



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **119531** (13) **C2**
(51) МПК (2019.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)
A61P 37/00

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2015 01708**
(22) Дата подання заявки: **31.10.2013**
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **10.07.2019**
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **61/720,892, 12199191.3**
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **31.10.2012, 21.12.2012**
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **US, EP**
(41) Публікація відомостей про заявку: **27.07.2015, Бюл.№ 14**
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **10.07.2019, Бюл.№ 13**
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: **РСТ/EP2013/072761, 31.10.2013**

(72) Винахідник(и):
**Урбіг Томас (DE),
Бем Томас (DE),
Штайнгільбер Вольфрам (DE),
Мольгой Міхаель (DE)**
(73) Власник(и):
АМГЕН РІСЕРЧ (МЮНІК) ГМБГ,
Staffelseestr. 2, 81477 Munich, Germany (DE),
ТАКЕДА ГМБГ,
Byk-Gulden-Strasse 2, 78467 Konstanz,
Germany (DE)
(74) Представник:
Крилова Надія Іванівна, реєстр. №30
(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
WO 03009817 A2, 06.02.2003
US 2006088523 A1, 27.04.2006
WO 2011080209 A2, 07.07.2011
EP 2399604 A1, 28.12.2011
EP 2399604 A1, 28.12.2011
WO 2011104381 A2, 01.09.2011
WO 2009038760 A2, 26.03.2009
Wang W. Antibody structure, instability, and formulation / Wei Wang, Satish Singh, David L. Zeng et al. // Journal of pharmaceutical sciences – 2007. - Vol. 96 (1). - P. 1-26
Sane S. U. Raman spectroscopic characterization of drying-induced structural changes in a therapeutic antibody: correlating structural changes with long-term stability / Samir U. Sane, Rita Wong, Chung C. Hsu // Journal of pharmaceutical sciences – 2004. - Vol. 93 (4). - P. 1005-1018
Yatin R. Gokarn self-buffering antibody formulations / Yatin R. Gokarn, Eva Kras, Carrie Nodgaard et al. // Journal of pharmaceutical sciences – 2008. - Vol. 97 (8). - P. 3051-3066
Warne N.W. Development of high concentration protein biopharmaceuticals: The use of platform approaches in formulation development / Nicholas W. Warne // European journal of pharmaceuticals and biopharmaceuticals. – 2011. - Vol. 78. - P. 208-211

(54) ВОДНА КОМПОЗИЦІЯ, ЯКА МІСТИТЬ СПОЛУКУ, ЩО НЕЙТРАЛІЗУЄ ГМ-КСФ

UA 119531 C2

(57) Реферат:

Винахід стосується водної композиції, яка містить сполуку, що нейтралізує ГМ-КСФ, у концентрації від 100 мг/мл до 180 мг/мл, 5% сорбіту, 30 мМ L-гістидину та має рН 5,8. Також винахід стосується способу лікування запальних та аутоімунних розладів шляхом введення водної композиції та набору, що містить таку композицію.

[0001] Винахід стосується стійких рідких композицій, які містять сполуку, що нейтралізує гранулоцито-макрофагальний-колонієстимулюючий фактор (ГМ-КСФ). Інгредієнти цих композицій переважно надають стійкості протягом довготривалого зберігання та циклів заморожування-відтавання. Переважно ці композиції призначені для застосування у терапії, переважно для застосування у лікуванні запальних та автоімунних розладів, які переважно охоплюють алергічні та псоріатичні розлади, а також розлади, пов'язані з артритом та бронхіальною астмою. Також передбачено набір, який містить композиції за винаходом.

[0002] Білки широко застосовують у фармацевтичній галузі для отримання ветеринарних, косметичних та інших продуктів, харчових продуктів для людини та тварин, а також у діагностиці, промисловій хімії та у боротьбі з забрудненнями. Час від часу такі застосування обмежуються через стримуючі фактори, притаманні білкам, оточенню або середовищу, в якому їх застосовують. Результатом таких обмежень може бути низька стійкість білків, мінливість їх характеристик та висока вартість. У зв'язку з появою біотехнології стає можливим отримати великий вибір білків для терапевтичного застосування. Після отримання білкові фармацевтичні композиції звичайно зберігають перед застосуванням та завдяки цьому факту ці білки звичайно є більшими та складнішими, ніж "традиційні" білки у складі фармацевтичних композицій, отже отримання та обробка прийнятних для зберігання білкових фармацевтичних композицій може бути особливо складною. Огляд таких композицій та розробку процесу їх отримання див. у Carpenter et al. (1997), Pharm. Res. 14: 969-975; Wang (2000), Int. J. Pharmaceutics 203: 1-60; та Tang and Pikal (2004), Pharm. Res. 21: 191-200.

[0003] При розробці композицій та процесів отримання білкової продукції фармацевтичного призначення можуть бути розглянуті декілька факторів. Головним питанням є стійкість білка протягом одного або всіх етапів виробництва, перевезення та обробки, які можуть охоплювати отримання композиції, заморожування, ліофілізацію, сушіння, зберігання, транспортування, відновлення, цикли заморожування-відтавання та зберігання кінцевим користувачем після відновлення. Інші потенційні фактори, які необхідно враховувати охоплюють легкість та економічність у виробництві, користуванні та постачанні; отримання кінцевого продукту для введення пацієнту; та зручність у застосуванні кінцевим користувачем, в тому числі розчинність ліофілізованої композиції після відновлення.

[0004] Рідкі композиції можуть задовольняти певним цілям. Можливі переваги рідких композицій охоплюють простоту та економічність у виробництві та зручність для кінцевого користувача. Часто при зберіганні протягом тривалого часу поліпептиди є нестійкими у розчині (Manning et al (1989), Pharm. Res. 6: 903-918). Відповідно для того, щоб дозволити тривале зберігання були розроблені додаткові етапи обробки, які, зокрема, полягають у сушінні, наприклад, ліофілізації. Ліофілізовані композиції також можуть надавати деякі переваги. Потенційні переваги ліофілізації охоплюють покращену стійкість білка а також простоту та економічність у користуванні та зберіганні. Однак ліофілізовані фармацевтичні композиції можуть бути менш прийнятними для кінцевого користувача.

[0005] На додачу до вибору основної форми композиції (наприклад, ліофілізованої, рідкої, замороженої тощо), оптимізація білкової композиції звичайно полягає у зміні її компонентів та їх відповідних концентрацій для максимізації стійкості білка. На стійкість білка можуть впливати різні фактори, як-то іонна сила, рН, температура, цикли заморожування-відтавання, сил зсуву, заморожування, ліофілізація, сушіння, струшування та відновлення. Нестійкість білків може бути спричинена фізичною деградацією (як-то, наприклад, денатурація, агрегація або преципітація) або хімічною деградацією (як-то, наприклад, деамідування, окислення або гідроліз). Оптимізація компонентів та концентрацій композиції основана виключно на основі емпіричних досліджень та/або раціональних підходів до подолання джерела нестійкості...

[0006] Іноді, при тривалому зберіганні фармацевтичних композицій, які містять поліпептиди, у тому числі водних та ліофілізованих композицій, активні поліпептиди можуть бути втрачені в результаті агрегації та/або деградації.

[0007] Відповідно, типові практичні підходи до покращення стійкості поліпептиду можуть бути спрямовані до змінення концентрації елементів у складі композиції або до додавання наповнювачів для змінення такої композиції (патент США №№ 5 580 856; and 6 171 586 та патентна заявка США №№ US 2003/0202972, US 2003/0180287). Патент США 5 580 856 є прототипним патентом, присвяченим агентам, як-то природні полімери, поверхнево-активні речовини, сульфатовані полісахариди, білки та буфери, які можуть бути додані для стабілізування висушеного білка протягом або після регідратації. Тим не менш, на відміну від багатьох варіантів, у патенті США 5 580 856 не вказано, який стабілізатор до якого білка треба додати. Відповідно, у той час, як досвідченому читачеві є відомо про існування цих багатьох варіантів, йому або їй доведеться з'ясувати найкращі умови для застосування його/її білка,

вибираючи їх з багатьох умов, описаних у патенті США 5 580 856. У патентній заявці США 2003/0202972 описані стійкі ліофілізовані композиції анти-Her2 антитіл, у яких стабілізатор є цукром, трегалозою або буфером. Однак у той час, як ці стабілізатори можуть бути корисними для антитіл, вони не можуть бути екстрапольовані до інших білків. Патентна заявка США 2003/0180287 є подібною до заявки США 2003/0202972, оскільки у цій заявці також описано стійкий розчин подібного до імуноглобуліну білка, тобто білка, який містить Fc-домен. Стабілізатор може бути фосфатом натрію, фосфатом калію, цитратом натрію або калію, малеїновою кислотою, ацетатом амонію, Tris-буфером, ацетатом, діетаноламіном, гістидином, лізином або цистеїном. Було з'ясовано, що прийнятним стабілізатором серед цих хімічно несхожих сполук, які можуть бути вибрані досвідченим кваліфікованим читачем, виявився лізин. Однак, як зазначено у заявці США 2003/0202972, певний стабілізатор є прийнятним лише для певного білка, у цьому разі до білка, який містить Fc-домен та не може бути екстрапольованим *per se* до іншого білка. Дійсно, застосування домішок при одночасному підвищенні строку зберігання може привести до інактивування поліпептидів. Крім того, етап регідратації у разі ліофілізації може також викликати стани, які призводять до інактивування поліпептидів шляхом, наприклад, агрегації або денатурації (Hora et al. (1992), *Pharm. Res.*, 9: 33-36; Liu et al. (1991), *Biotechnol. Bioeng.*, 37: 177-184). Фактично, агрегація поліпептидів є небажаною, оскільки вона може привести до появи імуногенності (Cleland et al. (1993), *Crit. Rev. Therapeutic Drug Carrier Systems*, 10: 307-377; and Robbins et al. (1987), *Diabetes*, 36: 838-845).

[0008] Підтримання біологічної активності під час розвитку та виробництва фармацевтичних продуктів залежить від власної стійкості макромолекул, а також від застосованих способів забезпечення стійкості. Існує цілий ряд способів стабілізації білка; в тому числі додавання хімічних "стабілізаторів" до водного розчину або суспензії білка. Наприклад, у патенті США 4 297 344 описано забезпечення стабілізації факторів коагуляції II та VIII, антитромбіну III та плазміногену проти дії нагрівання шляхом додавання вибраних амінокислот. У патенті США 4 783 441 описано спосіб стабілізації білків шляхом додавання поверхнево-активних речовин. У патенті США 4 81 2557 описано спосіб стабілізації інтерлейкіну-2 з застосуванням людського сироваткового альбуміну. Іншим варіантом для забезпечення стабілізації білків є способи заморожування/відтавання, у яких композицію змішують з кріопротектором та зберігають при дуже низьких температурах, проте не всі білки здатні вижити після проходження циклу заморожування / відтавання. Додатковим варіантом є зберігання у холодному місці з кріопротекторною домішкою, яка звичайно є гліцерином. Також може бути здійснено зберігання у скляній формі, як описано у патенті США 5 098 893. У цьому випадку білки розчинюють у водорозчинних речовинах або у речовинах, які набухають у воді та які існують у аморфному або склоподібному стані. Найбільш широко застосованим способом стабілізації білків є сублімаційне сушіння або ліофілізація. Ліофілізація є найбільш життєздатною альтернативою у кожному разі, коли не може бути досягнута прийнятна стійкість білка у водному розчині, але одним з недоліків цього способу є необхідність складної обробки, висока вартість та тривалий час. Крім того, при необережній ліофілізації більшість препаратів принаймні частково денатурують від проведення операцій заморожування та зневоднення. В результаті часто виникає незворотна агрегація частини білкових молекул, що робить композицію неприйнятною для парентерального введення.

[0009] Взагалі кажучи, деградація білків є добре описаною у науковій літературі, але досі ще не описані умови зберігання та розчинності сполук, які нейтралізують гранулоцито-макрофагальний-колонієстимулюючий фактор (надалі позначено, як "ГМ-КСФ"), зокрема поліпептидів та анти-ГМ-КСФ антитіл.

[0010] На додачу до цього, хоча відомо, що у цій галузі існує безліч можливостей застосування для агентів, які стабілізують білки, а також для агентів, які дозволяють отримати високу концентрацію білка зі збереженням його стійкості, проте до появи заявленого винаходу у цій галузі ще не було визнано, що композиція, яка містить нейтралізуючі ГМ-КСФ сполуки у високих концентраціях, може бути нестійкою, отже потребує покращення.

[0011] Для отримання фармацевтичної композиції, яка містить білок, як-то антитіло, наприклад, моноклональне антитіло, метою є розробка рідких препаратів з високою концентрацією, які б при можливому підшкірному введенні були б дуже прийнятними для пацієнта. Однак існує загальна думка, що розробка висококонцентрованих композицій антитіл, зокрема моноклональних антитіл має серйозні проблеми у зв'язку з фізичною та хімічною стійкістю моноклональних антитіл через підвищене утворення розчинних та нерозчинних агрегатів, які підвищують ймовірність імунної відповіді, а також призводять до зниження біологічної активності.

[0012] Утворення поліпептидом агрегатів протягом зберігання рідкої фармацевтичної композиції може шкідливо впливати на біологічну активність такого поліпептиду, що веде до втрати терапевтичної ефективності фармацевтичної композиції. Крім того, утворення агрегатів може викликати інші проблеми, як-то закупорка трубок, мембран або насосів при введенні фармацевтичної композиції, яка містить поліпептид з застосуванням інфузійної системи. Крім того, повідомляється, що висока концентрація антитіл у композиціях веде до збільшення в'язкості та таким чином створює серйозні проблеми для виробництва таких композицій та їх можливого введення шляхом ін'єкції. Композиції з високою в'язкістю є складними у виробництві, їх складно завантажити у шприц та ввести пацієнту. Застосування зусиль при маніпулюванні з в'язкими композиціями призводить до надмірного спінювання, що в свою чергу може призвести до денатурації та інактивації активних моноклональних антитіл.

[0013] Отже залишається велика потреба у отриманні стійкої висококонцентрованої білкової фармацевтичної композиції, яка містить сполуку, що нейтралізує ГМ-КСФ, наприклад, антитіло та яка має низьку в'язкість, яку можна отримати на практиці та яка є прийнятною для підшкірного введення, як-то може бути розташованою у готовому для застосування пристрої. Крім того, з точки зору пацієнта було б дуже бажаним отримати продукти, що будуть стійкими при кімнатній температурі. Зокрема зараз на ринку ще не існує композицій антитіл, які протягом терміну придатності лікарського засобу можна було б зберігати при кімнатній температурі. Звичайно підвищення агрегації білка виникає при застосуванні неприйнятно високого рівня агрегатів та домішок, пов'язаних з білками, які можуть привести до появи імуногенних реакцій. Багато комерційних продуктів моноклональних антитіл у своєму складі містять поверхнево-активні речовини, які звичайно додають з метою зменшення міжфазної напруги, що може викликати агрегацію білка та утворення частинок, тобто призвести до неприйнятної якості продукту. Приклади міжфазної напруги можуть охоплювати контакт білка з i) повітрям ii) матеріалом кришки контейнера, як-то з гумовим плунжером, клапаном, склом попередньо заповнених шприців iii) матеріалами, пов'язаними з виробництвом, як-то сталеві резервуари, труби та насоси iv) льодом під час заморожування/відтавання тощо. Однак поверхнево-активні речовини, як-то полісорбати звичайно містять залишок пероксидів, які можуть окисляти білкові молекули, що веде до загрози якості продукту. Крім того, з точки зору виробника, додавання полісорбатів потребує додаткових етапів у процесі отримання через складність проведення ультра/діафільтрації композицій, які містять ці полісорбати. Запобігання утворенню окислених продуктів є складною проблемою, тому для контролю за цим процесом необхідно обережне поводження з полісорбатами. Таким чином, було б також бажано розробити препарати, позбавлені поверхнево-активних речовин, як з точки зору стійкості, так і з точки зору виробника.

[0014] Нещодавно було показано, що гранулоцито-макрофагальний-колонієстимулюючий фактор (ГМ-КСФ), спочатку визначений, як гемопоетичний фактор росту є важливим цитокіном, який бере участь у запальних та автоімунних процесах. Підвищені рівні мРНК або білка ГМ-КСФ вимірюють у різних місцях запалень, в тому числі у пацієнтів з алергією та хворих на псоріаз, артрит та на бронхіальну астму. Численні дослідження *in vivo*, проведені за останні кілька років демонструють, що блокування ГМ-КСФ шляхом нейтралізації антитіл може запобігати або навіть лікувати прозапальні захворювання у різних моделях запалень, в тому числі у моделях артриту, експериментального автоімунного енцефаліту, псоріазу та легеневих хвороб. Тому дуже бажано отримати прийнятну композицію, яка містить велику кількість сполуки, що нейтралізує ГМ-КСФ, буде стійкою та/або може бути введеною шляхом підшкірного введення.

[0015] Отже, технічне завдання заявленого винаходу полягає у задоволенні описаних вище потреб.

[0016] Винахід вирішує ці потреби та таким чином забезпечує як рішення технічної задачі втілень відносно композицій, так і відносно способів та застосування цих композицій у лікуванні суб'єктів, які страждають від захворювань та будуть отримувати користь від введення сполук, що нейтралізують ГМ-КСФ. Ці втілення визначено та описано у даному документі, проілюстровано на прикладах та відображено у Формулі Винаходу.

[0017] Слід зазначити, що, як тут застосовано, одиничні значення охоплюють також посилання на множину, якщо тільки у тексті чітко не зазначено іншого. Отже, наприклад, посилання на "антитіло" охоплює одне або більше таких різних антитіл та посилання на "спосіб" охоплює посилання на еквівалентні відомі пересічним фахівцям у цей галузі операції та способи, які можуть бути змінені або замінені описаними тут способами.

[0018] Якщо не зазначено іншого, то термін "принаймні", який знаходиться перед серіями елементів має відношення до кожного елементу у складі серій. Фахівцям буде зрозуміло або вони з допомогою рутинних експериментів будуть здатні встановити багато еквівалентів певних втілень заявленого винаходу. Такі еквіваленти призначені охоплюватися заявленим винаходом.

[0019] Слід також розуміти, що застосоване у цій заявці та у наступній Формулі Винаходу слово "містить" та варіанти, як-то "що містить" призначено охоплювати зазначене ціле число або етап або групи цілих чисел або етапів, але без виключення будь-якого іншого цілого числа або етапу або групи цілих чисел або етапів, якщо тільки у тексті чітко не зазначено іншого. При застосуванні у даному описі термін "містить" може бути заміщено терміном "що містить" або іноді, при застосуванні у даному документі, може бути заміщено терміном "що має" або навіть може бути заміщено на термін "що складається з...".

[0020] При застосуванні у цьому документі, термін "складається з" виключає будь-який елемент, етап або інгредієнт, не визначений у якості елемента винаходу. При застосуванні у цьому документі, вираз "складається по суті з" не виключає матеріалів або етапів, які суттєво не впливають на основні та нові характеристики за Формулою Винаходу. У кожному разі будь-який з наведених тут термінів "що суттєво складається з" та "складається з" може бути застосованим взаємозамінне.

[0021] Як тут застосовано, зв'язуючий термін "та/або" між кількома переліченими елементами вважається таким, що охоплює як індивідуальні, так і комбіновані варіанти. Наприклад, коли два елементи з'єднують терміном "та/або", то перший варіант відноситься до застосовності першого елемента без другого. Другий варіант відноситься до застосовності другого елемента без першого. Третій варіант відноситься до застосовності першого та другого елементів між собою. Зрозуміло, що будь-який з цих варіантів охоплюється цим терміном, отже задовольняє його застосованому тут значенню. Також зрозуміло, що одночасна застосовність більш, ніж одного з варіантів також охоплюється цим терміном, отже задовольняє його застосованому тут значенню.

[0022] Деякі документи процитовано в тексті даної специфікації. Кожен з документів, зазначених у цьому документі (включаючи всі патенти, патентні заявки, наукові публікації, технічні характеристики виробника, інструкції тощо), незалежно від того, чи зазначені вони вище або нижче у документі, є включеним у даний опис у вигляді посилання у повному обсязі. У тому випадку, коли наведені у якості посилання матеріали будуть суперечувати або не узгоджуватися з цією специфікацією, то вона замінить будь-який такий матеріал. Ніщо тут не повинно бути витлумачено як визнання того, що винахід не має права датувати це відкриття заднім числом на підставі попереднього винаходу.

[0023] З метою отримання композиції, яка має високу концентрацію сполук, що нейтралізують ГМ-КСФ винахідники прийняли до уваги те, що сполуки, які нейтралізують ГМ-КСФ можуть бути нестійкими при високих концентраціях та також можуть бути нестійкими протягом тривалого періоду зберігання.

[0024] Дійсно, існує багато способів, при застосуванні яких, сполуки, що нейтралізують ГМ-КСФ, як-то білки, можуть бути нестійкими. Наприклад, нестійкість білків може виникати внаслідок їх агрегації або деградації, але також існує хімічна нестабільність, викликана дезамінуванням, дезамідуванням, окисленням, руйнуванням та утворенням дисульфідних зв'язків, гідролізом, сукцинімідуванням, поперечним зв'язуванням недисульфідного типу, деглікозилюванням або "ферментативним потемнінням" (реакція Майяра) або будь-яким поєднанням цих факторів (див., наприклад, Wang et al. (1999), Int. J. Pharm. 185: 129-188). Крім того, на стійкість білка можуть впливати фізико-хімічні параметри, як-то температура, тиск, рН, поверхнева адсорбція, концентрація, джерело, морфізм та чистота білка, вплив солей, іонів металів, хелатуючих агентів, фізичних сил, як-то сили зсуву, білкових денатуруючих агентів та неводних розчинників.

[0025] Тим не менш, в той час як багато факторів можуть вплинути на стійкість білка, також можна вжити багато заходів для забезпечення цієї стійкості. Наприклад, білок може бути стабілізовано всередині (шляхом заміни амінокислот) або зовні. Зовнішньої стабілізації можна досягнути шляхом додавання хелатуючих агентів, іонів металів, відновлюючих агентів, полімерів, поліетиленгліколів/поліолів, сироваткового альбуміну, поверхнево-активних речовин, цукрів та поліолів, жирних кислот та фосфоліпідів, амінокислот, буферів тощо (Див., наприклад, Wang, Y and Hanson M (1988), J. Parental Sci. & Technology, 42, Supplement: 4-26; Wang et al. (1999), Int. J. Pharm. 185: 129-188. В цілому, для забезпечення стабілізації сполук, які нейтралізують ГМ-КСФ, як-то антитіл у препараті, досвідчений фахівець буде мати багато прийнятних варіантів.

