Anti-IL13 hB-B13 VL3 (SEQ ID NO: 1):

DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASESVD SYGQSYMHWY QQKAGQPPKL  
LIYLASNLES GVPARFSGSG SRTDFTLTID PQAEDAATY YCQQNAEDSR  
TFGGGTKLEI K

Anti-IL13 hB-B13 VH2 (SEQ ID NO: 2):

EVQLKESGPG LVARGGSLSI TCTVSGFSLT DSSINWVRQP PGKGLEWLGM  
IWGDGRIDYA DALKSRLSIS KDSSKSQVFL EMTSLRTDDT ATYYCARDGY  
FPYAMDFWGQ GTSVTVSS

Anti-IL4 h8D4-8 VL1 (SEQ ID NO: 3):

DIQMTQSPAS LSVSVGDTIT LTCHASQNID VWLSWFQQKP GNIPKLLIYK  
ASNLHTGVPS RFSGSGSGTG FTLTISSLQP EDIATYYQQ AHSYPFTFGG  
GTKLEIKR

Anti-IL4 h8D4-8 VH1 (SEQ ID NO: 4):

QVQLQQSGPE LVKPGASVKI SCKASGYSFT SYWIHWIKQR PGQGLEWIGM  
IDPSDGETRL NQRFQGRATL TVDESTSTAY MQLRSPTSED SAVYYCTRLK  
EYGNYSFYF DVWGAGTLVT VSSA

Anti-IL4 h8D4-8 VH2 (SEQ ID NO: 5):

QVQLQQSGPE LVKPGASVKI SCKASGYSFT SYWIHWIKQR PGQGLEWIGM  
IDASDGETRL NQRFQGRATL TVDESTSTAY MQLRSPTSED SAVYYCTRLK  
EYGNYSFYF DVWGAGTLVT VSSA

Фиг. 2

---

Комп'ютерна верстка Л. Бурлак

---

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

---

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