[0026] У даному випадку винахідники виявили, що сполуки, які нейтралізують ГМ-КСФ можуть спричинювати агрегацію та/або не можуть бути розчинені з більш високими концентраціями. Багато інших факторів також можуть викликати агрегацію білка у композиції. Типові способи очистки та зберігання можуть призвести до появи таких умов або компонентів білкових композицій, які будуть викликати агрегацію білка. Наприклад, білки у препараті можуть

агрегувати в результаті будь-якого з наступних чинників, як-то зберігання, вплив підвищеної температури, рН та іонна сила композиції, а також наявність деяких поверхнево-активних речовин (наприклад, полісорбату-20 та полісорбату-80) та емульгаторів. Так само, білки можуть агрегувати при напруженні зсуву, як-то осад відновленого ліофілізованого білка у розчині, зразок білка після очищення шляхом фільтрування або розчин білка після заморожування-відтавання, струшування або перенесення шприцом. Агрегація також може відбуватися внаслідок взаємодії поліпептидних молекул у розчині та на межі розділу між рідиною та повітрям при зберіганні у флаконах. Конформаційні змінення можуть відбуватися у поліпептидах, адсорбованих на межі розділу між рідиною та повітрям та між рідкою та твердою частинами під час розширення або стиснення цих меж, яке виникає внаслідок струшування під час перевезення. Таке струшування може викликати агрегацію білка у складі композиції та зрештою веде до його осаджування з іншими адсорбованими білками.

[0027] На додачу до цього, вплив світла на білкову композицію також може викликати агрегацію білка. Отже, заявленим винаходом передбачено композицію, яка дозволяє отримати високі концентрації сполук, що нейтралізують ГМ-КСФ та яка зменшує агрегацію цих сполук. Без зв'язку з будь-якою теорією вважається, що зменшення агрегації можна досягнути шляхом контролювання одного або кількох вищезазначених механізмів цього явища. Це може призвести до, наприклад, покращення стійкості продукту та до більш високої гнучкості виробничих процесів та умов зберігання.

[0028] Винахідники мали за мету надання композиції з високою концентрацією сполуки, що нейтралізує ГМ-КСФ для, наприклад, можливості отримати менший об'єм ін'єкції, який буде прийнятним для зменшення побічних проявів, як-то болю через великий об'єм ін'єкції або дозволить здійснити підшкірне введення з низьким об'ємом препарату.

[0029] Отже, винахідники під час досліджень виявили певну нестійкість сполук, які нейтралізують ГМ-КСФ та поставили за мету поліпшення цього небажаного явища. Відповідно вони зосередилися на концентрованих сполуках, які нейтралізують ГМ-КСФ, зберігаючи при цьому його в розчині, тобто у розчиненому стані. При цьому вони мали безліч варіантів та наявних альтернатив, однак без будь-яких вказівок на те, що будь-який з цих варіантів буде цілком прийнятним для рішення цієї об'єктивної проблеми.

[0030] "Розчинений стан" означає, що сполука, яка нейтралізує ГМ-КСФ, переважно з концентрацією принаймні приблизно 20 мг/мл, є розчиненою у розчині, тобто є розчиненою та/або диспергованою безпосередньо у водному розчині (тобто у водній фазі) препарату. Переважно, сполука, яка нейтралізує ГМ-КСФ є гомогенно розчиненою та/або диспергованою. Гомогенне розчинення означає, що сполука, яка нейтралізує ГМ-КСФ та є розчиненою та/або диспергованою у водній композиції є майже рівномірно, переважно рівномірно розподіленою у водній композиції таким чином, що концентрація ("с") сполуки, що нейтралізує ГМ-КСФ ("п" у випадку молярної маси або "m" у випадку маси) є майже ідентичною, переважно ідентичною у об'ємі ("v") (або по всьому об'єму) водного розчину, тобто $c=p/v$ або $c=m/v$, відповідно, є майже постійною, переважно постійною. Переважно, у композиції не існує градієнта концентрації.

[0031] Відповідно, стійка композиція заявленого винаходу, яка містить сполуку, що нейтралізує ГМ-КСФ може переважно розглядатися, як водний розчин, у якому сполука, що нейтралізує ГМ-КСФ є безпосередньо розчиненою та/або диспергованою.

[0032] "Розчин" є гомогенною сумішшю двох або більше речовин/компонентів. У такої суміші, розчинений компонент (у заявленому винаході він є сполукою, що нейтралізує ГМ-КСФ) є розчиненим (як описано вище) у іншій речовині (яка у заявленому винаході переважно є водною композицією), яка також відома, як розчинник.

[0033] Враховуючи вищевказане, слід зазначити, що сполука, яка нейтралізує ГМ-КСФ переважно не є гетерогенно розчиненою та/або диспергованою у водному розчині. Термін "розчинений стан" також охоплює те, що сполука, яка нейтралізує ГМ-КСФ переважно суттєво не є емульгованою або більш переважно зовсім не є емульгованою у водному розчині.

[0034] Також термін "розчинений стан" стосується того, що сполука, яка нейтралізує ГМ-КСФ переважно суттєво не є інкапсульованою та/або містить переважно менш, ніж 2 %, 1 % або 0.5 % сполуки, яка нейтралізує ГМ-КСФ та може бути інкапсульованою та/або захопленою або, більш переважно, вона зовсім не є інкапсульованою та/або захопленою, наприклад, у ліпосомах, мультіламелярних ліпосомах тощо.

[0035] Відповідно, одним переважним втіленням заявленого винаходу є рідка композиція, яка містить сполуку, що нейтралізує ГМ-КСФ, є стійкою, у якій протягом тривалого часу при зберіганні не утворюються кон'югати/агрегати або фрагменти/продукти деградації та яка є прийнятною для підшкірного введення.

[0036] Зокрема, після тестування різних стабілізуючих агентів, автори винаходу виявили, що сполуки, які нейтралізують ГМ-КСФ можуть бути стабілізовані при додаванні модифікатора тоничності до розчину, який потрібно зберігати. Приклади модифікаторів тоничності охоплюють, але без обмеження, цукри та цукрові спирти. Простими цукрами називають моносахариди, які охоплюють глюкозу, фруктозу, галактозу, ксилозу, рибозу, манозу, лактулозу, алозу, альтрозу, гулозу, ідозу, талозу, арабінозу та ліксозу. Більш переважними для цього винаходу є дисахариди, які охоплюють, наприклад, сахарозу, мальтозу, лактозу, трегалозу, ізомальтозу та целюлозу. Цукрові спирти охоплюють сорбіт, маніт, гліцерин, еритрит, мальтит, ксиліт та полігліцит. У переважному втіленні цукор є невідновлювальним цукром, як-то цукрозою або трегалозою. Невідновлювальні цукри відрізняються відсутністю відкритої ланцюгової структури, отже вони є не сприйнятливими до окисно-відновних реакцій. Отже до композиції, яка містить сполуку, що нейтралізує ГМ-КСФ може бути додано один або більше невідновлювальних цукрів, як-то цукроза або трегалоза або цукрових спиртів, як-то маніт або сорбіт. Також до розчину можуть бути додані комбінації невідновлюваних цукрів та цукрових спиртів, як-то цукрози та маніту, цукрози та сорбіту, трегалози та маніту або трегалози та сорбіту. Більш переважніше цукрові спирти, як-то маніт та/або сорбіт додають у їх D-формі, найбільш переважно до розчину додають сорбіт. Концентрація модифікатора тоничності, переважно сорбіту, є у межах приблизно 1 % - 15 % (вага/об'єм), переважно у межах приблизно 2 %-10 % (вага/об'єм), більш переважно у межах приблизно 3 %-7 % (вага/об'єм), більш переважніше у межах приблизно 4 % - 6 % (вага/об'єм) та найбільш переважно вона дорівнює приблизно 5 % (вага/об'єм).

[0037] Іншою особливо переважною речовиною для стабілізування сполук, які нейтралізують ГМ-КСФ з високою концентрацією, приймаючи до уваги їх довготривале зберігання є буферна система з рН у межах приблизно 4-10, переважно у межах приблизно 4-7, більш переважніше у межах приблизно 4-6 або у межах приблизно 5-7, навіть більш переважніше у межах приблизно 5,5-6,5, та найбільш переважніше з рН, який дорівнює приблизно 5,8. Буфер переважно може бути вибраним з гістидинового буферу, ацетатного буферу та цитратного буферу. Як тут зазначено, під амінокислотою мається на увазі L-амінокислота або D- амінокислота, де бажаною є L-амінокислота. Переважно у буферній системі застосовують гістидин або його сіль. Переважно сіль являє собою хлорид, фосфат, ацетат або сульфат, більш переважно сіль є хлоридом. рН гістидинової буферної системи дорівнює приблизно 5-7, переважно дорівнює приблизно 5,5-6,5, більш переважніше рН точно або приблизно дорівнює 5,8. Значення рН може бути відрегульовано з допомогою основ та кислот, які для цього звичайно застосовують, як-то переважно NaOH. Концентрація буферної системи, переважно гістидинової буферної системи, знаходиться у межах приблизно 10-50 мМ, переважно у межах приблизно 20-40 мМ, більш переважніше дорівнює приблизно 30 мМ.

[0038] Згідно з бажаним втіленням, комбінація буферної системи, переважно гістидинової буферної системи та модифікатора тоничності, переважно цукрового спирту, більш переважно маніту або більш переважніше сорбіту застосовують для стабілізування сполук, які нейтралізують ГМ-КСФ у розчині з метою запобігання агрегації та для того, щоб зробити композиції досить стійкими для тривалого зберігання та/або для одного або більше циклів заморожування / відтавання. Було показано, що кращою з точки зору стабільності буде наявність у композиції приблизно 6 % (вага/об'єм) та більше цукрового спирту, переважно сорбіту. Однак, верхню межу осмоляльності препарату встановлюють на рівні приблизно у 470 мОсм/кг, що ще залишається гіперосмотичним, але вже є подібним до осмоляльності затвердженого продукту (препарат Synagis; внутрішньом'язове введення). Отже, можна знайти компроміс між оптимальною стійкістю, тоничністю та концентрацією сполуки, що нейтралізує ГМ-КСФ, як описано у Прикладах заявленого винаходу. Тому бажані концентрації цукрового спирту, переважно сорбіту знаходяться у межах приблизно 3-7 % (вага/об'єм), більш переважно у межах приблизно 4-6 % (вага/об'єм) та найбільш переважніше дорівнюють приблизно 5 % (вага/об'єм).

[0039] У деяких втіленнях заявленого винаходу, композиція або композиції винаходу, що містить сполуку, яка нейтралізує ГМ-КСФ не потребує додаткових наповнювачів на додачу до зазначених вище (тобто до буферу та модифікатора тоничності), як-то, наприклад, поверхнево-активних речовин та амінокислот, які застосовують у традиційних композиціях для стабілізування білків у розчині. Крім того, описані тут композиції є кращими у порівнянні зі стандартними композиціями, оскільки вони мають знижену імуногенність через відсутність додаткових агентів, звичайно необхідних для стабілізації білка.

[0040] Відомо, що амінокислоти можуть бути застосовані для стабілізації білків з високими концентраціями шляхом, зокрема, опосередкування розчинності білка та/або пригнічення його

агрегації. Хоча треонін (наприклад, при концентрації 250 мМ) викликає незначний стабілізуючий ефект, рідкі композиції заявленого винаходу переважно є вільними від додаткових амінокислот.

[0041] Крім того, зазначена композиція переважно є вільною або суттєво вільною від хлориду натрію. Вираз "суттєво вільна" тут означає, що концентрація хлориду натрію дорівнює приблизно 0 (нулю) мМ або дуже наближається до цього значення, наприклад, є меншою, ніж приблизно 50 мМ, переважно є меншою, ніж приблизно 20 мМ, більш переважніше є меншою, ніж приблизно 10 мМ, більш переважніше є меншою, ніж приблизно 5 мМ та найбільш переважніше є меншою, ніж приблизно 2 мМ або навіть меншою, ніж приблизно 1 мМ.

[0042] У біофармацевтичних продуктах може бути корисним додавання поверхнево-активних речовин для зменшення деградації білків протягом зберігання. Загальноприйнятими наповнювачами для вирішення цієї мети є полісорбати 20 та 80 (Tween 20 та Tween 80). Однак завдяки відсутності або негативним впливам на стійкість сполук, які нейтралізують ГМ-КСФ, рідкі композиції заявленого винаходу переважно не містять жодних поверхнево-активних речовин.

[0043] Застосована концентрація відповідних сполук, які нейтралізують ГМ-КСФ у рідкій композиції, призначеній для зберігання, заморожування/відтавання та/або готової для застосування дорівнює принаймні приблизно 20 мг/мл, переважно принаймні приблизно 50 мг/мл та більш переважно принаймні приблизно 100 мг/мл. У заявленому винаході застосовують концентрації, які дорівнюють приблизно 20-200 мг/мл, переважно приблизно 50-200 мг/мл, більш переважно приблизно 100-180 мг/мл, більш переважно приблизно 130-170 мг/мл, більш переважно приблизно 135-165 мг/мл та найбільш переважніше приблизно 150мг/мл.

[0044] Отримана рідка композиція переважно має мінімальні умови терміну зберігання, які дорівнюють 24 місяці при температурі 2-8 °С, переважно 36 місяців при температурі 2-8 °С, більш переважніше 48 місяців при температурі 2-8 °С, найбільш переважніше 60 місяців при температурі 2-8 °С або принаймні 28 днів при кімнатній температурі (25 °С \pm 2 °С).

[0045] Винахід стосується стійкого препарату, переважно стійкої рідкої композиції, яка неочікувано забезпечує довготривале зберігання сполук, що нейтралізують ГМ-КСФ. Ця композиція є корисною зокрема через те, що вона є більш прийнятною для застосування для пацієнтів, оскільки сполуки у її складі, які нейтралізують ГМ-КСФ є висококонцентрованими для зменшення побічних ефектів, як-то болю, які виникають внаслідок введення великого об'єму препарату шляхом ін'єкції.

[0046] Відповідно, один аспект винаходу побудовано на відкритті композицій, які містять:

- сполуку, яка нейтралізує ГМ-КСФ,

- буферну систему, переважно вибрану з гістидинового буферу, ацетатного буферу та/або цитратного буферу зі значенням рН переважно у межах 5-7,

- модифікатор тоничності, переважно вибраний з невідновлювальних цукрів, як-то цукроза або трегалоза або цукрових спиртів, як-то маніт або сорбіт

та які є достатньо стійкими для довготривалого зберігання та/або проходження циклів заморожування-відтавання та/або дії напруження зсуву (стійкість при струшуванні). Композиція винаходу має багато переваг у порівнянні з стандартними буферизованими композиціями. У одному аспекті, композиція демонструє мінімальну агрегаційну поведінку протягом довготривалого зберігання без появи шкідливих ефектів, які можна очікувати при застосуванні композицій з високим білковим вмістом. Інша перевага композиції за винаходом полягає у мінімальній ферментації сполуки, що нейтралізує ГМ-КСФ, у відсутності значного впливу на біоактивність такої сполуки протягом довготривалого зберігання та у низькій в'язкості композиції. Зрештою, у переважному втіленні, композиція є вільною від додаткових наповнювачів, як-то від поверхнево-активних речовин, додаткових амінокислот та/або хлориду натрію.

[0047] Переважні втілення першого аспекту винаходу є наступними:

Композиції за винаходом, у яких сполука, яка нейтралізує ГМ-КСФ є поліпептидом, пептидоміметиком, нуклеїновою кислотою або малою молекулою.

[0048] У переважному втіленні сполука, яка нейтралізує ГМ-КСФ (яка переважно є поліпептидом та більш переважніше є антитілом або його функціональним фрагментом) зв'язується або специфічно зв'язується з ГМ-КСФ або з його рецептором. Передбачається, що ГМ-КСФ або його рецептор має тваринне походження, в тому числі, але без обмеження, він походить від ссавців, як-то лабораторні тварини (гризунів, як-то щурів, морських свинок, хом'яків або мишей, нелюдиноподібних приматів, як-то макак-крабоїдів або інших представників роду макак), хатніх або свійських тварин (наприклад, собак чи кішок) або сільськогосподарських тварин (наприклад корів, овець, кіз та свиней) та/або людини.

Переважно, ГМ-КСФ або його рецептор є ГМ-КСФ людини (*Homo sapiens*) або, відповідно, рецептором ГМ-КСФ людини або ГМ-КСФ нелюдиноподібного примата або, відповідно, рецептором ГМ-КСФ нелюдиноподібного примата. Особливо бажані варіанти (гомологи) ГМ-КСФ нелюдиноподібного примата або рецептора ГМ-КСФ нелюдиноподібного примата охоплюють ГМ-КСФ або рецептор ГМ-КСФ гібона (*nomascus concolor*, також відомий, як західний чорний чубатий гібон) та мавп родини макак, наприклад макаки - резуса (*Masaca mulatta*) та макаки-крабоїда (*Masaca fascicularis*). Згідно з окремим бажаним втіленням винаходу, сполука, яка зв'язується з ГМ-КСФ або з його рецептором (яка переважно є антитілом або його фрагментом) демонструє перехресну реактивність між зазначеним вище принаймні одним з видів мавп та людиною. Наприклад, антитіло або його фрагмент є здатним до зв'язування з (та нейтралізування) ГМ-КСФ людини та ГМ-КСФ макаки-крабоїда (*Masaca fascicularis*). Це є особливо бажаним для молекули антитіла, яка є призначеною для терапевтичного введення до людських суб'єктів, оскільки таке антитіло звичайно повинно пройти кризу через безліч випробувань перед нормативним затвердженням, у яких до деяких ранніх тестів залучені дослідження на тваринах. При проведенні таких тестів звичайно бажаним є застосування таких видів тварин, які мають високий рівень генетичної схожості до людини (наприклад, нелюдиноподібні примати, як-то макака-крабоїд), оскільки отримані таким чином результати звичайно будуть надавати високу передбачуваність відносно відповідних результатів, які можна очікувати при введенні цих саме молекул людині. Однак, така сила передбачення на основі тваринних тестів принаймні частково залежить від порівнянності молекул та є дуже високою у тому разі, коли завдяки крос-специфічній реактивності деякі терапевтичні молекули можуть бути введені людинним та тваринним моделям. У цьому втіленні винаходу, якщо молекула антитіла є перехресно-реактивною для певного антигену людини та інших близькоспоріднених видів, то тестування можуть бути проведені з застосуванням таких саме молекул антитіл людини та цих близькоспоріднених до неї видів, наприклад, одного з видів зазначених вище мавп. Це підвищує ефективність самих по собі тестів та сили передбачення, обумовленої такими тестами, яка стосується поведінки таких антитіл у людини, як кінцевого інтересуючого виду з терапевтичної точки зору. Бажаним є те, щоб антитіло або його функціональний фрагмент зв'язування з ГМ-КСФ або з його рецептором було моноклональним антитілом або його функціональним фрагментом. Те ж саме стосується й альтернативних варіантів сполук, які нейтралізують ГМ-КСФ та не являють собою антитіла або не походять від антитіл.

[0049] Переважно сполука, яка нейтралізує ГМ-КСФ є моноклональним антитілом людини або його функціональним фрагментом;

[0050] Сполука, яка нейтралізує ГМ-КСФ може бути антитілом або його функціональним фрагментом, що зв'язується з епітопом ГМ-КСФ людини та нелюдиноподібного примату. Цей епітоп переважно містить амінокислоти 23-27 (RRLN) та/або амінокислоти 65-77 (GLR/QGSLTKLKGPL). Мінливість у положенні 67 ділянки 65-77 амінокислотної послідовності відображає гетерогенність у цій частині ГМ-КСФ між, з одного боку, ГМ-КСФ людини та гібона (у яких у положенні 67 знаходиться R) та, з іншого боку, ГМ-КСФ мавп родини макак, наприклад, макаки-крабоїда та макаки-резуса (у яких у положенні 67 знаходиться Q). Якщо епітоп містить дві ділянки амінокислотної послідовності, які є несуміжними, як-то 23-27 (RRLN) та 65-77 (GLR/QGSLTKLKGPL), то такий епітоп також може отримати назву "переривчастого" епітопу. Зазначений епітоп ГМ-КСФ або переривчастий епітоп ГМ-КСФ може додатково містити амінокислоти 28-31 (LSRD), амінокислоти 32-33 (TA) та/або амінокислоти 21-22 (EA).

[0051] Моноклональне антитіло людини або його функціональний фрагмент переважно у складі своєї змінної ділянки важкого ланцюга містить ділянку CDR3, яка містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка охоплює послідовності, позначені, як SEQ ID №№: 1-13 та 56; переважно важколанцюгова змінна ділянка CDR3 містить амінокислотну послідовність, позначену, як SEQ ID № 2.

[0052] Будь-яка з зазначених послідовностей ділянки CDR3 змінної ділянки важкого ланцюга може додатково існувати разом у змінній ділянці важкого ланцюга з ділянкою CDR1 змінної ділянки важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність, позначену, як SEQ ID № 14 та ділянкою CDR2 змінної ділянки важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність, позначену, як SEQ ID № 15.

[0053] Додатково, моноклональне антитіло людини або його функціональний фрагмент може містити у своїй змінній ділянці легкого ланцюга ділянку CDR1, яка містить амінокислотну послідовність, позначену, як SEQ ID № 16, ділянку CDR2, що містить амінокислотну послідовність, позначену, як SEQ ID № 17 та ділянку CDR3, що містить амінокислотну послідовність, позначену, як SEQ ID № 18.

[0054] У особливо бажаному аспекті винаходу, моноклональне антитіло людини або його функціональний фрагмент містить у власній змінній ділянці легкого ланцюга ділянку CDR1, що містить амінокислотну послідовність, позначену, як SEQ ID № 16, ділянку CDR2, що містить амінокислотну послідовність, позначену, як SEQ ID № 17, ділянку CDR3, що містить амінокислотну послідовність, позначену, як SEQ ID № 18 та містить у власній змінній ділянці важкого ланцюга ділянку CDR1, що містить амінокислотну послідовність, позначену, як SEQ ID № 14, ділянку CDR2, що містить амінокислотну послідовність, позначену, як SEQ ID № 15 та ділянку CDR3, що містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка охоплює послідовності, позначені, як SEQ ID №№ 1-13 та 56, найбільш переважно SEQ ID №: 2.

[0055] Згідно з бажаним втіленням, моноклональне антитіло людини або його функціональний фрагмент містить у власній змінній ділянці легкого ланцюга амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка охоплює послідовності, позначені, як SEQ ID №№ 19, 54 та 55. Згідно з іншим бажаним втіленням, моноклональне антитіло людини або його функціональний фрагмент містить у власній змінній ділянці важкого ланцюга амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка охоплює послідовності, позначені, як SEQ ID №№ 20-33, 52 та 53. У додатковому втіленні моноклональне антитіло людини або його функціональний фрагмент може містити амінокислотну послідовність легкого ланцюга, позначену, як SEQ ID № 34 та/або амінокислотну послідовність важкого ланцюга, вибрану з групи, яка охоплює будь-які послідовності, позначені, як SEQ ID №№ 35-48, найбільш переважніше SEQ ID №: 35.

[0056] Моноклональне антитіло людини або його функціональний фрагмент може містити одну або декілька амінокислотних послідовностей, що мають принаймні 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 % або 99 % тотожності до відповідної амінокислотної послідовності, позначеної будь-яким з номерів SEQ ID №№ 1-48 та 52-56, переважно до відповідної амінокислотної послідовності, позначеної будь-яким з номерів SEQ ID №№:1-18 та 56 та/або до амінокислотної послідовності каркасних ділянок (FR) амінокислотної послідовності, позначеної будь-яким з номерів SEQ ID №№ 19-48 та 52-55. Отже, у бажаному втіленні, моноклональне антитіло людини або його функціональний фрагмент може містити одну або декілька амінокислотних послідовностей, що мають принаймні 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 % або 99 % тотожності до відповідної амінокислотної послідовності, позначеної будь-яким з номерів SEQ ID №№ 1-18 та 56.

Альтернативним чином, у будь-якій амінокислотній послідовності CDR, позначеній будь-яким з номерів SEQ ID №№ 1-18 та 56 може бути заміщено 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або 10 амінокислот. Переважно така ділянка CDR, яка має заміщення зберігає здатність до зв'язування з ГМ-КСФ, як описано тут.

Альтернативним або додатковим чином бажано, щоб моноклональне антитіло людини або його функціональний фрагмент могло містити одну або декілька амінокислотних послідовностей, які мають принаймні 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 % або 99 % тотожності до відповідної амінокислотної послідовності ділянок VH, VL, H або L, які, відповідно, позначені тут будь-яким з номерів SEQ ID №№19-48 та 52-55. Переважно, тотожність існує протягом всієї амінокислотної послідовності ділянок VH, VL, H або L. Більш переважно, тотожність існує всередині ділянок CDR, як було попередньо описано або всередині ділянок FR (або не-CDR ділянок), які знаходяться у складі ділянок VH, VL, H або L, позначених будь-яким з номерів SEQ ID №№19-48 та 52-55. Відповідно, у кожній FR-ділянці може бути заміщено 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 або 25 амінокислот та такий варіант FR - заміщення зберігає здатність до зв'язування з ГМ-КСФ, як описано тут.

Досвідчений фахівець може легко визначити FR-ділянки (або не-CDR ділянки) всередині послідовностей SEQ ID №№ 19-48 та 52-55, оскільки послідовності SEQ ID №№ 1-18 та 56 мають послідовності CDR, які складаються з однієї або декількох послідовностей VH, VL, H або L, показаних у SEQ ID №№ 19-48 та 52-55, тобто положення послідовності передбачає наявність ідентифікатора для неї, позначеного, як <223> у кожній амінокислотній послідовності. Ті ж саме позначення вказують на те, що ці амінокислотні послідовності "пасують" одна до одної, що означає те, що CDR-ділянки у складі VH, VL, H або L ділянок, наприклад, позначені, як SEQ ID №№ 16, 17, 18 є амінокислотними послідовностями CDR, які містять амінокислотну послідовність, наведену у SEQ ID №: 19 (оскільки всі з них розташовані у положеннях "5-306").

У якості додаткової ілюстрації, якщо амінокислота є заміщеною у одній або у кількох або у всіх ділянках CDR або FR важкого та/або легкого ланцюга, то бажаним є те, щоб отримана таким шляхом "заміщена" послідовність мала принаймні 70 %, більш переважно 80 %, більш переважніше 90 %, ще більш переважніше 95 % та ще більш переважніше 98 % або 99 % тотожності до "оригінальної" послідовності CDR або FR. Це означає її залежність від довжини CDR- або FR-ділянки, до рівня якої вона є гомологічною до "заміщеної" послідовності.

Тотожність визначають шляхом застосування стандартних програм вирівнювання послідовностей, як-то програми Vector NTI (InforMax TM, Maryland, USA) або, більш переважно, програми BLASTP, здебільшого її версії blastp 2.2.5 (November 16, 2002; cf. Altschul, S. F. et al. (1997) Nucl. Acids Res. 25, 3389-3402). Відсоток тотожності визначають на основі вирівнювання всієї поліпептидної послідовності (матриця: BLOSUM 62; вартість пролому: 11,1; граничне значення встановлено на позначці 10^{-3}) з застосуванням будь-якої амінокислотної послідовності CDR, VH, VL, H або L у вигляді посилання у парному порівнянні. Цей відсоток обчислюють у вигляді відсотка кількості "позитивів" (гомологічних амінокислот), виявлених в результаті застосування програми BLASTP, розділеного на загальну кількість амінокислот, вибраних програмою для вирівнювання.

Тотожність амінокислотної або нуклеотидної послідовності у цьому документі може бути застосована взаємозамінне з терміном "ідентичність". Застосований у заявленому винаході термін "тотожність" означає відсоток попарно ідентичних залишків після вирівнювання тотожності амінокислотної або нуклеотидної послідовності заявленого винаходу з досліджуваною послідовністю по відношенню до кількості залишків по довжині цих двох послідовностей. Як описано вище, програми для визначення тотожності (або ідентичності) порівнюють вирівняні послідовності на основі вирівнювання одних амінокислот по відношенню до інших та можуть бути встановлені різні рівні жорсткості для порівняння (наприклад, ідентичні амінокислоти, консервативні заміщення амінокислот тощо). Відповідно до застосованого тут терміну, дві відповідні амінокислоти вважаються прийнятними для "консервативного заміщення" однієї на іншу, якщо обидві з них належать до певного хімічного класу, тобто є кислими, неполярними / гідрофобними, полярними незарядженими та основними. У якості необмеженого прикладу, дві різні амінокислоти, які належать до класу неполярних амінокислот можуть бути розглянуті "консервативно заміщувачими" одна іншу навіть якщо ці дві амінокислоти не є ідентичними, тоді як з одного боку неполярна амінокислота та з іншого - основна амінокислота вже не можуть бути розглянутими, як "консервативно заміщувачими" одна іншу. У частині 3.1 у книзі "Molecular Biology of the Cell" ("Молекулярна біологія клітини"), 4th Edition (2002), by Alberts, Johnson, Lewis, Raff, Roberts and Walter, автори розподіляють амінокислоти на чотири головні групи, як-то на кислі, неполярні, незаряджені полярні та основні. Таке розподілення може бути застосовано з метою визначення у контексті заявленого винаходу, чи буде певна амінокислота консервативним заміщенням іншої досліджуваної амінокислоти. Вищезазначені головні групи амінокислот додатково можуть бути розподілені на підкласи, як-то, наприклад, на малі неполярні та великі неполярні амінокислоти, великі ароматичні амінокислоти тощо. Термін "консервативне амінокислотне заміщення" також вказує на будь-яке амінокислотне заміщення для вибраного амінокислотного залишку, у якому залишок заміщення є настільки хімічно схожим до вибраного залишку, що не призводить до суттєвих втрат властивостей поліпептиду (наприклад, функції зв'язування).

[0057] Сполуку, яка нейтралізує ГМ-КСФ звичайно отримують у вигляді фармацевтичної композиції, призначеної для парентерального, наприклад, внутрішньовенного, внутрішньочеревинного, підшкірного, внутрішньом'язового, місцевого або внутрішньошкірного введення суб'єкту за умови того, що бажаним є підшкірне введення. У деяких втіленнях фармацевтична композиція є рідкою, переважно водною композицією.

[0058] У одному втіленні концентрація сполуки, що нейтралізує ГМ-КСФ у рідкій фармацевтичній композиції є принаймні 20 мг/мл, переважно принаймні 50 мг/мл, більш переважніше принаймні 100 мг/мл, навіть більш переважно у межах приблизно 100 мг/мл - 200 мг/мл, як-то приблизно 150 мг/мл. У деяких втіленнях, наприклад коли композиція є призначеною для підшкірної доставки можуть бути застосовані більші концентрації сполуки, яка нейтралізує ГМ-КСФ.

[0059] Як було зазначено вище, композиції заявленого винаходу містять буфер. Як тут застосовано, термін "буфер" має відношення до доданої композиції, яка дозволяє рідкій композиції бути стійкою до змінень рН. У деяких втіленнях додавання буферу дозволяє рідкій композиції бути стійкою до змінень рН шляхом дії власних сполучених кислотно-лужних компонентів. Приклади прийнятних буферів охоплюють, але без обмеження, буферизовані гістидинові, ацетатні або цитратні системи.

[0060] Термін "специфічно зв'язується" або пов'язані з ним вирази, як-то "специфічне зв'язування", "специфічно зв'язуватися", "специфічний зв'язувач" тощо застосовано тут по відношенню до здатності сполуки, яка нейтралізує ГМ-КСФ та переважно (людського) (моноклонального) антитіла або його функціонального фрагмента до розпізнавання сполуки, до якої вона спрямована (наприклад, ГМ-КСФ або його рецептор) та будь-якого іншого потенційного антигену, якій відрізняється від ГМ-КСФ або від рецептора ГМ-КСФа до такого

ступеню, що зазначена сполука зв'язується або значним чином зв'язується лише з ГМ-КСФ / рецептором ГМ-КСФ, обираючи його з численних інших антигенів у якості потенційних партнерів для зв'язування. Як визначено заявленим винаходом, вважається, що мішень "значно" зв'язується, якщо її зв'язування спостерігають серед численних однаково доступних інших антигенів у якості потенційних партнерів зв'язування та воно перебільшує принаймні у 10 разів, переважно принаймні у 50 разів, найбільш переважніше принаймні у 100 разів або є більш частішим (у кінетичному сенсі), ніж зв'язування будь-якого іншого антигену, який від неї відрізняється. Такі кінетичні вимірювання можуть бути здійснені, наприклад, з застосуванням технології локалізованого поверхневого плазмонного резонансу, як-то системи *Biacore*. Як тут застосовано, терміни "(специфічно) зв'язується з" або споріднені терміни, як-то "(специфічно) впізнає", "спрямований до", "(специфічно) взаємодіє з" та "(специфічно) реагує з" відповідно за цим винаходом означає, що сполука, яка нейтралізує ГМ-КСФ (наприклад, антитіло) демонструє помітну спорідненість до своєї мішені (наприклад, ГМ-КСФ або рецептор ГМ-КСФ) та, звичайно, не демонструє значної реакційної здатності до інших, ніж зазначені мішені, білків або антигенів. "Помітна спорідненість" полягає у зв'язуванні зі спорідненістю приблизно у 10^{-6} М (KD) або ще сильнішою, як-то у 10^{-7} М або ще сильнішою. Переважно, зв'язування вважається специфічним, коли спорідненість зв'язування дорівнює приблизно 10^{-11} - 10^{-8} М, переважно приблизно 10^{-11} - 10^{-9} М, більш переважно приблизно 10^{-11} - 10^{-10} М. Якщо сполука (наприклад, антитіло) специфічно реагує або зв'язується з мішенню, то це може бути легко перевірено, зокрема шляхом порівняння реакції зазначеної сполуки зі своїм білком-мішенню або антигеном з реакцією зазначеної сполуки з іншими, ніж ця мішень, білками або антигенами. Переважно, сполука за винаходом не демонструє суттєвого зв'язування або взагалі не є здатною до зв'язування з іншими, ніж ГМ-КСФ або рецептор ГМ-КСФ білками або антигенами. Термін "суттєво не зв'язуються" або "не здатні до зв'язування" означає, що сполуки заявленого винаходу не проявляють більш, ніж 30 %, переважно більш, ніж 20 %, більш переважно більш, ніж 10 %, певним переважно більш, ніж 9 %, 8 %, 7 %, 6 % або 5 % реакційної здатності, спрямованої до інших білків або антигенів, ніж ГМ-КСФ або рецептор ГМ-КСФ.

[0061] Як тут застосовано, вирази "нейтралізація", "нейтралізатор", "нейтралізуючий" та їх граматично споріднені варіанти мають відношення до часткового або повного ослаблення біологічного ефекту(ефектів) ГМ-КСФ. Таке часткове або повне ослаблення біологічного ефекту(ефектів) ГМ-КСФ є наслідком змінення, втручання та/або усунення ГМ-КСФ-опосередкованих процесів, як-то сигнальної трансдукції, про що свідчить, наприклад, внутрішньоклітинна сигналізація, клітинна проліферація або вивільнення розчинних речовин, посилення або пригнічення активації внутрішньоклітинного гена, що призводить, наприклад, до експресії поверхневих рецепторів для інших, ніж ГМ-КСФ, лігандів. Будь-якому фахівцю у цій галузі зрозуміло, що існують численні способи визначення того, чи може інша сполука, наприклад, антитіло або його функціональний фрагмент бути віднесена до нейтралізаторів, як-то, наприклад, це може бути здійснено шляхом стандартної перевірки *in vitro*, яку звичайно здійснюють наступним чином:

У першому експерименті, присвяченому проліферації, клітинну лінію, рівень проліферації якої, як відомо, залежить від активності ГМ-КСФ інкубують з серіями видів зі змінюючимися концентраціями ГМ-КСФ, після чого вимірюють рівень проліферації клітинної лінії. Від цього вимірювання визначають концентрацію ГМ-КСФ, яка дозволяє відбуватися напівмаксимальній проліферації клітин. У другому експерименті, присвяченому проліферації у кожній серії зразків застосовують таку ж саме кількість клітин, яка була вже застосована у першому експерименті, присвяченому проліферації, а також визначені вище концентрації ГМ-КСФ та, на цей раз, змінні концентрації сполук, які нейтралізують ГМ-КСФ або стосовно яких є припущення, що вони нейтралізують ГМ-КСФ. Далі клітинну проліферацію знову вимірюють для визначення концентрації досліджуваної сполуки, якої буде достатньо для викликання напівмаксимального пригнічення росту. Якщо отриманий графік пригнічення росту у залежності від концентрації досліджуваної сполуки має сигмоїдальну форму, то це є результатом зниження клітинної проліферації при підвищенні концентрації досліджуваної сполуки з наступним досягненням певного рівня пригнічення росту, тобто активність ГМ-КСФ у цьому разі у певній мірі була нейтралізована. У такому разі досліджувана сполука у світлі заявленого винаходу може бути розглянута у якості "нейтралізатора". Одним прикладом клітинної лінії, рівень проліферації якої, як відомо, залежить від активності ГМ-КСФ, є клітинна лінія TF-1, яка описана у Kitamura, T. et al. (1989). *J Cell Physiol* 140, 323-34.

[0062] Фахівцям зрозуміло, що рівень клітинної проліферації є не єдиним параметром, з допомогою якого можна визначити здатність досліджуваної сполуки до нейтралізації ГМ-КСФ. Наприклад, для визначення потенційного нейтралізатора ГМ-КСФ/пригнічувача ГМ-КСФ може

бути застосовано вимірювання рівня молекул сигналування (наприклад. цитокінів), рівень секреції яких залежить від ГМ-КСФ.

[0063] Інші приклади клітинних ліній, які можуть бути застосовані для визначення спроможності досліджуваної сполуки, як-то антитіла або його функціонального фрагменту нейтралізовувати активність ГМ-КСФ охоплюють клітинні лінії AML-193 (Lange, B. et al. (1987). Blood 70, 192-9); GF-D8 (Rambaldi, A. et al. (1993). Blood 81, 1376-83); GM/SO (Oez, S. et al. (1990). Experimental Hematology 18, 1108-11); MO7E (Avanzi, G. C. et al. (1990). Journal of Cellular Physiology 145, 458-64); TALL-103 (Valtieri, M. et al. (1987). Journal of Immunology 138, 4042-50); and UT-7 (Komatsu, N. et al. (1991). Cancer Research 51, 341-8).

[0064] Зрозуміло, що нейтралізація ГМ-КСФ згідно за заявленим винаходом може відбуватися або поза клітинами, які мають рецептори ГМ-КСФ або всередині зазначених клітин. Отже, нейтралізація сполукою ГМ-КСФ може являти собою або пригнічення або запобігання зв'язування ГМ-КСФ зі своїм специфічним рецептором або пригнічення внутрішньоклітинного сигналу, викликаного шляхом зв'язування цитокінів з їх рецепторами. Сполука, яка нейтралізує ГМ-КСФ може, наприклад, безпосередньо зв'язуватися з ГМ-КСФ або зв'язуватися з рецептором ГМ-КСФ та тим самим перешкоджати біологічним діям ГМ-КСФ в обох цих випадках.

[0065] Як було визначено вище, пригнічувачі ГМ-КСФ можуть бути вибрані з групи, яка охоплює поліпептиди, пептидоміметики, молекули нуклеїнових кислот та малі молекули.

[0066] Як тут застосовано, термін "поліпептид" має відношення до групи молекул, яка звичайно складається з принаймні 30 амінокислот, з'єднаних між собою з допомогою ковалентного пептидного зв'язку. Відповідно за винаходом, група поліпептидів охоплює "білки", які складаються з одиничного поліпептиду або з більш, ніж одного поліпептиду. Термін "поліпептид" також охоплює фрагменти білків, доки ці фрагменти складаються з принаймні 30 амінокислот. У цій галузі добре відомо, що поліпептиди можуть утворювати мультимери, як-то димери, тримери та більші олігомери, тобто мультимери, які складаються з більш, ніж однієї поліпептидної молекули. Такі мультимери також охоплюються визначенням терміну "поліпептид". Поліпептидні молекули, які утворюють такі димери, тримери тощо можуть бути ідентичними або неідентичними, отже відповідні структури більш високого порядку таких мультимерів мають назву гомо- або гетеродимерів, гомо- або гетеротримерів тощо. Прикладом гетеромультимеру є молекула антитіла, яка у власній існуючій у природі формі складається з двох ідентичних легких поліпептидних ланцюгів та двох ідентичних важких поліпептидних ланцюгів. Також терміни "поліпептид" та "білок" мають відношення до змінених природним або неприродним шляхом поліпептидів/білків, у яких здійснюють змінення, наприклад, шляхом посттрансляційних модифікацій, як-то глікозилювання, ацетилювання, фосфорилювання, шляхом утворення дисульфідних містків тощо або шляхом хімічних модифікацій, як-то ПЕГілування. Такі модифікації є добре відомими у цій галузі.

[0067] Термін "нуклеїнова кислота" або "полінуклеотид" в контексті даного винаходу стосується полімерних макромолекул, які складаються з численних повторюючихся одиниць фосфорної кислоти, цукру та пуринової та піримідинової основ. Втілення цих молекул охоплюють ДНК, РНК та ПНК. Нуклеїнова кислота може бути одно- та двохланцюговою, лінійною або кільцевою. Окреме переважне втілення нуклеїнової кислоти у контексті заявленого винаходу є аптамером. Аптамери нуклеїнових кислот є молекулами ДНК або РНК, вибраними з випадкових наборів молекул на основі їх здатності зв'язувати інші молекули. Були відібрані аптамери, які зв'язують нуклеїнові кислоти, білки, невеликі органічні сполуки та навіть цілі організми. Вони, як правило, складаються з коротких ниток олігонуклеотидів довжиною у 50 основ або менше.

[0068] Терміном "мала молекула" позначена група органічних лікарських сполук, які мають молекулярну масу, меншу, ніж 1000 Да, переважно до 800 Да та більш переважно 300-700 Да. Верхня межа молекулярної ваги для малої молекули надає їй можливість до швидкої дифузії через клітинні мембрани, отже ці молекули можуть досягати до внутрішньоклітинних ділянок, у яких відбувається та чи інша дія. Відповідні малі молекули можуть бути отримані з принаймні частково рандомізованої бібліотеки пептидів. Бібліотеки прийнятних для заявленого винаходу малих молекул є добре відомими у цій галузі та/або можуть бути придбані у торговельних представників.

[0069] Термін "пептидоміметик" стосується малого білкоподібного ланцюга, розробленого для імітації пептиду. Цей тип молекул є штучно отриманим шляхом модифікації існуючого пептиду з метою змінення його молекулярних властивостей. Наприклад, існуючий батьківський пептид піддають модифікаціям для змінення стійкості або біологічної активності молекули. Ці модифікації охоплюють змінення каркасної основи та введення амінокислот неприродного походження.

[0070] Термін "рецептор ГМ-КСФ" має відношення до фізіологічного рецептора клітинної поверхні ГМ-КСФ, який є описаним у цій галузі у вигляді гетеромеру альфа-ланцюга (CD116) та звичайної бета (бета-с) субодиниці.

[0071] Переважним втіленням нейтралізуючого поліпептиду є антитіло або його функціональні фрагменти, більш переважно антитіло людини або його функціональні фрагменти. Способи отримання антитіл є добре відомі у цій галузі та описані, наприклад у книгах Harlow and Lane "Antibodies, A Laboratory Manual" ("Антитіла: лабораторний підручник") Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988 and Harlow and Lane "Using Antibodies: A Laboratory Manual" ("Застосування антитіл: лабораторний підручник") Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999.

[0072] Визначення терміну "антитіло" охоплює такі втілення, як моноклональні, химерні, однокланцеві, гуманізовані антитіла та антитіла людини. На додачу до повнорозмірних антитіл, це визначення також охоплює похідні та фрагменти антитіл, як-то, зокрема, фрагменти Fab. Похідні або фрагменти антитіл додатково охоплюють фрагменти $F(ab')_2$, Fv, scFv або однокланцеві антитіла як-то доменні антитіла або нанотіла, антитіла з одиничним змінним доменом або імуноглобуліновий одиничний змінний домен, який складається тільки з одного змінного домену, який може бути доменом V_HH, V_H або V_L та який специфічно зв'язує антиген або епітоп незалежно від інших V - ділянок або доменів; див., наприклад, Harlow and Lane (1988) and (1999), loc. cit.; Kontermann and Dübел, Antibody Engineering, Springer, 2nd ed. 2010 and Little, Recombinant Antibodies for Immunotherapy ("Рекомбінантні антитіла для радіоімунотерапії") Cambridge University Press 2009. Зазначений термін також охоплює діатіла або здатні до перенацілювання антитіла з подвійною спорідненістю (DART). Додатково цим терміном передбачені (бінарні) однокланцеві діатіла, тандемні антитіла (Tandab), "мінітіла", прикладами яких є наступні структури: $(VH-VL-CH3)_2$, $(scFv-CH3)_2$ або $(scFv-CH3-scFv)_2$, „Fc DART" та „IgG DART", мультитіла, як-то тріатіла. Одиничні змінні домени імуноглобуліну охоплюють не тільки поліпептид одиничного змінного домену виділених антитіл, але й також і великі поліпептиди, які містять один або декілька мономерів поліпептидної послідовності одиничного змінного домену антитіла.

Крім того, термін "антитіло", як тут застосовано, також стосується похідних або варіантів описаних тут антитіл, які мають ту ж саме специфічність, як і описані антитіла. Приклади "варіантів антитіл" охоплюють гуманізовані варіанти не-людинних антитіл, "антитіла з дозрілої аффіністю" (див., наприклад Hawkins et al. J. Mol. Biol. 254, 889-896 (1992) and Lowman et al., Biochemistry 30, 10832-10837 (1991)) та мутантні антитіла зі зміненою функцією(функціями) (див., наприклад, патент США 5 648 260, Kontermann and Dübел (2010), loc. cit. and Little(2009), loc. cit.).

Термін "антитіло" також охоплює імуноглобуліни (Ig-типів) різних класів (тобто IgA, IgG, IgM, IgD та IgE) та підкласів (як-то IgG1, IgG2 тощо). Похідні антитіл, які також підпадають під визначення терміну антитіла у контексті заявленого винаходу, охоплюють модифікації таких молекул, як-то, наприклад, отримані шляхом глікозилювання, ацетилювання, фосфорилування, утворення дисульфідного зв'язку, фарнезилювання, гідроксилування, метилування або етерифікації.

[0073] Функціональний фрагмент антитіла охоплює домен фрагменту $F(ab')_2$, фрагмент Fab, scFv або конструкції, які містять одиничні змінні домени імуноглобуліну або поліпептиди одиничного домену антитіла, наприклад, одиничні важколанцеві змінні домени або одиничні легколанцеві змінні домени а також інші фрагменти антитіл, як тут описано вище. Фрагменти $F(ab')_2$ або Fab можуть бути побудовані для мінімізації або повного усунення міжмолекулярної дисульфідної взаємодії, яка відбувається між C_{H1} та C_L доменами.

[0074] Як тут застосовано, термін "людське" антитіло слід розуміти в тому сенсі, що антитіло або його функціональний фрагмент містить амінокислотну послідовність (послідовності), яка є у складі популяційного набору антитіл зародкової лінії людини. Отже, для цілей цього визначення, антитіло або його фрагмент може вважатися людським, якщо воно(він) складається з (а) послідовності(послідовностей) амінокислот зародкової лінії людини, тобто якщо амінокислотна послідовність(послідовності) досліджуваного антитіла або його функціональний фрагмент є тотожним (тотожними) до отриманої в результаті експресії послідовності(послідовностей) амінокислот зародкової лінії людини. Антитіло або його функціональний фрагмент може також розглядатися як людське, якщо воно складається з (а) послідовності (послідовностей), яка (які) походить з найбільш точно відповідної послідовності(послідовностей) амінокислот зародкової лінії людини не більш, ніж було очікувано завдяки відбитку соматичної гіпермутації. Додатковим чином також можна очікувати існування здатного до експресії популяційного набору антитіл людини, якій походить від різних інших, ніж

людина ссавців, наприклад, гризунів, як-то миші та щури, які містять амінокислотні послідовності VH CDR3 та також будуть розглядатися, як "людські" для цілей заявленого винаходу. Отже термін "людське антитіло" охоплює антитіло, яке має змінну та сталу ділянки, які є суттєво відповідними відомим у цій галузі імуноглобуліновим послідовностям зародкової лінії людини, в тому числі, наприклад, послідовностям, описаним у Kabat et al. (Див. Kabat et al. (1991) loc. cit.). Людські антитіла винаходу можуть містити амінокислотні залишки, які не кодуються муноглобуліновими послідовностями зародкової лінії людини (наприклад, мутації, введені шляхом випадкового або сайт-спрямованого мутагенезу *in vitro* або шляхом соматичної мутації *in vivo*), наприклад, у ділянках CDR, зокрема у ділянці CDR3. Антитіло людини може мати принаймні одне, два, три, чотири, п'ять або більше положень, заміщених амінокислотним залишком, який не кодуються послідовністю імуноглобуліну зародкової лінії людини.

[0075] Антитіла людини та антитіла іншого походження або їх функціональні фрагменти переважно є моноклональними. Особливо важко отримати моноклональні антитіла людини. На відміну від гібридів мишачих В-клітин з іморталізованими клітинними ліній, гібриди В-клітин людини з іморталізованими клітинними ліній не є життєздатними. Таким чином, людські моноклональні антитіла є результатом подолання значних технічних перешкод, які, за загальним визнанням, існують у галузі технології антитіл. Моноклональний характер антитіл робить їх особливо прийнятними для застосування у якості терапевтичних агентів, оскільки такі антитіла будуть існувати у вигляді одного однорідного молекулярного виду, який може бути добре описаним, відтвореним та очищеним. Ці фактори ведуть до появи продуктів, чиї біологічно активні властивості можуть бути передбачені з високим рівнем точності та є дуже важливим для розгляду таких молекул з метою надання нормативного затвердження для терапевтичного введення людині. Як тут застосовано, термін "моноклональне антитіло" має відношення до антитіл, отриманих з популяції суттєво гомогенних антитіл, тобто індивідуальні антитіла, які містить ця популяція є ідентичними за виключенням можливих природно трапляючихся мутацій та/або пост-трансляційних модифікацій (наприклад, ізомеризацій, амідацій), які можуть бути присутніми у незначних кількостях. Моноклональні антитіла є високоспецифічними, оскільки вони спрямовані проти одного антигенного сайту. Крім того, на відміну від звичайних (поліклональних) препаратів антитіл, які зазвичай містять різні антитіла, спрямовані проти різних детермінант (епітопів), кожне моноклональне антитіло є спрямованим лише проти однієї детермінанти антигену. На додаток до їх специфічності, моноклональні антитіла мають також перевагу через те, що вони синтезуються гібридомною культурою, незабрудненою іншими імуноглобулінами. Модифікатор "моноклональне" вказує на характер антитіла, отриманого з практично гомогенної популяції антитіл та не повинен бути витлумаченим, як необхідність отримання антитіла будь-яким певним способом. Наприклад, моноклональні антитіла для застосування за заявленим винаходом можуть бути отримані гібридомним способом, вперше описаним у роботі Kohler et al., Nature, 256: 495 (1975) або можуть бути отримані з допомогою способів з застосуванням рекомбінантних ДНК (див., наприклад, патент США No. 4 816 567). "Моноклональні антитіла" також можуть бути виділені з фагових бібліотек антитіл з застосуванням, наприклад, способів, описаних у роботах Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991) and Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991).

[0076] Особливо бажано, щоб моноклональні антитіла або відповідні функціональні фрагменти були моноклональними антитілами або відповідними функціональними фрагментами людського походження. Для передбачених агентів-антитіл, призначених для терапевтичного введення людині дуже корисним є те, що ці антитіла мають людське походження. Людське антитіло або його функціональний фрагмент після введення пацієнту-людині швидше за все не викликати сильної імуногенної реакції імунної системи пацієнта, тобто його не будуть розпізнавати у якості чужорідного білка не-людського походження. Це означає, що у цьому разі проти таких терапевтичних антитіл не будуть продукуватися антитіла хазяїна, тобто пацієнта, які б в іншому випадку блокували активність терапевтичного антитіла та/або прискорювали його виведення з організму пацієнта, отже запобігання цього впливу є бажаним терапевтичним ефектом.

[0077] Згідно з бажаним втіленням винаходу, моноклональне антитіло людини або його функціональний фрагмент для застосування з фармацевтичними цілями демонструє реакційну здатність відносно людини та принаймні одного з видів мавп. Така ж саме перехресно-видова реактивність є також бажаною для всіх інших компонентів, які не є антитілами або для сполук, які нейтралізують/пригнічують ГМ-КСФ, отриманих з неантитіл.

[0078] Згідно з додатковим втіленням винаходу, антитіло може бути антитілом ізотипу IgG. Ізотип IgG містить не тільки змінні ділянки антитіл важкого та легкого ланцюгів, відповідні за високий рівень впізнавання антигену та зв'язування, але також і сталі ділянки важкого та легкого

поліпептидних ланцюгів антитіла, які звичайно є присутніми у "природних" отриманих антитіл та, у деяких випадках, навіть вуглеводні модифікації однієї або декількох ділянок. Таке глікозилювання звичайно є відмінною ознакою формату IgG та має місце у сталих ділянках, які містять так звані Fc - ділянки повного антитіла, які, як відомо, проявляють різні ефекторні функції *in vivo*. На додачу до цього, Fc - ділянки опосередковують зв'язування IgG з Fc - рецептором, а також сприяють спрямованому переміщенню IgG до місця з підвищеною присутністю Fc - рецепторів, наприклад, до тканини, у якій відбувається запалення. Переважно, антитіло IgG є антитілом IgG1 або IgG4, формати яких є бажаними, оскільки їх механізм дії *in vivo* є особливо добре описаним та зрозумілим, зокрема особливо це стосується антитіл IgG1.

[0079] Згідно з додатковим втіленням винаходу, функціональний фрагмент антитіл може переважно бути фрагментом scFv, Fv, одиничним доменом антитіл, антитілом V_{HH}, діатілом, тандемним діатілом, фрагментами Fab, Fab" або F(ab)₂. Ці формати звичайно можуть бути розділені на два підкласи, як-то на ті, що складаються з одного поліпептидного ланцюга та ті, які містять щонайменш два поліпептидних ланцюги. Члени першого підкласу охоплюють фрагмент scFv (який містить одну ділянку V_H та одну ділянку V_L, приєднану до одиничного поліпептидного ланцюга через поліпептидний лінкер); однодоменне антитіло (яке містить одиничну змінну ділянку антитіла) як-то антитіло V_{HH} яке містить одиничну ділянку V_H). Члени іншого підкласу охоплюють фрагмент Fv (який містить одну ділянку V_H та одну ділянку V_L у вигляді окремих поліпептидних ланцюгів, нековалентно зв'язаних між собою); діатіла (які містять два нековалентно зв'язаних поліпептидних ланцюги, кожен з яких містить дві змінні ділянки антитіл, як-то звичайно одну V_H-ділянку та одну V_L-ділянку на одному поліпептидному ланцюзі та ці два поліпептидних ланцюги є розташованими у конформації типу "голова до хвоста" з утворенням таким чином бівалентної молекули антитіла); тандемні діатіла (біспецифічні одноланцюгові Fv -антитіла, які містять чотири ковалентно приєднані імуноглобулінові змінні V_H та V_L - ділянки з двома різними специфічностями, утворюючи гомодимер, який є вдвічі більшим описаного вище діатіла); фрагмент Fab (який містить у якості одного поліпептидного ланцюга повний легкий ланцюг антитіла, який містить ділянку V_L та повну сталу ділянку легкого ланцюга та, у якості іншого поліпептидного ланцюга він ще містить частину важкого ланцюга антитіла з повною V_H - ділянкою та частиною сталої ділянки важкого ланцюга та зазначені два поліпептидних ланцюги є зв'язаними міжмолекулярним чином з допомогою міжланцюгового дисульфідного зв'язку); фрагмент Fab" (подібний до вищезазначеного фрагменту Fab за виключенням додаткових зменшених дисульфідних зв'язків у важкому ланцюзі антитіла); та фрагмент F(ab)₂ (який містить дві молекули Fab", де кожна така молекула є приєднаною до відповідної іншої молекули Fab" з допомогою міжланцюгових дисульфідних зв'язків). Взагалі функціональні фрагменти антитіл описаного вище типу мають велику гнучкість до налаштування, наприклад, для отримання певних фармакокінетичних властивостей бажаного для терапевтичного введення антитіла, які б задовольняли певним поточним вимогам. Наприклад, може бути бажаним зменшення розміру антитіла, яке вводять з метою підвищення рівню тканинної проникності у разі поганої васкуляризації підданих лікуванню тканин (наприклад, суглобів). При певних обставинах також може бути бажаним підвищення швидкості виведення терапевтичних антитіл з організму, прискорення якої звичайно досягають шляхом зменшення розміру введених антитіл. Вираз "фрагмент антитіла " визначено тут, як функціональний фрагмент антитіла у контексті винаходу, тобто за умови того, що цей фрагмент зберігає певні зв'язувальні характеристики для епітопа / мішені батьківського антитіла, тобто за умови того, що він специфічно зв'язується з ГМ-КСФ або з рецептором ГМ-КСФ.

[0080] Згідно з додатковим втіленням винаходу, антитіло або його функціональний фрагмент може бути присутнім у моновалентній моноспецифічній; багатовалентній моноспецифічній, зокрема у двовалентній моноспецифічній; або у багатовалентній мультиспецифічній, зокрема у двовалентній біспецифічній форми. Взагалі багатовалентні моноспецифічні, зокрема двовалентні моноспецифічні антитіла, як-то людський IgG, як описано вище, можуть мати терапевтичну перевагу через те, що нейтралізація, здійснена з допомогою такого антитіла також посилюється ефектами авідності, тобто зв'язування одним і тим же антитілом багатьох молекул певного антигену, як-то, у цьому разі, ГМ-КСФ або рецептора ГМ-КСФ. Різні моновалентні моноспецифічні форми фрагментів антитіл описані вище (наприклад, scFv, Fv, V_{HH} або однодоменне антитіло). Мультивалентні мультиспецифічні, зокрема двовалентні біспецифічні форми антитіл можуть містити повнорозмірний IgG, у якому одна зв'язувальна ділянка зв'язується з ГМ-КСФ / рецептором ГМ-КСФ приматів, а інша зв'язувальна ділянка зв'язується з іншим антигеном, який відрізняється від ГМ-КСФ / рецептора ГМ-КСФ. Додатковою мультивалентною та мультиспецифічною, зокрема двовалентною біспецифічною формою антитіла може бути одноланцюгове біспецифічне людське антитіло, тобто рекомбінантна

конструкція антитіла людини, яка містить два фрагменти scFv, як описано вище, які утворюють один безперервний поліпептидний ланцюг та зв'язані між собою з допомогою короткого вставленого спейсера, як звичайно відомо у цій галузі (див. наприклад WO 99/54440 для анти-CD19 x анти-CD3 біспецифічних одноланцюгових антитіл). У цьому разі одна частина у складі

5 scFv біспецифічного одноланцюгового антитіла буде специфічно зв'язувати ГМ-КСФ / рецептор ГМ-КСФ, як наведено вище, тоді як відповідно інша частина scFv цього біспецифічного одноланцюгового антитіла буде зв'язувати інший антиген, який, як визначено, є терапевтично корисним.

[0081] Згідно з додатковим втіленням, антитіла або їх функціональні фрагменти можуть бути дериватизовані, наприклад з органічним полімером, наприклад з одним або кількома молекулами поліетиленгліколю ("ПЕГ") та/або полівінілпіролідону ("ПВП"). Як відомо у цій галузі, така дериватизація може надавати перевагу у модулюванні фармакодинамічних властивостей антитіл або їх функціональних фрагментів. Особливо бажаними є молекули ПЕГ, дериватизовані у вигляді ПЕГ-малеїмідів, які роблять можливою сайт-специфічну кон'югацію з

10 антитілом або його функціональним фрагментом через сульфгідрильну групу цистеїнової амінокислоти. З них особливо бажаними є молекули ПЕГ-малеїмідів у 20 кДа та/або 40 іДа, у розгалуженій формі або у вигляді прямого ланцюга. Особливо бажаним може бути підвищення ефективної молекулярної маси дрібних фрагментів анти- ГМ-КСФ антитіл людини, як-то фрагментів scFv шляхом їх приєднання до однієї або до кількох молекул ПЕГ, особливо до ПЕГ-

15 малеїмідів.

[0082] Антитіла заявленого винаходу також охоплюють "химерні" (імуноглобулінові) антитіла, у яких частина важкого та/або легкого ланцюга є ідентичною або гомологічною до відповідної послідовності антитіл, отриманих з певних видів або антитіл, які належать до окремого класу або підкласу, тоді як позостала частина ланцюга (ланцюгів) є ідентичною або

20 гомологічною відповідній послідовності антитіл, отриманій з інших видів або антитіл, які належать до іншого класу або підкласу, а також фрагментів таких антитіл, якщо вони демонструють бажану біологічну активність (патент США No. 4 816 567; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984)). Зазначені химерні антитіла також охоплюють "спрощені" антитіла, які містять антиген-зв'язуючі послідовності змінного домену, отримані з

25 відмінних від людини приматів (наприклад, людиноподібні мавпи, мавпи родини мавпових) та послідовності сталої ділянки людини.

[0083] "Гуманізовані" форми тваринних (наприклад, мишачих) антитіл являють собою химерні імуноглобуліни, імуноглобулінові ланцюги або їх фрагменти (як-то Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ або інші антиген-зв'язувальні субпослідовності антитіл) переважно людських послідовностей, які

30 містять мінімальну послідовність, отриману з тваринного імуноглобуліну. Здебільшого гуманізовані антитіла є людськими імуноглобулінами (реципієнтне антитіло), у яких залишки гіперзмінної ділянки (також CDR) реципієнта заміщені залишками, отриманими з гіперзмінної ділянки не-людинних видів (донорне антитіло), як-то миші, щура або кроля, яка має бажану специфічність, спорідненість та місткість. У певних випадках залишки каркасної ділянки Fv (FR)

35 людського імуноглобуліну заміщують відповідними залишками тваринного походження. Крім того, як тут застосовано, "гуманізоване антитіло" може також містити залишки, які є відсутніми у донорних та у реципієнтних антитілах. Ці модифікації здійснюють для додаткового покращення та оптимізації активності антитіла. Гуманізоване антитіло оптимальним чином також буде містити принаймні частину сталої ділянки імуноглобуліну (Fc), звичайно частину сталої ділянки

40 людського імуноглобуліну. Додаткові деталі див. у Jones et al., Nature, 321: 522-525 (1986); Reichmann et al., Nature, 332: 323-329 (1988); та Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593-596 (1992).

[0084] Як тут застосовано, нумерація амінокислотних залишків або положень ГМ-КСФ людини та нелюдиноподібних приматів має відношення до нумерації зрілої форми ГМ-КСФ, тобто ГМ-КСФ без сигнальної послідовності, яка містить 17 амінокислот (повна довжина

45 описаної вище зрілої форми ГМ-КСФ людини та нелюдиноподібних приматів дорівнює 127 амінокислот). Послідовність ГМ-КСФ людини та гібону є наступною:

SEQ ID № 49

APARSPSPST QPWEHVNAIQ EARRLLNLSR DTAAEMNETV EVISEMFDLQ EPTCLQTRLE
LYKQGLRGSL TKLKGPLTMM ASHYKQHCPP TPETSCATQI ITFESFKENL KDFLLVIPFD

50 CWEVPVQE

[0085] Послідовність ГМ-КСФ деяких представників родини макак, як-то, наприклад, макаки-резуса та макаки-крабоїда є наступною:

SEQ ID №: 50

APARSPSPGT QPWEHVNAIQ EARRLLNLSR DTAAEMNKTV EVVSEMF DLQ EPSCLQTRLE
LYKQGLQGSL TKLKGPLTMM ASHYKQHCPP TPETSCATQI ITFQSFKENL KDFLLVIPFD
CWEVPVQE

- 5 [0086] Послідовність ГМ-КСФ людини також наведена у SEQ ID №:57. Послідовність ГМ-КСФ гібону також наведена у SEQ ID №: 58:

APARSPSPST QPWEHVNAIQ EARRLLNLSR DTAAEMNETV EVISEMF DLQ
EPTCLQTRLE LYKQGLRGSL **TKLKGPLTMM** ASHYKQHCPP TPETSCATQI
ITFESFKENL KDFLLVIPFD CWEVPVQE

(SEQ ID №№ 57 та 58)

- [0087] Послідовність ГМ-КСФ деяких представників родини макак, як-то, наприклад, макаки-резуса та макаки-крабоїда є наступною:

APARSPSPGT QPWEHVNAIQ EARRLLNLSR DTAAEMNKTV EVVSEMF DLQ
EPSCLQTRLE LYKQGLQGSL **TKLKGPLTMM** ASHYKQHCPP TPETSCATQI
ITFQSFKENL KDFLLVIPFD CWEVPVQE

(SEQ ID №№ 59 та 60)

- 10 [0088] Мінімальний епітоп, переважно переривчастий епітоп, як тут описано, який зв'язується антитілом, переважно моноклональним антитілом людини (або його функціональним фрагментом) позначено жирним шрифтом.

- [0089] Згідно з бажаним втіленням, сполука, яка нейтралізує ГМ-КСФ є антитілом (переважно моноклональним антитілом людини) або його функціональним фрагментом, що зв'язується з ГМ-КСФ та більш переважно зв'язується з епітопом ГМ-КСФ, який переважно містить амінокислотну послідовність 23-27 (RRLN) та/або амінокислотну послідовність 65-77 (GLR/QGSLTKLGPL). Ці відрізки у складі загальної амінокислотної послідовності ГМ-КСФ позначено жирним шрифтом. Термін "епітоп" має відношення до ділянки антигену або мішені (наприклад, ГМ-КСФ), з якою специфічно зв'язується сполука, як-то антитіло або його функціональний фрагмент. Під таким зв'язуванням / взаємодією також маєтись на увазі термін "специфічне впізнавання". "Епітопи" можуть бути утворені завдяки сусідньому розташуванню суміжних або несуміжних амінокислот, опосередкованому третинною структурою білка. Якщо головна амінокислотна послідовність містить визначений епітоп, то такий епітоп вважається "лінійним епітопом". Лінійний епітоп звичайно містить принаймні 3 або принаймні 4 та більш звичайніше принаймні 5 або принаймні 6 або принаймні 7 або, наприклад, приблизно 8-10 або більше амінокислот у складі унікальної послідовності. У контексті заявленого винаходу епітоп ГМ-КСФ переважно є переривчастим епітопом. У випадку, коли антитіло зв'язується з обома відрізками 23-27 та 65-77 амінокислотної послідовності, епітоп може отримати назву "переривчастого". У вторинній структурі ГМ-КСФ людини, амінокислоти у положеннях 15-35 знаходяться у спіралі, тоді як залишки, відповідні положенням 65-77 є частиною петельної структури, розташованої між спіралями С та D. З допомогою тривимірної структурної моделі молекули було виявлено тісну стеричну близькість цих ділянок між собою (див. також WO 2006/111353). Як тут застосовано, термін "переривчастий епітоп" має відношення до принаймні двох несуміжних відрізків амінокислотної послідовності у складі даного поліпептидного ланцюга, як-то, у цьому випадку, зрілого ГМ-КСФ людини та нелюдиноподібних мавп, які одночасно та специфічно зв'язуються з антитілом. Згідно з цим визначенням, таке одночасне специфічне зв'язування може мати місце у лінійній формі поліпептиду ГМ-КСФ. У цьому разі можна уявити зрілий поліпептид ГМ-КСФ, який утворює витягнуту петлю, у одній з ділянок якої дві позначені вище напівжирним шрифтом послідовності розташовуються у лінію, наприклад більш-менш паралельно у безпосередній близькості між собою та у такому положенні вони специфічно та одночасно зв'язуються з фрагментом антитіла. Згідно з цим визначенням, одночасне специфічне зв'язування зазначених вище двох відрізків послідовності зрілої ГМ-КСФ може також приймати форму зв'язування антитіла з конформаційним епітопом. У даному випадку зрілий ГМ-КСФ вже має третинну конформацію, у якій він звичайно існує in vivo та у якій поліпептидний ланцюг зрілого ГМ-КСФ є згорнутим таким чином, щоб привести два зазначених вище відрізки послідовності до просторової близькості між собою, наприклад на зовнішній поверхні окремої ділянки зрілого згорнутого поліпептиду ГМ-КСФ, де вони потім розпізнаються завдяки їх тривимірній конформації у контексті оточуючої поліпептидної послідовності.

- 50 [0090] У додатковому переважному втіленні вищезазначений епітоп або вищезазначений переривчастий епітоп ГМ-КСФ додатково містить:

- амінокислоти 28-31 (LSRD), позначені курсивом у наведеній вище послідовності ГМ-КСФ людини та нелюдиноподібного примата;
- амінокислоти 32-33 (TA), підкреслені у наведеній вище послідовності ГМ-КСФ людини та нелюдиноподібного примата; та/або

- амінокислоти 21-22 (EA), підкреслені у наведеній вище послідовності ГМ-КСФ людини та нелюдиноподібного примата.

[0091] Переважно моноклональні анти-ГМ-КСФ антитіла людини або їх функціональні фрагменти є такими, як зокрема описано у WO2006/111353 з посиланням на послідовності, позначені як SEQ ID №№ 1-48 та 52-56, які являють собою амінокислотні послідовності ділянок, які визначають комплементарність (CDR) 1-3 важкого та легкого ланцюгів а також змінних ділянок важкого та легкого ланцюгів та повнорозмірних важких та легких ланцюгів.

[0092] Особливо бажаними є анти-ГМ-КСФ антитіла або їх функціональні фрагменти, які містять послідовність CDR1 змінної ділянки важкого ланцюга, позначену, як SEQ ID № 14, послідовність CDR2 змінної ділянки важкого ланцюга, позначену, як SEQ ID № 15 та послідовність CDR3 змінної ділянки важкого ланцюга, позначену, як SEQ ID № 1; або які містять послідовність CDR1 змінної ділянки важкого ланцюга, позначену, як SEQ ID № 14, послідовність CDR2 змінної ділянки важкого ланцюга, позначену, як SEQ ID № 15 та послідовність CDR3 змінної ділянки важкого ланцюга, позначену, як SEQ ID № 2; або які містять послідовність CDR1 змінної ділянки важкого ланцюга, позначену, як SEQ ID № 14, послідовність CDR2 змінної ділянки важкого ланцюга, позначену, як SEQ ID № 15 та послідовність CDR3 змінної ділянки важкого ланцюга, позначену, як SEQ ID № 3; або які містять послідовність CDR1 змінної ділянки важкого ланцюга, позначену, як SEQ ID № 14, послідовність CDR2 змінної ділянки важкого ланцюга, позначену, як SEQ ID № 15 та послідовність CDR3 змінної ділянки важкого ланцюга, позначену, як SEQ ID № 4; або які містять послідовність CDR1 змінної ділянки важкого ланцюга, позначену, як SEQ ID № 14, послідовність CDR2 змінної ділянки важкого ланцюга, позначену, як SEQ ID № 15 та послідовність CDR3 змінної ділянки важкого ланцюга, позначену, як SEQ ID № 5; або які містять послідовність CDR1 змінної ділянки важкого ланцюга, позначену, як SEQ ID № 14, послідовність CDR2 змінної ділянки важкого ланцюга, позначену, як SEQ ID № 15 та послідовність CDR3 змінної ділянки важкого ланцюга, позначену, як SEQ ID № 6; або які містять послідовність CDR1 змінної ділянки важкого ланцюга, позначену, як SEQ ID № 14, послідовність CDR2 змінної ділянки важкого ланцюга, як, позначену, як SEQ ID № 15 та послідовність CDR3 змінної ділянки важкого ланцюга, позначену, як SEQ ID № 7; або які містять послідовність CDR1 змінної ділянки важкого ланцюга, позначену, як SEQ ID № 14, послідовність CDR2 змінної ділянки важкого ланцюга, позначену, як SEQ ID № 15 та послідовність CDR3 змінної ділянки важкого ланцюга, позначену, як SEQ ID № 8; або які містять послідовність CDR1 змінної ділянки важкого ланцюга, позначену, як SEQ ID № 14, послідовність CDR2 змінної ділянки важкого ланцюга, позначену, як SEQ ID № 15 та послідовність CDR3 змінної ділянки важкого ланцюга, позначену, як SEQ ID № 9; або які містять послідовність CDR1 змінної ділянки важкого ланцюга, позначену, як SEQ ID № 14, послідовність CDR2 змінної ділянки важкого ланцюга, позначену, як SEQ ID № 15 та послідовність CDR3 змінної ділянки важкого ланцюга, позначену, як SEQ ID № 10; або які містять послідовність CDR1 змінної ділянки важкого ланцюга, позначену, як SEQ ID № 14, послідовність CDR2 змінної ділянки важкого ланцюга, позначену, як SEQ ID № 15 та послідовність CDR3 змінної ділянки важкого ланцюга, позначену, як SEQ ID № 11; або які містять послідовність CDR1 змінної ділянки важкого ланцюга, позначену, як SEQ ID № 14, послідовність CDR2 змінної ділянки важкого ланцюга, позначену, як SEQ ID № 15 та послідовність CDR3 змінної ділянки важкого ланцюга, позначену, як SEQ ID № 12; або які містять послідовність CDR1 змінної ділянки важкого ланцюга, позначену, як SEQ ID № 14, послідовність CDR2 змінної ділянки важкого ланцюга, позначену, як SEQ ID № 15 та послідовність CDR3 змінної ділянки важкого ланцюга, позначену, як SEQ ID № 13; або які містять послідовність CDR1 змінної ділянки важкого ланцюга, позначену, як SEQ ID № 14, послідовність CDR2 змінної ділянки важкого ланцюга, позначену, як SEQ ID № 15 та послідовність CDR3 змінної ділянки важкого ланцюга, позначену, як SEQ ID № 56.

[0093] Ще більш бажаною є будь-яка з наведених вище 14 комбінацій послідовностей CDR1, CDR2 та CDR3 важкого ланцюга, яка є присутньою у антитілі або у його функціональному фрагменті, який додатково у власній змінній ділянці легкого ланцюга містить ділянку CDR1, яка містить амінокислотну послідовність, позначену, як SEQ ID № 16, ділянку CDR2, яка містить амінокислотну послідовність, позначену, як SEQ ID № 17 та ділянку CDR3, яка містить амінокислотну послідовність, позначену, як SEQ ID № 18.

[0094] Особливо бажаним є анти-ГМ-КСФ антитіло або його функціональний фрагмент, що містить послідовність CDR1 змінної ділянки важкого ланцюга, позначену, як SEQ ID № 14, послідовність CDR2 змінної ділянки важкого ланцюга, позначену, як SEQ ID № 15 та послідовність CDR3 змінної ділянки важкого ланцюга, позначену, як SEQ ID № 2 та додатково містить у власній змінній ділянці легкого ланцюга ділянку CDR1, що містить амінокислотну послідовність, позначену, як SEQ ID № 16, ділянку CDR2, що містить амінокислотну

послідовність, позначену, як SEQ ID № 17 та ділянку CDR3, що містить амінокислотну послідовність, позначену, як SEQ ID № 18. Це анти-ГМ-КСФ антитіло є найбільш бажаною сполукою для нейтралізування ГМ-КСФ та також є описаним у WO 2006/111353.

[0095] Згідно з додатковим втіленням, анти-ГМ-КСФ антитіло або його функціональний

[illegible]

[0096] Згідно з додатковим втіленням, анти-ГМ-КСФ антитіло або його функціональний фрагмент містить у власній змінній ділянці легкого ланцюга амінокислотну послідовність позначену, як SEQ ID № 54. Також є бажаним антитіло або його функціональний фрагмент зі змінною ділянкою легкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, позначену, як SEQ ID № 54 та змінною ділянкою важкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, позначену, як SEQ ID № 20; або антитіло або його функціональний фрагмент зі змінною ділянкою легкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, позначену, як SEQ ID № 54 та змінною ділянкою важкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, позначену, як SEQ ID № 21; або антитіло або його функціональний фрагмент зі змінною ділянкою легкого

[illegible]

[illegible]

[0098] Бажане анти-ГМ-КСФ антитіло або його функціональний фрагмент містить у власній змінній ділянці легкого ланцюга ділянку CDR1, що містить амінокислотну послідовність, позначену, як SEQ ID № 16, ділянку CDR2, що містить амінокислотну послідовність, позначену, як SEQ ID № 17 та ділянку CDR3, що містить амінокислотну послідовність, позначену, як SEQ ID № 18 та містить у власній змінній ділянці важкого ланцюга ділянку CDR1, що містить амінокислотну послідовність, позначену, як SEQ ID № 14, ділянку CDR2, що містить амінокислотну послідовність, позначену, як SEQ ID № 15 та ділянку CDR3, що містить амінокислотну послідовність, позначену будь-яким з номерів SEQ ID №№. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 або 56.

[illegible]

складі власного важкого ланцюга, позначену, як SEQ ID № 46; або амінокислотну послідовність у складі власного легкого ланцюга, позначену, як SEQ ID № 34 та амінокислотну послідовність у складі власного важкого ланцюга, позначену, як SEQ ID № 47; або амінокислотну послідовність у складі власного легкого ланцюга, позначену, як SEQ ID № 34 та амінокислотну послідовність у складі власного важкого ланцюга, позначену, як SEQ ID № 35 є найбільш бажаною сполукою для нейтралізації ГМ-КСФ та є також описаним у WO 2006/111353.

[0100] У наведених вище переважних втіленнях передбачені молекули антитіл та/або їх функціональні фрагменти, переважно молекули моноклональних антитіл людини та/або їх функціональні фрагменти, які є особливо бажаними для застосування у якості нейтралізаторів активності ГМ-КСФ приматів та людини. Застосування антитіл або їх функціональних фрагментів за цими особливо переважними втіленнями є дуже корисним з кількох причин.

[0101] По-друге, вони впізнають ГМ-КСФ приматів та людини з високою специфічністю. Тобто, що з суміші ГМ-КСФ приматів з іншими колонієстимулюючими факторами приматів (наприклад G-CSF та M-CSF приматів), зв'язуючі молекули згідно до цих особливо переважних втілень мають дуже вибіркову дію до ГМ-КСФ приматів, тоді як інші колонієстимулюючі фактори у тому ж середовищі ними не впізнаються. Те ж саме, але з відповідними поправками, стосується й ГМ-КСФ людини. Це означає, що при введенні людині антитіла або його функціонального фрагменту за цими втіленнями очікується специфічне зв'язування та нейтралізація ним тільки бажаної мішені без нейтралізації та зв'язування інших небажаних об'єктів. У кінцевому рахунку це призводить до високого ступеня передбачуваності відносно терапевтичної дії *in vivo*.

[0102] По-друге, зв'язувальні агенти за цими особливо бажаними втіленнями мають значну спорідненість зв'язування з ГМ-КСФ приматів та людини. Під "значною спорідненістю" мається на увазі зв'язування зі спорідненістю приблизно у 10^{-6} M (KD) або більше. Переважно, зв'язування вважається значним (або високим або специфічним), коли спорідненість зв'язування дорівнює приблизно 10^{-12} - 10^{-8} M, 10^{-12} - 10^{-9} M, 10^{-12} - 10^{-10} M, 10^{-11} - 10^{-8} M, переважно приблизно 10^{-11} - 10^{-9} M. Відповідно, K_D зв'язувача за винаходом переважно знаходиться у цих межах. Враховуючи той факт, що значення K_D знаходяться у межах від приблизно 4×10^{-9} M до приблизно $0,04 \times 10^{-9}$ M, останнє відповідає 40 pM, що було спостережено для описаних тут молекул антитіл та бажано, щоб молекули антитіл винаходу мали значення K_D у цих межах. Однак, також бажаним є, щоб молекули антитіл за винаходом мали значення K_D , як тут описано вище. Оскільки кінетична швидкість асоціації таких молекул у водному середовищі значною мірою контролюється дифузією, отже, вона не може бути покращеною з перевищенням того, що місцеві умови дифузії дозволяють здійснити у фізіологічних умовах, тому низькі значення K_D виникають головним чином внаслідок кінетичної швидкості дисоціації (k_{off}), яка для найвищої спорідненості антитіла-зв'язувача дорівнює приблизно 10^{-5} s^{-1} . Це означає, що при утворенні комплексу між, з одного боку, моноклональним антитілом людини або його функціональним фрагментом згідно за будь-яким з цих втілень та, з іншого боку, ГМ-КСФ, цей комплекс не одразу або принаймні не швидко розпадається. Для зв'язування молекул, визначених у якості нейтралізаторів біологічної активності ці характеристики є дуже корисними, оскільки бажаний нейтралізуючий ефект, як правило, буде тривати тільки до тих пір, доки молекула, біологічна активність якої повинна бути нейтралізована (у цьому випадку це ГМ-КСФ приматів та людини) залишається зв'язаною нейтралізуючою зв'язувальною молекулою. Отже, нейтралізуюча молекула, яка залишається тривалий час зв'язаною з призначеною до цього мішенню буде також відповідно тривалий час продовжувати нейтралізацію.

[0103] Висока спорідненість зв'язування антитіл або їх функціональних фрагментів до ГМ-КСФ приматів та людини також має додаткову перевагу. Звичайно антитіла або їх функціональні фрагменти виводяться з кровотоку пацієнта залежним від розміру чином з виведенням та усуненням спочатку більш маленьких молекул, а потім більш великих. Оскільки комплекс двох поліпептидів - антитіла або фрагмента антитіла та зв'язаного ГМ-КСФ вочевидь є більшим, ніж окреме антитіло, то завдяки вищезазначеному низькому значенню k_{off} терапевтичний нейтралізатор має меншу швидкість виведення та усунення з організму пацієнта, ніж у разі, коли він не зв'язується з ГМ-КСФ. Таким чином, збільшується не тільки величина нейтралізуючої активності, але й також її тривалість *in vivo*.

[0104] Визначена для зв'язувачів за вищезазначеними втіленнями нейтралізуюча активність є несподівано високою. Як буде більш детально описано нижче, активність, яка нейтралізує ГМ-КСФ була виміряна *in vitro* з допомогою аналізу пригнічення росту TF-1 (Kitamura, T. et al. (1989).

J. Cell Physiol. 140, 323-34). У якості показника нейтралізуючого потенціалу були виміряні значення IC_{50} , де IC_{50} являє собою концентрацію антитіла або його функціонального фрагмента відповідно за будь-яким з цих втілень, потрібну для досягнення напівмаксимального пригнічення клітинної проліферації TF-1. Для зазначених вище моноклональних анти-ГМ-КСФ антитіл людини або їх функціональних фрагментів були визначені значення IC_{50} , які дорівнюють приблизно 3×10^{-10} М або приблизно 0,3 нМ. Отже, зв'язуючі молекули є дуже потужними нейтралізаторами активності ГМ-КСФ приматів та людини.

[0105] Іншими прикладами нейтралізуючих анти-ГМ-КСФ антитіл є антитіло людини E10 та антитіло людини G9, описані у Li et al., (2006) PNAS 103(10):3557-3562. Ці антитіла E10 та G9 належать до класу антитіл IgG. Антитіло E10 має спорідненість зв'язування для ГМ-КСФ, яка дорівнює 870 пМ та антитіло G9 має спорідненість зв'язування для ГМ-КСФ, яка дорівнює 14 пМ. Обидва антитіла є агс-специфічними для зв'язування з ГМ-КСФ людини та демонструють сильну нейтралізуючу активність, як було оцінено шляхом аналізу проліферації клітин TF-1. Іншим прикладом є анти-ГМ-КСФ антитіла людини, як описано у WO 2006/122797.

[0106] Також у заявленому винаході можуть бути застосовані антагоністи або нейтралізатори ГМ-КСФ, які є антитілами до рецептора ГМ-КСФ. Такі антагоністи ГМ-КСФ містять антитіла до рецептора альфа- або бета-ланцюга ГМ-КСФ. Такі антитіла можуть бути застосовані у винаході у будь-якій формі, як зазначено вище, наприклад, вони можуть бути інтактними, химерними, моноклональними, поліклональними, а також можуть бути фрагментами або похідними цих антитіл, одноланцюговими, гуманізованими, отриманими по технології Humaneered™ тощо. Приклади прийнятних для застосування у винаході антитіл до рецептора ГМ-КСФ, наприклад, нейтралізуючих високоспоріднених антитіл відомі у цій галузі (див. наприклад, патент США 5 747 032 та Nicola et al., Blood 82:15 1724, 1993).

[0107] Інші додаткові послідовності прийнятних антитіл наведені у наступних заявках та включені сюди повністю шляхом посилання. Див. анти-ГМ-КСФ антитіла, наведені у WO2006/122797, WO2007/049472, WO2007/092939, WO2009/134805, WO2009/064399, WO2009/038760. Антитіла до рецептора ГМ-КСФ наведені у WO2007/110631.

[0108] В якості підсумку слід зазначити, що анти-ГМ-КСФ антитіла або їх функціональні фрагменти демонструють високий рівень розпізнавання бажаного антигену, зв'язують цей антиген протягом тривалого часу та дуже щільно та демонструють дуже сильну нейтралізуючу активність протягом тривалого часу, доки вони залишаються зв'язаними. У той же час, тривале існування комплексу антигену зі зв'язуючим агентом знижує виведення цього зв'язувача з організму, тим самим подовжуючи тривалість бажаної терапевтичної дії in vivo. Ті ж характеристики переважно також притаманні антитілам, які розпізнають рецептор ГМ-КСФ, як описано вище.

[0109] Композиція за заявленим винаходом переважно є фармацевтичною композицією. Відповідно до зазначених втілень, термін "фармацевтична композиція" стосується композиції для введення пацієнту, переважно пацієнту-людині. Фармацевтичні композиції або препарати звичайно знаходяться у формі, прийнятній для досягнення біологічної активності активного інгредієнта для надання потрібної ефективності, отже вони можуть бути введені суб'єкту, як тут описано, для терапевтичного застосування. Як правило, фармацевтична композиція містить відповідні (тобто фармацевтично прийнятні) композиції носіїв, стабілізаторів та/або наповнювачів. У бажаному втіленні фармацевтичною композицією є композиція для парентерального, трансдермального, інтравенного, внутріартеріального, інтратекального та/або інтраназального введення або введення шляхом прямої ін'єкції у тканину. Зокрема також передбачено введення вказаної композиції пацієнту шляхом інфузії або ін'єкції. Застосування прийнятних композицій може бути здійснено різними шляхами, наприклад, шляхом внутрішньовенного, внутрічеревиного, підшкірного, внутрішньом'язевого, місцевого або внутрішньошкірного введення. Також композиції заявленого винаходу можуть додатково містити фармацевтично прийнятний носій. Приклади прийнятних фармацевтичних носіїв добре відомі у цій галузі та охоплюють буферизовані сольові розчини, воду, емульсії, як-то емульсії типу олія/вода, різні типи змочуючих агентів, стерильні розчини, ліпосоми тощо. Композиції, які містять такі носії можуть бути отриманими з допомогою добре відомих стандартних способів.

[0110] Відповідно до наведених втілень, термін "ефективна кількість" має відношення до кількості сполуки, яка нейтралізує ГМ-КСФ та є ефективною для лікування захворювань, пов'язаних з ГМ-КСФ, як-то запальних та автоімунних розладів.

[0111] Бажані дозування та способи введення є такими, щоб сполука, яка нейтралізує ГМ-КСФ після введення була присутньою з ефективними дозуваннями у крові. Схема введення може бути скоригована з допомогою спостереження станів хвороби та аналізу сироваткових рівнів сполуки, що нейтралізує ГМ-КСФ у лабораторних тестах або з наступним збільшенням

інтервалу введення, наприклад, від двох разів на тиждень або одного разу на тиждень до одного разу на два тижні, одного разу на три тижні, одного разу на чотири тижні тощо або, альтернативним чином, відповідно до зменшення інтервалу введення.

[0112] Фармацевтичні композиції можуть бути введені суб'єкту з прийнятною дозою. Режим дозування буде визначатися лікарем та залежить від клінічних факторів. Як добре відомо у медицині, дозування для будь-якого пацієнта залежить від багатьох факторів, як-то від розміру пацієнта, площі поверхні тіла, віку, певної призначеної для введення сполуки, статі, часу та шляху введення, загального стану здоров'я та від інших ліків, яких одночасно вводять.

[0113] Препарати для парентерального введення містять стерильні водні або неводні розчини, суспензії та емульсії. Прикладами неводних наведених розчинників є пропіленгліколь, поліетиленгліколь, рослинні олії, як-то оливкова олія та прийнятні для введення шляхом ін'єкції органічні естери, як-то етилолеат. Водні носії охоплюють воду, спиртові / водні розчини, емульсії або суспензії, в тому числі сольові та буферні середовища. Парентеральні носії охоплюють розчин хлориду натрію, декстрозу Рінгера, хлорид натрію, розчин Рінгера з лактатом або жирні олії. Внутрішньовенні носії охоплюють рідкі та поживні наповнювачі, електролітні наповнювачі (наприклад, на основі глюкози Рінгера) тощо. Також ці препарати можуть містити консерванти та інші домішки, як-то, наприклад, протимікробні агенти, антиоксиданти, хелатуючі агенти, інертні гази тощо. Крім того, фармацевтична композиція за винаходом може містити білкові носії, як-то, наприклад, сироватковий альбумін або імуноглобулін, переважно людського походження. Передбачається, що фармацевтична композиція за винаходом може містити, на додачу до описаних вище сполук також додаткові біологічно активні агенти у залежності від передбачуваного застосування у фармацевтичній композиції. Такими агентами можуть бути препарати, які діють на шлунково-кишковий тракт, препарати цитостатичної дії, препарати, які запобігають гіперглікемії, препарати, які пригнічують імунологічні реакції (наприклад, кортикостероїди), препарати, які модулюють запальну реакцію, препарати, які діють на систему кровообігу та/або такі відомі у цій галузі агенти, як цитокіни.

[0114] Для аналізу дії сполуки, яка нейтралізує ГМ-КСФ, наприклад, при ревматоїдному артриті (РА), критерії оцінки можуть бути вибрані, наприклад, від фармакокінетичних показників, імуногенності та потенційної можливості поліпшення клінічних ознак та симптомів РА, виміряних з допомогою індексу оцінки DAS28, критерію ремісії та відповіді ACR20/50/70 та/або критерію відповіді EULAR, результатів MPT-дослідження запалень синовіальної оболонки та набряків кісткового мозку, а також від результатів, повідомлених пацієнтом. Критерій ACR є мірою підсумованого покращення у вигляді кількості хворобливих та опухлих суглобів, результатів шкали оцінки болю, оцінки покращення з точки зору пацієнта та лікаря та деяких лабораторних маркерів. ACR 20 описує відсоток учасників досліджень, які досягли 20 % покращення клінічних ознак та симптомів, наприклад 20 % зменшення кількості хворобливих та опухлих суглобів, а також 20 % покращення трьох інших актуальних для цієї хвороби критеріїв.

[0115] Іншою серйозною проблемою у розробці лікарських засобів, як-то фармацевтичної композиції за винаходом є передбачувана модуляція фармакокінетичних властивостей. З цієї метою встановлюють фармакокінетичний профіль потенційного лікарського препарату, тобто профіль фармакокінетичних параметрів, які впливають на здатність певного препарату до лікування даного стану. Фармакокінетичні параметри препарату, які впливають на його здатність до лікування певного захворювання охоплюють, але без обмеження: час напіввиведення, обсяг розподілу, печінковий пресистемний метаболізм та рівень зв'язування сироватки крові.

Ефективність даного лікарського засобу може залежати від кожного із зазначених вище параметрів. "Час напіввиведення" означає час, за який 50 % введеного лікарського препарату усувається з організму шляхом біологічних процесів, наприклад, екскреції, метаболізму тощо. Під "печінковим пресистемним метаболізмом" мається на увазі схильність препарату до метаболізму при першому контакті з печінкою, тобто під час його першого проходження через печінку. "Обсяг розподілу" означає ступінь утримання лікарського засобу у різних відділах організму, як-то, наприклад, у внутрішньоклітинних та позаклітинних порожнинах, тканинах та органах тощо та розподіл препарату у цих відділах. "Рівень зв'язування сироватки крові" означає здатність лікарського препарату взаємодіяти та зв'язуватися з сироватковим білками крові, як-то альбуміном, що веде до зменшення або втрати біологічної активності лікарського препарату.

[0116] Фармакокінетичні параметри також охоплюють біонакопичування, час затримки (Tlag), величину Tmax, швидкості абсорбції та/або величину Cmax для даної кількості введеного лікарського препарату. "Біонакопичування" має відношення до кількості лікарського препарату у кровоносній системі. "Час затримки" означає затримку у часі між введенням лікарського

препарату та його визначенням та вимірюванням у крові або плазмі. "Tmax" є часом, після якого спостерігають досягнення максимальної концентрації лікарського препарату у крові, абсорбція є рухом лікарського препарату від місця введення до системної циркуляції та "Cmax" є максимальною концентрацією, отриманою при застосуванні даного препарату. Час досягнення

5 необхідної для отримання біологічного ефекту концентрації лікарського препарату в крові або тканини залежить від усіх параметрів.

[0117] Як тут застосовано, термін "токсичність" має відношення до токсичних ефектів лікарського препарату, які проявляються у вигляді небажаних явищ або тяжких небажаних явищ. Ці небажані явища можуть мати відношення до втрати переносимості препарату в цілому

10 та/або до втрати місцевої переносимості після введення. Токсичність також може охоплювати викликані препаратом тератогенні та канцерогенні ефекти.

[0118] Як тут застосовано, терміни "безпечність", "безпечність in vivo" або "переносимість" стосуються введення лікарського препарату без викликання тяжких небажаних явищ безпосередньо після введення (місцева переносимість) та протягом тривалого періоду

15 застосування лікарського препарату. Оцінка "безпечності", "безпечності in vivo" або "переносимості" може бути здійснена, наприклад, з регулярними інтервалами протягом лікування та під час періоду подальшого спостереження. Вимірювання охоплюють клінічну оцінку, наприклад, проявів хвороби у тому чи іншому органі та скринінг лабораторних аномалій. Може бути проведена належна клінічна оцінка з записом/кодуванням відхилень від норми згідно

20 зі стандартами NCI-CTC та/або MedDRA. Дослідження проявів хвороб у тому чи іншому органі можуть охоплювати критерії, як-то алергічні/імунологічні, стан крові/кісткового мозку, серцеву аритмію, коагуляцію, як наведено, наприклад, у Загальному термінологічному критерії для небажаних явищ v3.0 (CTCAE). Лабораторні параметри, які можуть бути перевірені охоплюють, наприклад, гематологію, клінічну хімію, профіль коагуляції, аналіз сечі та перевірку інших видів

25 рідини організму, як-то сироватки, плазми крові, лімфи або спинномозкової рідини, ликвору тощо. Отже безпечність може бути оцінена, наприклад, шляхом фізичної перевірки, застосування способів візуалізації (тобто застосування ультразвуку, рентгенівського випромінювання, комп'ютерної томографії, магнітно-резонансної томографії (МРТ)), інших способів вимірювання з застосуванням технічних приладів (як-то електрокардіограма),

30 дослідження ознак життя, дослідження шляхом вимірювання лабораторних параметрів та запису небажаних явищ. Як тут застосовано, термін "ефективна та нетоксична доза" має відношення до прийнятої дози сполуки, яка нейтралізує ГМ-КСФ, переважно антитіла, як визначено тут, яка є достатньо високою для лікування або стабілізування інтересуючої хвороби без або суттєво без істотних токсичних ефектів. Такі ефективні та нетоксичні дози можуть бути

35 визначені, наприклад, шляхом описаних у цій галузі досліджень зі збільшенням дози та вони повинні бути нижчими, ніж доза, яка викликає тяжкі небажані явища (токсичність, яка обмежує дозу, DLT).

[0119] Композиція винаходу (іноді також позначена тут, як "вказана композиція"; "композиція" або "розчин") може переважно знаходитися у різному фізичному стані, як-то у вигляді рідкої,

40 замороженої, ліофілізованої, підсушеної шляхом заморожування або шляхом розпилення та відновленій композиції, де бажаним є рідкий та заморожений стан.

[0120] Як тут застосовано, "рідка композиція" має відношення до зазначеної композиції, яка знаходиться у вигляді рідини, що відрізняється вільним рухом молекул у складі цієї рідини, але без тенденції до відокремлення при кімнатній температурі. Рідкі композиції охоплюють водні та

45 неводні рідини та бажаними є водні композиції. Водна композиція являє собою таку композицію, у якій розчинником або головним розчинником є вода, переважно вода для ін'єкцій (WFI). Розчинення сполуки, яка нейтралізує ГМ-КСФ у композиції може бути гомогенним або гетерогенним, де бажаним є гомогенне розчинення, як описано вище.

[0121] У винаході може бути застосована будь-яка прийнятна неводна рідина, переважно

50 гідрофільна, за умови, що вона забезпечить стійкість композиції винаходу. Ілюстративні приклади прийнятої неводної рідини охоплюють гліцерин; диметилсульфоксид (ДМСО); полідиметилсилоксан (ПМС); етиленгліколь, як-то етиленгліколь, діетиленгліколь, тріетиленгліколь, поліетиленгліколь ("ПЕГ") 200, ПЕГ 300, ПЕГ і 400; та пропіленгліколі, як-то дїпропіленгліколь, трипропіленгліколь, поліпропіленгліколь ("ППГ") 425 та ППГ 725.

[0122] Як тут застосовано, "змішана водна/неводна рідка композиція" стосується рідкої композиції, яка містить суміш води, переважно WFI та додаткової рідкої композиції.

[0123] При застосуванні у цьому документі, термін "препарат" або "композиція" означає суміш сполуки, яка нейтралізує ГМ-КСФ (тобто активного лікарського компоненту/речовини) та

додаткових хімічних речовин та/або домішок, потрібних для отримання лікарського продукту,

який переважно знаходиться у рідкому стані. Препарат за винаходом містить фармацевтичну композицію.

[0124] Отримання препарату полягає у застосуванні процесу, у якому різні хімічні речовини, в тому числі активний лікарський компонент, об'єднують для отримання кінцевого лікувального продукту, як-то фармацевтичної композиції. Активний лікарський компонент препарату за винаходом є сполукою, яка нейтралізує ГМ-КСФ.

[0125] У деяких втіленнях, сполука, яка нейтралізує ГМ-КСФ та яку треба отримати є суттєво чистою та/або суттєво гомогенною (тобто суттєво вільною від забруднюючих речовин, наприклад, білків тощо, які можуть бути пов'язаними з продуктом або процесом отримання домішками). Термін "суттєво чистий" означає композицію, яка містить принаймні приблизно 80 %, переважно приблизно 90 % за вагою сполуки, переважно принаймні приблизно 95 % за вагою сполуки, більш переважніше принаймні приблизно 97 % за вагою сполуки або найбільш переважніше принаймні приблизно 98 % за вагою сполуки, переважно сполуки, яка знаходиться у мономерному стані. Термін "суттєво гомогенний" означає композицію, яка містить принаймні приблизно 99 % за вагою сполуки, переважно сполуки у мономерному стані, за винятком маси різних стабілізаторів та води у розчині.

[0126] При застосуванні у цьому документі слід розуміти, що термін "приблизно" означає, що може існувати відхилення від відповідного значення або діапазону (як-то рН, концентрації, відсотку, молярності, кількості амінокислот, часу тощо), яке може сягати до 5 %, до 10 %, до 15 % або до 20 % включно від даного значення. Наприклад, якщо композиція містить приблизно 5 мг/мл сполуки, то це означатиме, що вона може містити 4-6 мг/мл сполуки, переважно 4,25-5,75 мг/мл, більш переважно 4,5-5,5 мг/мл ще більш переважно 4,75-5,25 мг/мл, та найбільш переважніше- 5 мг/мл сполуки. Як тут застосовано, інтервал, визначений, як "від X до Y" ототожнюють з інтервалом, визначеним, як "між X та Y". Обидва інтервали зокрема охоплюють верхню та нижню межу, що означає те, що, наприклад, інтервал у "5-10 мг/мл" або "між 5 мг/мл та 10 мг/мл" охоплює концентрації у 5, 6, 7, 8, 9, та 10 мг/мл, а також будь-які проміжні значення між ними.

[0127] "Стойкою" композицією є така, у якій сполука, яка нейтралізує ГМ-КСФ по суті зберігає свою фізичну стійкість та/або хімічну стійкість та/або біологічну активність при зберіганні та/або не демонструють суттєвих ознак агрегації, преципітації, фрагментації, деградації та/або денатурації у порівнянні з контрольним зразком, переважно при візуальній перевірці кольору та/або прозорості або як було виміряно шляхом розсіювання УФ-світла або шляхом ексклюзивної хроматографії. Різні додаткові аналітичні способи вимірювання стійкості білків є прийнятними у цій галузі та огляд їх можна побачити, наприклад, у книгах Peptide and Protein Drug Delivery ("Доставка пептидів та білкових лікарських препаратів"), 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991) and Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. ("Сучасний огляд доставки лікарських препаратів")(10: 29-90 (1993)).

[0128] Як тут застосовано, термін "протягом зберігання" означає отриману композицію, яку одразу не застосовують, а скоріше за все запаковують після отримання для подальшого зберігання у рідкій формі або у замороженому стані або у висушеній формі для пізнішого відновлення у рідку або у іншу форму.

[0129] Передбачається, що сполука, яка нейтралізує ГМ-КСФ є переважно стійкою до такої міри, у якій вона суттєво не утворює агрегатів або фрагментів / продуктів деградації (наприклад, через одну або декілька зазначених вище причин) протягом зберігання та/або протягом або після заморожування/відтавання та/або під час або після напруження зсуву (викликаного, наприклад, шляхом струшування). Відповідно, переважно передбачається, що не більше, ніж 10 % сполуки, яка нейтралізує ГМ-КСФ, більш переважно не більше, ніж 8 %, більш переважніше не більше, ніж 5 % та певним переважно не більше, ніж 2 % по відношенню до кількості сполуки, яка нейтралізує ГМ-КСФ на початку зберігання або перед здійсненням одного або декількох циклів заморожування-відтавання або перед дослідженнями з застосуванням струшування буде утворювати агрегати та/або фрагменти. Ця стійкість переважно має відношення до проміжку часу, який дорівнює принаймні 1 місяць, принаймні 2 місяці або принаймні 3 місяці; переважно принаймні 4 місяці, принаймні 5 місяців або принаймні 6 місяців; більш переважно принаймні 9 місяців або принаймні 12 місяців; навіть більш переважно принаймні 18 місяців або принаймні 24 місяців; та найбільш переважніше принаймні 30 місяців або принаймні 36 місяців або принаймні 48 місяців або принаймні 54 місяці або принаймні 60 місяців. Переважні температурні умови зберігання є кімнатною температурою (приблизно 20 °C-25 °C) та більш переважніше вони дорівнюють приблизно 2-8 °C, найбільш бажаний часовий діапазон дорівнює принаймні 3 роки або навіть принаймні 4 роки. Кількість циклів заморожування-відтавання, протягом яких сполука переважно є стійкою відповідно до

наведених вище параметрів дорівнює принаймні одному циклу, переважно принаймні 2, 3 або 4 цикли, більш переважніше принаймні 5, 6 або 7 циклів, та найбільш переважніше принаймні 8, 9 або 10 циклів. Кількість днів зі струшуванням, протягом яких сполука переважно є стійкою відповідно до наведених вище параметрів (наприклад, при температурі $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, див. також

5 Приклад 12d) сягає принаймні 1 день, переважно принаймні 2, 3 або 4 дні, більш переважніше принаймні 5, 6 або 7 днів, навіть більш переважніше принаймні 8, 9, 10 або 11 днів та найбільш переважніше принаймні 12, 13 або 14 днів.

[0130] Альтернативним чином передбачається, що сполука, яка нейтралізує ГМ-КСФ є переважно стійкою до такої міри, що вона не утворює димерів, олігомерів або фрагментів. Іншими словами, стійкість сполуки, яка нейтралізує ГМ-КСФ може бути визначена згідно з відсотковим вмістом мономерного білка у розчині з низьким відсотком зруйнованого (наприклад, фрагментованого) та/або агрегованого білка. Наприклад, композиція винаходу, яка містить сполуку, що нейтралізує ГМ-КСФ, як-то антитіло може містити принаймні 90 %, більш переважніше принаймні 92 %, навіть більш переважно принаймні 95 %, певним переважно принаймні 98 %, та найбільш переважніше принаймні 99 % мономерної сполуки, яка нейтралізує ГМ-КСФ.

[0131] Під "агрегатом" мається на увазі фізична взаємодія між білковими молекулами, яка веде до утворення ковалентних або нековалентних димерів або олігомерів (тобто об'єктів з високою молекулярною масою), які можуть залишати розчин або утворювати нерозчинні агрегати, які осаджуються у цьому розчині. "Агрегати" також містять білки, піддані деградації та/або фрагментовані білки.

[0132] Як було зазначено вище, для виявлення присутності та концентрації агрегатів у композиції, що містить сполуку, яка нейтралізує ГМ-КСФ можуть бути застосовані численні різні аналітичні способи, які охоплюють, але без обмеження, наприклад, електрофорез у нативному поліакриламідному гелі (PAGE), електрофорез у поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію (SDS-PAGE), капілярний гель- електрофорез (CGE), ексклюзійну хроматографію (SEC), аналітичне ультрацентрифугування (AUC), фракціонування в потоці при наявності поля (FFF), визначення на основі розсіювання світла, дослідження швидкості седиментації, УФ-спектроскопію, диференційну скануючу калориметрію, нефелометрію; турбідиметрію,

мікроскопію, ексклюзійну високоефективну рідкісну хроматографію (SE-HPLC; ексклюзійна ВЕРХ-хроматографія), високоефективну рідкісну хроматографію зі зворотною фазою (RP-HPLC), тандемну мас-спектроскопію з іонізацією електроспреєм (ESI-MS), тандемну RP-HPLC/ESI-MS та поєднання фракціонування в потоці при наявності поля та дослідження статичного та/або динамічного розсіювання світла. Ці способи можуть бути застосовані або окремо або у комбінації. Переважно, аналітичними способами для визначення присутності та концентрацій агрегатів та/або фрагментів у композиції, яка містить сполуку, що нейтралізує ГМ-КСФ є ексклюзійна хроматографія, як-то SE-HPLC, аналітичне ультрацентрифугування та асиметричне фракціонування в потоці при наявності поля. Способом визначення біологічної активності сполуки, яка нейтралізує ГМ-КСФ є, наприклад, вимірювання її рівня зв'язування з (іmobілізованим) ГМ-КСФ (або його рецептором) з допомогою так званого поверхневого плазмонного резонансу (SPR).

[0133] Звичайна проблема композиції, яка містить білок полягає у незворотному накопиченні агрегатів з часом та внаслідок дії температури або напруження зсуву. Як правило, коли агрегати випадають в осад, вони утворюють великі частки, які легко виявити. Проте менші, нековалентні розчинні агрегати, які часто є попередниками осадження великих часток більш важко виявити та виміряти. Таким чином, способи виявлення та кількісного аналізу агрегації білка у білковій композиції повинні мати за основу тип агрегату, який треба оцінити.

[0134] Серед зазначеного вище, запропонованими способами визначення присутності та/або кількостей розчинних ковалентних агрегатів у білковій композиції є SEC/розсіювання світла, SDS-PAGE, CGE, RP-HPLC/ESI-MS, FFF та AUC. Запропонованими способами визначення присутності та/або кількостей розчинних нековалентних агрегатів у білковій композиції є SEC, PAGE, SDS-PAGE, CGE, FFF, AUC та динамічне розсіювання світла. Запропонованими способами визначення присутності та/або кількостей нерозчинних нековалентних агрегатів у білковій композиції є УФ-спектроскопія, нефелометрія; турбідиметрія, мікроскопія, AUC, асиметричне фракціонування в потоці при наявності поля та динамічне розсіювання світла.

[0135] Крім того, для композиції винаходу переважно передбачено покращене довготривале зберігання таким чином, що сполука, яка нейтралізує ГМ-КСФ зберігає стійкість протягом періоду зберігання або у рідкому або у замороженому стані, переважно у рідкій формі. Як тут застосовано, під фразою "довготривале" зберігання слід розуміти, що композицію можуть

зберігати протягом принаймні одного місяця, двох або трьох місяців або більше, шести місяців або більше, та переважно протягом одного року та більше або навіть протягом 2 років, 3 років або 4 років або 5 років та більше. Слід розуміти, що "довготривале" зберігання також означає, що фармацевтичну композицію зберігають або при температурі 2-8 °C або при кімнатній температурі, переважно при 2-8 °C. Таким чином, композиція переважно не втрачає свою біологічну активність до такої міри, як описано тут та/або не утворює агрегати в тій мірі, як описано тут, та/або містить мономеру в тій мірі, як це описано в даному документі. Тести на ці властивості наведені тут у іншому місці.

[0136] У одному аспекті винаходу, сполука, яка нейтралізує ГМ-КСФ у композиції є стійкою у рідкій формі протягом принаймні 1 місяця, 2 місяців, 3 місяців; принаймні 4 місяців, принаймні 5 місяців; принаймні 6 місяців; принаймні 12 місяців; принаймні 24 місяців; принаймні 36 місяців; принаймні 48 місяців та принаймні 60 місяців. Середні діапазони вищезазначених періодів часу також призначені бути частиною цього винаходу, як-то, наприклад, 9 місяців тощо. Крім того, також до включення призначені діапазони значень з застосуванням комбінації будь-яких вищезазначених значень у якості верхніх та/або нижніх меж цих діапазонів. Переважно, композиція є стійкою при кімнатній температурі (приблизно 20-25 °C) протягом принаймні 1 місяця та/або є стійкою при температурі приблизно у 2-8 °C протягом принаймні 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 або 12 місяців або, ще переважніше, вона є стійкою при температурі приблизно 2-8 °C протягом принаймні 2 років, принаймні 3 років, принаймні 4 років або навіть принаймні 5 років.

[0137] Іншим важливим аспектом є те, що стійкість сполуки, що нейтралізує ГМ-КСФ у композиції згідно за винаходом забезпечує її біологічну активність або активність під час зберігання та в певних умовах зберігання та особливо це стосується температури та можливих температурних змінень. Активність або ефективність, наприклад, відображається у вигляді власної нейтралізуючої спроможності сполуки (яка може бути виміряна з допомогою аналізів на клітинній основі, як описано вище) або здатності сполуки, що нейтралізує ГМ-КСФ зв'язуватися з ГМ-КСФ або з рецептором ГМ-КСФ. Афіність зв'язування можна оцінити з допомогою поверхневого плазмонного резонансу (SPR) або інших способів, які є добре відомі у цій галузі, як-то, наприклад, Віасоре або аналіз Скетчарда.

[0138] Композицію винаходу отримують шляхом додавання буфера або модифікатора тоничності до сполуки, яка, як тут описано, нейтралізує ГМ-КСФ та знаходиться, наприклад, у водному розчині. Фахівцям у цій галузі буде зрозуміло, що поєднання різних компонентів для включення до складу композиції може бути здійснено будь-яким прийнятним чином. Наприклад, буфер може бути додано спочатку, всередині та наприкінці процесу та модифікатор тоничності так само може бути додано спочатку, всередині та наприкінці процесу. Фахівцям у цій галузі також буде зрозуміло, що деякі з цих хімічних речовин в певних комбінаціях можуть бути несумісними та, відповідно, легко замінюються іншими хімічними речовинами, які мають аналогічні властивості, але є сумісними у відповідній суміші.

[0139] У бажаному аспекті винаходу композиція містить буфер. Як тут застосовано, термін "буфер" або "буферизуючий агент" стосується агентів, які підтримують значення рН у бажаному діапазоні. Буфер є водним розчином, який складається з суміші слабкої кислоти та зв'язаної з нею основи або слабкої основи та зв'язаної з нею кислоти. Він має властивість, яка полягає у тому, що при додаванні до розчину невеликої кількості сильної кислоти або основи, його рН змінюється дуже незначним чином. Буферні розчини застосовують у якості засобів для збереження майже постійних значень рН у великому діапазоні застосувань хімічних речовин. Головним чином при застосуванні буфера у композиції винаходу він переважно стабілізує сполуку, яка нейтралізує ГМ-КСФ.

[0140] Застосований тут термін "амінокислотні буфери" стосується, наприклад, амінокислотної основи, наприклад, гістидину та зв'язаної з нею солі. Прикладом амінокислотного буфера є гістидин/гістидинхлорид. Цей приклад переважно застосовано у винаході.

[0141] Бажане значення рН композиції, як тут описано, може бути вибрано з діапазонів від приблизно 4-10, переважно від приблизно 4-6 або від приблизно 5-7, ще переважніше від приблизно 5,5-6,5. Найбільш бажане значення рН приблизно або точно дорівнює 5,8. Відповідно, переважно застосовують буфер, який може зберігати значення рН у розчині у межах 5-7. Термін "приблизно" при застосуванні у контексті значення/діапазону рН переважно означає чисельне значення, яке знаходиться у діапазоні +/- 20 % від вказаного значення. Коли рН фармацевтичної композиції встановлюють на рівні фізіологічного розчину або близько нього, комфорт пацієнта при введенні досягає максимуму. Слід розуміти, що для максимізування стійкості та розчинності нейтралізуючої сполуки значення рН у окремій композиції можна за

необхідністю регулювати та, таким чином, значення рН, яке знаходиться поза фізіологічними межами, але яке переважно є прийнятним для пацієнта також знаходиться в межах обсягу цього винаходу.

[0142] Необмежені приклади буферів, які можуть бути застосовані у описаний тут композиції охоплюють гістидин, сукцинат, глюконат, цитрат, аргінін, лізин, аспарагінову кислоту, глутамінову кислоту, Tris (триметамол), біс-Tris, MOPS, ACES, TES, HEPPES, EPPS, етилендіамін, фосфорну кислоту, малеїнову кислоту / фосфат, 2-морфоліноетансульфонову кислоту (MES), фосфат, ацетат та діетаноламін.

[0143] Бажаними буферами є гістидин та ацетатний та цитратний буфери. Більш переважніше у композиції винаходу застосовують гістидиновий буфер зі значенням рН, яке переважно знаходиться у межах 5-7, більш переважніше у межах 5,5–6,5 та ще більш переважно рН дорівнює 5,8. Застосовані у втіленні винаходу буфери є добре відомими у цій галузі та їх можна отримати з допомогою відомих способів та придбати з торгівельних джерел.

[0144] У деяких втіленнях композиція додатково містить гідроксид натрію (NaOH). У окремих втіленнях композиція містить 1-200 mM NaOH або менш, ніж 50 mM NaOH, менш, ніж 40 mM NaOH, менш, ніж 35 mM NaOH, менш, ніж 30 mM NaOH, менш, ніж 25 mM NaOH, менш, ніж 20 mM NaOH або менш, ніж 15 mM NaOH, наприклад, 10 mM NaOH або менш, ніж 10 mM NaOH, як-то 5 mM NaOH або 1 mM NaOH.

[0145] На додачу до сполуки, яка нейтралізує ГМ-КСФ та буфер, композиція за винаходом також може містити інші речовини, які охоплюють, але без обмеження, стабілізуючі агенти (стабілізатори).

[0146] Відповідно, у переважному аспекті передбачено композицію, яка містить стабілізатор, який також може діяти в якості модифікатора тонічності. Термін "стабілізуючий агент" має відношення до агенту, який збільшує або іншим чином підсилює стійкість композиції, зокрема сполуки, яка нейтралізує ГМ-КСФ. Стабілізуючий агент, який є модифікатором тонічності може бути невідновлювальним цукром, цукровим спиртом або комбінацією цих сполук. Модифікатори тонічності у рідких композиціях заявленого винаходу забезпечують рівень тонічності, тобто осмолярність розчину є суттєво такою ж саме, як і рівень тонічності нормальних фізіологічних рідин, що тим самим запобігає розвитку набряків після введення або швидкому поглинанню композиції через різницю концентрацій іонів у композиції та у фізіологічних рідинах.

Звичайно природа описаної тут композиції є такою, що її осмолярність знаходиться у межах приблизно 240-470 мОсм/кг, більше переважно у межах приблизно 300-400 мОсм/кг, ще переважніше приблизно 350 мОсм/кг.

[0147] Переважно, стабілізуючий агент/модифікатор тонічності може бути одним або кількома невідновлювальними цукрами, як-то цукрозою або трегалозою або одним або кількома цукровими спиртами, як-то манітом або сорбітом, а також бажаними є комбінації невідновлюваних цукрів та цукрових спиртів. У деяких втіленнях, концентрація стабілізуючого агента / модифікатора тонічності у композиції є вибраною з наступних діапазонів, як-то 1-15 % (вага/об'єм), 2-10 % (вага/об'єм), 3-8 % (вага/об'єм), 4-6,5 % (у ваговому співвідношенні) та 4,5-6 %, (вага/об'єм) та у окремих втіленнях концентрація дорівнює приблизно 5-6 % (вага/об'єм). Переважно застосованим у композиції винаходу стабілізатором / модифікатором тонічності є сорбіт, переважно з концентрацією 5 % (вага/об'єм).

[0148] У переважному втіленні описана тут композиція не містить додаткових наповнювачів, як-то амінокислот (за виключенням випадків, коли буфер є вибраним з амінокислотного буферу, як-то гістидинового буферу) або поверхнево-активних речовин.

[0149] У менш переважних втіленнях, описана тут композиція містить додатковий наповнювач. Переважно наповнювач є вибраним з групи, яка охоплює амінокислоти, кріопротектори, ліопротектори, поверхнево-активні речовини, наповнювачі, антиоксиданти та їх комбінації.

[0150] Також до композиції винаходу можуть бути додані наповнювачі, які також позначені, як хімічні домішки, сполуки, які спільно розчиняють у розчині або співрозчинники переважно стабілізують сполуки, які нейтралізують ГМ-КСФ у розчині (а також у висушеному або замороженому стані). Переважно наповнювачі впливають на стійкість сполуки, що нейтралізує ГМ-КСФ, але також слід розуміти, що вони також можуть іншим чином впливати на фізичні, хімічні та біологічні властивості композиції. Наповнювачі є добре відомі у цій галузі та їх можна отримати з допомогою відомих способів та придбати з торгівельних джерел.

[0151] Приклади наповнювачів охоплюють, але без обмеження, цукри / поліолі, як-то: сахарозу, лактозу, гліцерин, ксиліт, сорбіт, маніт, мальтозу, інозит, трегалозу, глюкозу; полімери, як-то: сироватковий альбумін (бичачий сироватковий альбумін (BCA), людський сироватковий альбумін або людський рекомбінантний альбумін), декстран, полівінілацетат

(ПВА), гідроксипропілметилцелюлозу (ГПМЦ), поліетиленімін, желатин, полівінілпіролідон (ПВП), гідроксіетилцелюлозу (ГЕЦ), гідроксіетилкрохмаль (ГЕК); неводні розчинники, як-то багатоатомні спирти (наприклад, поліетиленгліколь, етиленгліколь та гліцерин) диметилсульфоксид (ДМСО) та диметилформамід (ДФМ);

амінокислоти, як-то: треонін, серин, пролін, аланін, валін, глютамін, метіонін, цистеїн, ізолейцин, аспарагінову кислоту, глютамінову кислоту, аргінін, гліцин, гістидин, лізин, фенілаланін, лейцин, аспарагін, триптофан та тирозин; поверхнево-активні речовини, як-то: Tween-80, Tween-20, SDS, полісорбат, поліоксиетиленовий сополимер; змішані наповнювачі, як-то: фосфат калію, ацетат натрію, сульфат амонію, сульфат магнію, сульфат натрію, триметіламін N-оксид, бетаїн, іони металів (наприклад цинку, міді, кальцію, магнію та марганцю), CHAPS, монолаурат, 2-О-бета-маногліцерат або будь-які комбінації вищезазначеного.

[0152] "Кріопротектори" охоплюють речовини, які надають стійкість замороженому білку протягом отримання, заморожування, зберігання, перевезення, розподілення, відновлення або застосування. У окремому аспекті "кріопротектори" охоплюють речовини, які захищають білок від навантажень, викликаних процесом заморожування. Кріопротектори також можуть мати ліопротекторні властивості. Необмежені приклади кріопротекторів охоплюють цукри, як-то цукрозу, глюкозу, трегалозу, маніт, сорбіт, манозу та лактозу; полімери, як-то декстран, гідроксіетилкрохмаль, полівінілпіролідон (ПВП) та поліетиленгліколь; поверхнево-активні речовини, як-то полісорбати (наприклад, PS-20 або PS-80) та амінокислоти, як-то гліцин, аргінін, лейцин та серин. Звичайно застосовують кріопротектори, які демонструють низьку токсичність у біологічних системах.

[0153] Як тут описано, дисахарид може діяти, як ліопротектор або як кріопротектор. "Ліопротектори" охоплюють речовини, які запобігають або зменшують хімічну або фізичну нестійкість білка при ліофілізації та подальшому зберіганні. У одному аспекті ліопротектор запобігає або зменшує хімічну або фізичну нестійкість білка при усуненні води з композиції під час процесу сушіння. У додатковому аспекті ліопротектор стабілізує білок, допомагаючи зберегти його належну конформацію через водневі зв'язки.

[0154] Відповідно, у одному аспекті, стабілізуючою сполукою, яка нейтралізує ГМ-КСФ протягом заморожування, як тут описано, може бути дисахарид. Оскільки захист під час замерзання може залежати від абсолютної концентрації дисахариду (Carpenter et al., Pharm. Res. (1997), 14:969-975, для максимізації стійкості можуть бути необхідними концентрації, які перевищують 5 %.

[0155] У одному втіленні до описаної тут композиції додають ліопротектор. Як тут застосовано, термін "ліопротектор" стосується агентів, які надають білку стійкості під час процесу заморожування-сушіння або зневоднення (головний та допоміжний цикли заморожування-сушіння) шляхом утворення аморфної склоподібної матриці та шляхом зв'язування з білком через водневі зв'язки з переміщенням молекул води, які потім усувають протягом процесу сушіння. Це допомагає підтримувати конформацію білка, зводять до мінімуму його деградацію протягом циклу ліофілізації та покращує довготривалу стійкість продукту. Ліопротектор додають до попередньо ліофілізованої композиції у "ліопротекторній кількості", яка означає, що у її присутності сполука, яка нейтралізує ГМ-КСФ після ліофілізації та під час зберігання буде суттєво зберігати власну фізичну та хімічну стійкість та цілісність.

[0156] Необмежені приклади ліопротекторів охоплюють цукри, як-то цукрозу або трегалозу; глутамат натрію; амінокислоти, як-то гліцин або гістидин; метиламін, як-то бетаїн; ліотропну сіль, як-то сульфат магнію; поліюлі, як-то триатомні або вищі цукрові спирти, наприклад, арабіт, ксиліт, сорбіт та маніт; суміші дикарбонових кислот; плуроніки та їх комбінації. Бажані ліопротектори, які описані вище, застосовують для стабілізації агентів. Кількість доданого до композиції ліопротектора, як правило, є такою, що не призводить до появи неприємного рівня агрегації / деградації білка у ліофілізованій білковій композиції.

[0157] Іншим наповнювачем є поверхнево-активна речовина. Термін "поверхнево-активна речовина" звичайно охоплює агенти, які захищають сполуки, що нейтралізують ГМ-КСФ від навантажень, викликаних утворенням поверхні розділу типу "повітря/розчин" та "розчин/поверхня". Наприклад, поверхнево-активні речовини можуть захищати білок від агрегації.

[0158] Приклади поверхнево-активних речовин охоплюють, без обмеження, неіонні поверхнево-активні речовини, як-то полісорбати (наприклад, полісорбат 80 або полісорбат 20); полуксамери (наприклад, полуксамер 188); тритон, додецилсульфат натрію (SDS); лаурилсульфат натрію; октилглюкозид натрію; лаурил-сульфобетаїн, міристил-сульфобетаїн, лінолеїл-сульфобетаїн, стеарил-сульфобетаїн, лаурил-саркозин, міристил-саркозин, лінолеїл-саркозин, стеарил-саркозин, лінолеїл-бетаїн, міристил-бетаїн, цетил-бетаїн, лауроамідопропіл-

бетаїн, кокамідопропіл-бетаїн, лінолеїламідопропіл-бетаїн, міристиламідопропіл-бетаїн, пальмітиламідопропіл-бетаїн, ізостеариламідопропіл-бетаїн (наприклад, лауроамідопропіл), міристиламідопропіл-бетаїн, міристиламідопропіл-бетаїн, пальмітиламідопропіл-диметиламін; натрій-метил-кокоїл або динатрій-метил-олеїл таурат; та серії Monaquat (Mona Industries, Inc., Paterson, NJ.), поліетиленгліколь, поліпропіленгліколь та сополімери етилену та поліпропіленгліколю (наприклад, плуроніки, PF68). Кількість доданої поверхнево-активної речовини є такою, що вона зберігає агрегацію білка на прийнятному рівні, як досліджено з допомогою, наприклад, ексклюзійної ВЕРХ-їхроматографії або з допомогою способу підрахунку кількості частинок в режимі світлотіні для визначення відсотку високомолекулярних (HMW) або низькомолекулярних (LMW) молекул та мінімізує утворення твердих білкових частинок у описаній тут композиції.

[0159] Додатковим бажаним наповнювачем може бути агент, який утворює об'єм препарату. Як тут застосовано, термін "агент, який утворює об'єм" охоплює агенти, які забезпечують існування структури ліофілізованого продукту без безпосередньої взаємодії з фармацевтичним продуктом. На додачу до надання продукту вигляду фармацевтично елегантної твердої маси, ці агенти також можуть надавати й корисні властивості, як-то змінення температури руйнування, забезпечення захисту від заморожування-відтавання та підвищення стійкості білка протягом тривалого терміну зберігання. Необмежені приклади таких агентів охоплюють маніт, гліцин, лактозу та цукрозу. Ці агенти можуть бути кристалічними (як-то гліцин, маніт або хлорид натрію) або аморфними (як-то декстран, гідроксіетилкрохмаль) та їх звичайно застосовують у білковій композиції у кількостях від 0.5 % до 10 %.

[0160] Переважно застосовані у композиції винаходу агенти утворення об'єму сприяють утворенню естетично прийнятної, однорідної та механічно стійкої твердої форми. Також вони також переважно сприяють утворенню структури з відкритими порами та зручності та швидкості відновлення. Також вони переважно зменшують або запобігають руйнуванню твердої форми, евтектичному плавленню або збереженню залишкової вологості. У іншому аспекті вони переважно допомагають захистити сполуки, які нейтралізують ГМ-КСФ від впливу навантажень (наприклад, фізичні та хімічні навантаження) та допомагають у збереженні активності білка.

[0161] Іншим бажаним наповнювачем може бути антиоксидант. Як тут застосовано, "антиоксидант" є молекулою, здатною зменшувати або запобігати окисленню інших молекул. Окислення є хімічною реакцією, під час якої відбувається перенесення електронів від речовини до окиснювача. Фізіологічно прийнятні антиоксиданти також можуть бути бажаними для застосування у композиції заявленого винаходу. Подібні антиоксиданти охоплюють, але без обмеження, відновлювальні агенти, аскорбінову кислоту (вітамін С), ліпоєву кислоту, мелатонін, сечову кислоту, каротини, ретиноли, токоферолі та токотрієноли, наприклад α -токоферол (вітамін Е), убіхінон (кофермент Q) тощо.

[0162] У деяких втіленнях композиція може вибірково містити консервант. "Консервантом" є сполука, яка у даному випадку може бути доданою до композиції для зменшення бактеріальної активності. Додавання консерванту може, наприклад, сприяти отриманню препарату багаторазового застосування (препарату з багаторазовим дозуванням). Приклади потенційних консервантів охоплюють хлорид октадецилдиметилбензиламонію, хлорид гексаметонію, хлорид бензалконію (суміш хлоридів алкілбензилдиметиламонію, в яких алкільні групи являють собою довголанцюгові сполуки) та хлорид бензетонію. Інші типи консервантів охоплюють ароматичні спирти, як-то фенол, бутиловий та бензиловий спирт, алкілпарабени, як-то метил або пропілпарабен, катехин, резорцин, циклогексанол, 3-пентанол та м-крезол. Найбільш бажаним консервантом у даному випадку є бензиловий спирт.

[0163] Відповідно у більш переважних втіленнях композиція винаходу є рідкою, переважно водною композицією для довготривалого зберігання, яка містить приблизно 100-200 мг/мл сполуки, що нейтралізує ГМ-КСФ та буфер, вибраний з групи, яка охоплює гістидин, ацетат та цитрат, зі значенням рН приблизно 5-7 та зазначена композиція може додатково містити один або декілька стабілізаторів/модифікаторів тоничності, як-то цукрозу, трегалозу, маніт та/або сорбіт.

[0164] У окремих бажаних втіленнях композиція винаходу є рідкою, переважно водною композицією для довготривалого зберігання, яка містить приблизно 100-200 мг/мл сполуки, що нейтралізує ГМ-КСФ, більш переважніше приблизно 150мг/мл такої сполуки та гістидиновий буфер з концентрацією приблизно 20-40 мМ, більш переважно приблизно 30 мМ та зі значенням рН приблизно 5,5-6,5, більш переважно 5,8. Додатково така композиція може містити приблизно 4 %-6 %, більш переважно приблизно 5 % (вага/об'єм) сорбіту та вибірково більш не містить інших додаткових наповнювачів, як-то поверхнево-активних речовин, амінокислот та/або NaCl.

[0165] Слід розуміти, що деякі компоненти композиції можуть бути взаємозамінними з альтернативними відомими у цій галузі компонентами. Однак будь-якому фахівцю у цій галузі також буде зрозуміло, що включення деяких компонентів буде перешкоджати застосуванню інших компонентів, концентрацій або способів отримання композиції з певних причин, які охоплюють, але без обмеження, хімічну сумісність, рН, тоничність та стійкість.

[0166] Буде корисним, щоб рідка композиція за винаходом мала низьку в'язкість, якої можна було б практично досягти та яка буде прийнятною для підшкірного введення, наприклад, у готовому до застосування пристрої. Отже, в'язкість композиції відповідно до заявленого винаходу переважно буде нижчою, ніж 20 мПа*с зі швидкістю зсуву у межах приблизно 50-1000 [1/сек.] при температурі приблизно 20 °C та більш переважно вона буде нижчою, ніж 15 мПа*с у зазначених вище умовах.

[0167] Як тут зазначено, винахід головним чином стосується відкриття того, що додавання певних речовин до композиції, що містить сполуки, які нейтралізують ГМ-КСФ може зменшити агрегацію та/або деградацію/фрагментацію цих сполук у композиції. Незалежно від того, що саме викликає агрегацію або деградацію сполуки, яка нейтралізує ГМ-КСФ у композиції, додавання речовин, як описано тут, буде зменшувати її агрегацію / фрагментацію у цій композиції. У деяких втіленнях додавання описаних речовин зменшує агрегацію / деградацію у композиції, спричинену, наприклад, зберіганням, впливом підвищених температур, світла, напруженням зсуву, наявністю поверхнево-активних речовин, впливом рН та іонних умов та будь-якими їх комбінаціями.

[0168] Знайдені авторами винаходу заходи зменшення агрегації та/або деградації/фрагментації сполук, що нейтралізують ГМ-КСФ можуть бути застосовані для сполук, отриманих, зокрема, у рідкому та у замороженому стані, отже зменшення агрегації/фрагментації переважно спостерігають у рідкій композиції. Передбачається, що зменшення агрегації/деградації також може спостерігатися при зберіганні композиції у рідкому стані для наступного застосування, при зберіганні композиції у замороженому стані та її відтаванні перед застосуванням або при її отриманні у висушеній формі, як-то шляхом ліофільного сушіння, повітряного сушіння або сушіння розпиленням для наступного відновлення до рідкого або до іншого стану перед застосуванням.

[0169] Отже, передбачається, що описану тут композицію можна буде зберігати з допомогою будь-якого відомого фахівцям у цій галузі способу. Необмежені приклади охоплюють охолодження, заморожування, ліофілізацію та сушіння розпиленням препарату та бажаним є зберігання у охолодженому стані.

[0170] У деяких випадках білкову композицію заморожують для зберігання. Відповідним чином бажано, щоб ця композиція була відносно стійкою у таких умовах, в тому числі, щоб вона зберігала свою стійкість під час циклів заморожування-відтавання. Один спосіб визначення такої прийнятності композиції полягає у застосуванні до зразка препарату принаймні одного, наприклад, одного, трьох, п'яти, семи та до десяти циклів заморожування та відтавання (наприклад, заморожування при приблизно -80 °C ± 10 °C протягом ночі та швидкого відтавання при кімнатній температурі або повільне відтавання у льоді, наприклад протягом 6 год.) з визначенням кількості низькомолекулярних (LMW) та/або високомолекулярних (HMW) компонентів, які накопичуються після циклів заморожування-відтавання та порівнянням їх з кількістю LMW або HMW компонентів, присутніх у зразку перед процедурою заморожування-відтавання. Зростання кількості LMW або HMW компонентів вказує на зниження під час зберігання стійкості білка, який є частиною композиції. Також для визначення наявності LMW або HMW компонентів може бути застосована ексклюзійна ВЕРХ-хроматографія (SE-HPLC).

[0171] Переважно білкова композиція може зберігатися у рідкому стані. Відповідно, як тут описано, бажаним є, щоб рідка композиція зберігала стійкість у таких умовах, в тому числі з різними температурами. Наприклад, один спосіб визначення прийнятності композиції полягає у зберіганні зразків цієї композиції при різних температурах (як-то 2-8 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C, та 50 °C) та у перевірці кількості HMW та/або LMW компонентів, які з часом накопичуються. Чим будуть менше ці кількості HMW та/або LMW компонентів, тим будуть кращі умови зберігання композиції. Додатково також можна піддати перевірці профіль заряду білка з допомогою катіонообмінної ВЕРХ-хроматографії (CEX-HPLC). Альтернативним чином композиції також можна зберігати після ліофілізації. Крім того, дуже бажаною є стійкість композиції при механічних пошкодженнях. Одним способом визначення прийнятності композиції є її струшування у відповідному резервуарі, закріпленому на мішалці, наприклад, на вертикальній мішалці при бажаній температурі (як-то 2-8 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C та 50 °C, переважно +5 °C ± 3 °C). Цей резервуар з композицією (наприклад, флакон) може зберігатися на мішалці протягом бажаного часу, наприклад до 14 днів або ще довше для

його порівняння з контролем, який зберігають при тій самій температурі без струшування. Збирання даних може бути проведено, наприклад, через 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14 та 14 днів. Кількість низькомолекулярних (LMW) компонентів та/або високомолекулярних (HMW) компонентів, які накопичуються після зберігання зі струшуванням може бути визначено та

5 порівняно з кількістю LMW компонентів або HMW компонентів, присутніх у зразку, який не струшували. Зростання кількості LMW або HMW компонентів свідчить про зниження стійкості білка, який зберігали у якості частини зазначеної композиції. Також для визначення наявності LMW та HMW компонентів може бути застосована ексклюзивна ВЕРХ-хроматографія (SE-HPLC).

[0172] У деяких випадках композиція є висушеною шляхом розпилення перед зберіганням.

10 Для такого сушіння рідку композицію розпилюють у присутності потоку сухого газу. З потоком цього газу з крапель композиції усувають воду, що веде до отримання висушених частинок лікарської композиції. Також композиція може містити наповнювачі, призначені для (i) захисту білка протягом процесу зневоднення під час сушіння розпиленням, (ii) захисту білка протягом зберігання після сушіння розпиленням, та/або (iii) для надання розчину властивостей,

15 прийнятних для аерозолізації. Цей спосіб є подібним до описаного вище способу заморожування за виключенням того, що у цьому разі зразки композиції замість заморожування піддають сушінню шляхом розпилення, відновлюють у розріджувачі та відновлену композицію перевіряють на наявність LMW та/або HMW компонентів. Зростання кількості LMW або HMW компонентів у висушеному шляхом розпилення зразку порівняно з відповідним зразком

20 неліофілізованої композиції свідчить про зниження стійкості зразка, висушеного шляхом розпилення.

[0173] Термін "ліофілізований" або "висушений шляхом заморожування" стосується стану речовини, підданої процедурі сушіння, як-то ліофілізації, при якій повинно бути усунуто принаймні 90 % переважно 95 % та більш переважніше 98 % вологості. Відповідно, як тут

25 застосовано, термін "ліофілізація", має відношення до процесу, шляхом якого матеріал для сушіння спочатку заморожують з наступним усуненням льоду або замороженого розчинника шляхом сублімаційного сушіння у вакуумному середовищі. Для підсилення стійкості ліофілізованого продукту при зберіганні, до складу композицій, які потрібно ліофілізувати може бути додано наповнювач (наприклад, ліопротектор). Як тут застосовано, термін "відновлена

30 композиція" має відношення до композиції, отриманої шляхом розчинення ліофілізованої білкової композиції у розріджувачі таким чином, що сполука, яка нейтралізує ГМ-КСФ є диспергованою у розріджувачі.

[0174] Як тут застосовано, термін "розріджувач" має відношення до речовини, яка є фармацевтично прийнятною (тобто безпечною та нетоксичною для людини) та є корисною для

35 отримання рідкого препарату, як-то композиції, відновленої після ліофілізації. Необмежені приклади розріджувачів охоплюють стерильну воду, бактеріостатичну воду для ін'єкцій (BWF1), буферизований до прийнятного значення рН розчин (наприклад, фосфатно-сольовий буфер), стерильний фізіологічний розчин, розчин Рингера, розчин декстрози або водні розчини солей та/або буферів.

40 [0175] У іншому аспекті винаходу передбачено композицію для терапевтичного застосування. Відповідно, винаходом передбачено фармацевтичну композицію (або лікарський препарат), що містить описану тут композицію.

[0176] У іншому втіленні винаходом передбачено спосіб лікування суб'єкта, який полягає у введенні терапевтично ефективної кількості описаного тут препарату суб'єкту, який має хворобу

45 чи розлад, який можна з успіхом лікувати з допомогою композиції, що нейтралізує ГМ-КСФ.

[0177] Переважно, описана тут композиція призначена для застосування у профілактиці та/або у лікуванні захворювання, якого можна збут запобігти та/або лікувати та/або стан якого можна покращити з допомогою композиції, що нейтралізує ГМ-КСФ.

[0178] Термін "суб'єкт" є призначеним охоплювати живі організми. Приклади суб'єктів охоплюють ссавців, наприклад, людину, корів, коней, свиней, овець, кіз, кішок, мишей, кролів, щурів та трансгенних тварин. У переважних втіленнях винаходу суб'єкт є людиною.

[0179] Термін "ефективна доза" або "ефективне дозування" визначено, як кількість, якої буде достатньо для досягнення або принаймні для часткового досягнення бажаного ефекту. Термін "терапевтично ефективна доза" визначено, як кількість, якої буде достатньо для лікування або

55 принаймні для часткової затримки розвитку хвороби та її ускладнень у пацієнта, який страждає від цієї хвороби. Кількості, ефективні для такого застосування будуть залежати від тяжкості захворювання та загального стану імунної системи пацієнта. Термін "пацієнт" охоплює людину та інших ссавців, які отримують або профілактичне або терапевтичне лікування...

[0180] Прийнятне дозування або терапевтично ефективна кількість препарату буде

60 залежати від стану, який треба лікувати, тяжкості стану перед початком терапевтичного

лікування, історії хвороби пацієнта та реакції на відповідний терапевтичний агент. Належна доза також може бути скоригована відповідно до рішення лікаря таким чином, щоб її можна було вводити пацієнтові одноразово або у вигляді серії введень. Фармацевтична композиція може бути введена у вигляді єдиного терапевтичного засобу або у поєднанні з додатковими видами терапії у разі необхідності.

[0181] Фармацевтичні композиції заявленого винаходу є особливо корисними для парентерального введення, тобто для підшкірного, внутрішньом'язового, внутрішньовенного, внутрисуглобного та/або внутрисинавіального введення та бажаним шляхом введення композиції є підшкірне введення. Парентеральне введення може бути здійснено шляхом болюсної ін'єкції або безперервної інфузії.

[0182] Фармацевтичні композиції для ін'єкції можуть бути присутніми у вигляді стандартних лікарських форм, наприклад, у ампулах або у багатодозових контейнерах з додаванням консерванту. Крім того, фармацевтичні композиції заявленого винаходу є прийнятними для введення з застосуванням численних сучасних засобів доставки ліків, як-то засіб Inject-Ease®, Genject, ін'єкторні ручки, як-то Genen та безголкові засоби, як-то MediJector та BioJector. Також ці фармацевтичні композиції можуть бути пристосовані до нещодавно відкритих способів введення. Див., також Langer, 1990, Science, 249: 1527-1533.

[0183] Ліофілізовані фармацевтичні композиції переважно можуть бути поміщені у флакони з активним інгредієнтом. У одному втіленні фармацевтичні композиції також додатково містять розчин для відновлення.

[0184] Фармацевтична композиція також може містити додаткові фармацевтично прийнятні компоненти. До складу описаної тут білкової композиції також можуть бути включені інші фармацевтично прийнятні носії, наповнювачі або стабілізатори, як-то сполуки, описані у Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980), за умови, що вони не будуть чинити негативного впливу на бажані характеристики препарату. Як тут застосовано, "фармацевтично прийнятний носій" має відношення до будь-яких та всіх розчинників, дисперсійних середовищ, видів покриття, антибактеріальних та протигрибкових агентів, ізотонічних агентів та агентів затримання абсорбції за умови, що вони є сумісними з фармацевтичним застосуванням. Застосування таких середовищ та агентів для фармацевтично активних речовин є добре відомим у цій галузі. Прийнятні носії, наповнювачі або стабілізатори є нетоксичними для реципієнтів у застосованих дозуваннях та концентраціях та охоплюють модифікатори тонічності; додаткові буферизуючі агенти; консерванти; спів-розчинники; антиоксиданти, в тому числі аскорбінову кислоту та метіонін; хелатуючі агенти, як-то ЕДТА; комплекси металів (наприклад, Zn-протеїнові комплекси); біорозкладані полімери, такі як поліестери; солеутворюючі протиіони, як-то натрій, багатоатомні цукрові спирти; амінокислоти, як-то аланін, гліцин, аспарагін, 2-фенілаланін та треонін; цукри або цукрові спирти, як-то лактит, стахіоза, манноза, сорбоза, ксилітоза, рибітоза, мівіт, міонізитога, міонізитога, галактоза, галактит, гліцерин, цикліти (наприклад, інозит), поліетилеогліколь; сірковмісні відновлюючі агенти, як-то глутатіон, тіоктова кислота, тіогліколят натрію, тіогліцерин, [альфа]-монотіогліцерин, тіосульфат натрію; низькомолекулярні білки, як-то людський сироватковий альбумін, бичачий сироватковий альбумін, желатин або інші імуноглобуліни та гідрофільні полімери, як-то полівінілпіролідон.

[0185] Описані тут композиції є корисними у якості фармацевтичних засобів для лікування та/або запобігання та/або ослаблення захворювання або розладу у пацієнта, який того потребує. Термін "лікування" має відношення як до терапевтичного лікування, так і до профілактичних або попереджувальних заходів. Лікування полягає у застосуванні або у введенні лікарського препарату у організм, виділену тканину або клітину пацієнта, який страждає на хворобу/розлад, має симптом захворювання/розладу або має схильність до цієї хвороби/розладу, з метою лікування, зцілення, полегшення, зменшення, змінення, усунення, поліпшення, покращення або впливу на цю хворобу, симптом хвороби або з метою попередження розвитку хвороби.

[0186] Пацієнти, які "потребують лікування" охоплюють осіб, які вже мають розлад, а також осіб, в яких може бути попереджено розвиток цього розладу. Термін "розлад" означає будь-який стан, який отримує користь від лікування описаною тут білковою композицією та охоплює хронічні та гострі розлади або захворювання, включаючи такі патологічні стани, які привертають увагу до зазначеного розладу. Необмежені приклади розладів, які у даному разі підлягають лікуванню охоплюють запальні та автоімунні розлади, в тому числі переважно алергічні та псориатичні розлади, розлади, пов'язані з артритом та бронхіальною астмою, як-то артрит, ревматоїдний артрит (РА), автоімунний енцефаліт, псоріаз, розсіяний склероз, легеневі хвороби, як-то бронхіальну астму, хронічну обструктивну хворобу легень (ХОЗЛ), гострий респіраторний дистрес-синдром (ГРДС); хворобу Крона, синдром Хамена-Річа (ІРФ), запальне

захворювання кишечника (IBD), увеїт, дегенерацію жовтої плями, коліт, Валлерову дегенерацію, антифосфоліпідний синдром (АФС), гострий коронарний синдром, рестеноз, атеросклероз, рецидивуючий поліхондрит (RP), гострий чи хронічний гепатит, невдале вживання ортопедичних імплантатів, гломерулонефрит, вовчак, атопічний дерматит та біль, викликаний запаленням, артритом або остеоартритом.

[0187] Алергічний розлад є будь-яким розладом, спричиненим алергією або алергічною реакцією. Алергія є гіперчутливим розладом імунної системи, який виникає, коли імунна система суб'єкта реагує або занадто сильно реагує на звичайно нешкідливі сторонні речовини (алергени), як-то продукти харчування, пилок, цвіль, домашній пил, вовна тварин, пилові кліщі.

[0188] Псоріаз є автоімунною хворобою, яка здебільшого уражає шкіру. При псоріазі цикл росту клітин шкіри прискорюється завдяки помилковим сигналам з імунної системи. Існує п'ять типів псоріазу: бляшкоподібний, краплеподібний, зворотній, гнійничковий та еритродермічний. Найбільш поширеною формою є бляшкоподібний псоріаз, який звичайно можна побачити у вигляді лускатих плям червоних та білих відтінків, які з'являються на верхньому першому шарі епідермісу (шкіри), хоча деякі пацієнти взагалі не мають дерматологічних ознак або симптомів цієї хвороби. Цей розлад є хронічним повторюваним станом, який змінюється в залежності від тяжкості від незначних локалізованих плям до повного покриття всього тіла. Також часто виникає ураження нігтів на пальцях рук та ніг (псоріатична дистрофія нігтів, що також може розглядатися, як окрема ознака цієї хвороби. Псоріаз також може викликати запалення суглобів, відоме, як псоріатичний артрит.

[0189] Артрит є однією з форм розладу, який полягає у запаленні одного або декількох суглобів. Існує більш, ніж 100 різних форм артриту та найбільш поширеним з них є остеоартрит (дегенеративне захворювання суглобів), який виникає внаслідок травми або інфекції суглоба або через вікові змінення. Іншими формами артриту є ревматоїдний артрит, псоріатичний артрит та інші споріднені автоімунні захворювання. Септичний артрит виникає через інфекцію суглоба.

[0190] Бронхіальна астма є поширеним хронічним запальним захворюванням дихальних шляхів, до якого залучено багато клітин та клітинних елементів. Ця хвороба пов'язана з гіперчутливістю дихальних шляхів, що призводить до повторюючихся випадків свистячих хрипів, кашлю, відчуття стиснення в грудях та затрудненого дихання. Ці епізоди звичайно пов'язані з розповсюдженою, але мінливою обструкцією дихальних шляхів у легенях, яка при лікуванні часто має оборотний або спонтанний характер. Бронхіальна астма може бути класифікована відповідно до частоти симптомів, обсягу форсованого видиху за одну секунду та максимальної швидкості видиху. Також вона може бути класифікована, як атопічна (зовнішня) або неатопічна (внутрішня).

[0191] На додачу до сполук, нейтралізуючих ГМ-КСФ, фармацевтичні композиції за винаходом можуть містити додаткові терапевтично або біологічно активні агенти, наприклад, терапевтичні фактори, які є корисними у лікуванні при певних показаннях, як-то у лікуванні остеоартриту (наприклад, один або декілька пригнічувачів, що руйнують суглобовий хрящ або синовіальні компоненти, вибрані з, але без обмеження, анти-металопротеїназ, циклінових сполук, цитокінових антагоністів, кортикостероїдів, TNF-пригнічувачів, IL-пригнічувачів, анти-ангіогенних речовин, пригнічувачів агреганази, пригнічувачів кінази p38, пригнічувачів апоптозу, пригнічувачів гіалуронідази та пригнічувачів протеолітичних ферментів. Також частиною композиції можуть бути фактори, які контролюють запалення, в тому числі інфіксимаб, етанерцепт, адалімулаб, нерелімонмаб, лернерцепт тощо або їх комбінації. Також передбачено, що фармацевтична композиція може містити компоненти позаклітинного матриксу, як-то гіалуронової кислоти або її похідних, включаючи солі, внутрішній естер та сульфатовані похідні, переважно неповний естер гіалуронової кислоти.

[0192] У іншому втіленні заявлений винахід стосується набору (або виробу) або контейнеру, що містить композицію винаходу, яка переважно може знаходитися у рідкому стані. Однак, альтернативним чином, композиція винаходу може знаходитися у ліофілізованому стані, а також може бути замороженою або висушеною шляхом заморожування або розпилення. Відповідно, якщо композиція знаходиться у іншому, ніж рідкій, стані, то вона може бути отриманою практикуючим фахівцем у вигляді (рідкої) водної фармацевтичної композиції. Наприклад, композиція може бути ліофілізованою та потім повинна бути відновленою. Відповідно, набір може додатково містити засіб для відтворення замороженої, ліофілізованої, висушеної шляхом сублімаційного сушіння або розпилення композиції та/або засоби для розведення композиції та/або засоби для введення препарату або фармацевтичної композиції, як-то, відповідно, шприц, помпа, інфузійна помпа, голки тощо. Набір може містити один або більше флаконів, які

містять композицію винаходу. Також до комплекту можуть бути додані інструкції по застосуванню.

[0193] Таким чином, передбачено виріб, який містить описану тут композицію та переважно містить інструкції щодо її застосування. Також цей виріб містить контейнер, прийнятний для розміщення композиції. Прийнятні контейнери охоплюють, але без обмеження, пляшки, флакони (наприклад, двокамерні флакони), шприци (наприклад, одно- або двокамерні шприци), пробірки, небулайзери, інгалятори (наприклад, дозовані інгалятори або порошкові інгалятори) або запасні частини. Контейнер може бути зроблено з різних матеріалів, як-то скло, метал або пластик (наприклад, полікарбонат, полістирол, поліпропілен, поліолефін). Контейнер, який містить композицію також може містити на своїй поверхні або прикріплену до нього етикетку, у якій можуть бути наведені інструкції по відновленню та/або застосуванню. Також на етикетці може бути зазначено, що препарат є корисним або призначеним для підшкірного введення. Контейнер, який містить композицію може бути флаконом багаторазового застосування, прийнятним для повторних застосувань композиції (наприклад, флаконом, розрахованим на 2-6 застосувань). Виріб може додатково містити другий контейнер, що містить прийнятний розчинник (наприклад, воду для ін'єкцій, 0,9 % NaCl, бактеріостатичну воду для ін'єкцій, фосфатно-сольовий буфер). Якщо виріб містить ліофілізований варіант сполуки композиції, яка нейтралізує ГМ-КСФ, то змішування розріджувача з ліофілізованою композицією забезпечить наявність бажаної кінцевої концентрації білка у відновленому препараті. Також виріб може додатково містити інші бажані з комерційної та споживчої точки зору матеріали, включаючи інші буфери, розріджувачі, фільтри, голки, шприци та вкладиші з інструкціями по застосуванню.

[0194] Також винаходом передбачені пристрої, які можуть бути застосовані для доставки композиції винаходу. Приклади таких пристроїв охоплюють, але без обмеження, шприц, шприц-ручку, імплантат, безголковий пристрій для ін'єкцій, інгалятор та пластир.

[0195] Додатково винахід ілюстровано шляхом Фігур та Прикладів, які є суто ілюстративними та не повинні тлумачитися у якості обмеження обсягу заявленого винаходу.

Стислий опис фігур.

Фіг. 1: Вплив часу зберігання, температури зберігання та концентрації білка на кількість мономерів анти-ГМ-КСФ антитіл.

Фіг. 2: Діаграма Парето стандартизованого ефекту з осмоляльністю [мОсм/кг] у якості змінної.

Наступні пункти є характерною ознакою заявленого винаходу:

1. Композиція, яка містить сполуку, що нейтралізує ГМ-КСФ з концентрацією принаймні приблизно 20 мг/мл, модифікатор тоничності та буфер, у якому ця композиція є стійкою.

2. Композиція за п.1, у якій сполука, що нейтралізує ГМ-КСФ є присутньою з концентрацією принаймні приблизно 50мг/мл, модифікатор тоничності є присутнім з концентрацією приблизно 1 % - 15 % (вага/об'єм) та буфер є присутнім з концентрацією приблизно 10-50 мМ.

3. Композиція за п.1 або 2, у якій модифікатор тоничності є вибраним з маніту, сорбіту, цукрози та/або трегалози.

4. Композиція за будь-яким з пп. 1-3, у якому буфер є вибраним з гістидинового, ацетатного та/або цитратного буферу.

5. Композиція за будь-яким з пп. 1-4, у якій сполука, що нейтралізує ГМ-КСФ є присутньою з концентрацією принаймні приблизно 100 мг/мл та меншою, ніж приблизно 200 мг/мл, модифікатор тоничності є присутнім з концентрацією приблизно 3 % - 7 % (вага/об'єм) та буфер є присутнім з концентрацією приблизно 20 мМ - 40 мМ.

6. Композиція за будь-яким з пп. 1-5, у якій рН знаходиться у межах приблизно 5-7.

7. Композиція за будь-яким з пп. 1-6, у якій модифікатором тоничності є сорбіт та буфером є гістидиновий буфер.

8. Композиція за будь-яким з пп. 1-6, яка є вільною від поверхнево-активних речовин або амінокислот.

9. Композиція за будь-яким з пп. 4-7, яка є вільною від поверхнево-активних речовин або додаткових амінокислот.

10. Композиція за будь-яким з пп. 1-9, яка є суттєво позбавленою хлориду натрію.

11. Композиція за будь-яким з пп. 1-10, яка є вільною від будь-якого додаткового наповнювача.

12. Композиція за будь-яким з пп. 1-11, у якій сполука, що нейтралізує ГМ-КСФ є вибраної з групи, яка охоплює поліпептид, пептидоміметик, нуклеїнову кислоту та малу молекулу.

13. Композиція за п. 12, у якій поліпептид є антитілом або його функціональним фрагментом зв'язування з ГМ-КСФ або з рецептором ГМ-КСФ.

14. Композиція за п. 13, у якій антитіло або його функціональний фрагмент є моноклональним антитілом людини або його функціональним фрагментом.

15. Композиція за п. 13 або 14, у якій антитіло є антитілом IgG, IgG1 або IgG4.

16. Композиція за будь-яким з пп. 13-15, у якій антитіло або його функціональний фрагмент зв'язується з епітопом ГМ-КСФ, епітопом, який переважно містить амінокислоти 23-27 (RRLN) та/або амінокислоти 65-77 (GLR/QGSLTKLKGPL).

17. Композиція за п. 16, у якій зазначений епітоп додатково містить:

(i) амінокислоти 28-31 (LSRD);

(ii) амінокислоти 32-33 (TA) та/або

(iii) амінокислоти 21-22 (EA).

18. Композиція за п. 16 або 17, у якій зазначений епітоп є переривчастим епітопом.

19. Композиція за будь-яким з пп. 13-18, у якій зазначене антитіло або його функціональний фрагмент містить у власній змінній ділянці важкого ланцюга ділянку CDR3, яка містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка охоплює будь-які послідовності, позначені, як SEQ ID №№ 1-13 та 56.

20. Композиція за п. 19, у якій будь-які зазначені послідовності ділянки CDR3 змінної ділянки важкого ланцюга послідовності існують у змінній ділянці важкого ланцюга разом з ділянкою CDR1 змінної ділянки важкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, позначену, як SEQ ID № 14 та з ділянкою CDR2 змінної ділянки важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність, позначену, як SEQ ID № 15.

21. Композиція за будь-яким з пп. 13-20, у якій вказане антитіло або його функціональний фрагмент містить у власній змінній ділянці легкого ланцюга ділянку CDR1, що містить амінокислотну послідовність, позначену, як SEQ ID № 16, ділянку CDR2, що містить амінокислотну послідовність, позначену, як SEQ ID № 17 та ділянку CDR3, що містить амінокислотну послідовність, позначену, як SEQ ID № 18.

22. Композиція за будь-яким з пп. 13-21, у якій вказане антитіло або його функціональний фрагмент містить у власній змінній ділянці легкого ланцюга амінокислотну послідовність, позначену будь-яким з номерів SEQ ID №№ 19, 54 та 55.

23. Композиція за будь-яким з пп. 13-22, у якій вказане антитіло або його функціональний фрагмент містить у власній змінній ділянці важкого ланцюга амінокислотну послідовність, позначену будь-яким з номерів SEQ ID №№ 20-33, 52 та 53.

24. Композиція за будь-яким з пп. 13-23, у якій вказане антитіло або його функціональний фрагмент містить у власній змінній ділянці легкого ланцюга ділянку CDR1, що містить амінокислотну послідовність, позначену, як SEQ ID № 16, ділянку CDR2, що містить амінокислотну послідовність, позначену, як SEQ ID № 17 та ділянку CDR3, що містить амінокислотну послідовність, позначену, як SEQ ID № 18; та містить у власній змінній ділянці важкого ланцюга ділянку CDR1, що містить амінокислотну послідовність, позначену, як SEQ ID № 14, ділянку CDR2, що містить амінокислотну послідовність, позначену, як SEQ ID № 15 та ділянку CDR3, що містить амінокислотну послідовність, позначену будь-яким з номерів SEQ ID №№ 1-13 та 56.

25. Композиція за будь-яким з пп. 13-24, у якій вказане антитіло або його функціональний фрагмент містить у власній змінній ділянці легкого ланцюга ділянку CDR1, що містить амінокислотну послідовність, позначену, як SEQ ID № 16, ділянку CDR2, що містить амінокислотну послідовність, позначену, як SEQ ID № 17 та ділянку CDR3, що містить амінокислотну послідовність, позначену, як SEQ ID № 18; та містить у власній змінній ділянці важкого ланцюга ділянку CDR1, що містить амінокислотну послідовність, позначену, як SEQ ID № 14, ділянку CDR2, що містить амінокислотну послідовність, позначену, як SEQ ID № 15 та ділянку CDR3, що містить амінокислотну послідовність, позначену, як SEQ ID № 2.

26. Композиція за будь-яким з пп. 13-25, у якій вказане антитіло або його функціональний фрагмент містить амінокислотну послідовність легкого ланцюга, позначену, як SEQ ID № 34 та амінокислотну послідовність важкого ланцюга, вибрану з групи, яка охоплює послідовності, позначені будь-яким з номерів SEQ ID №№ 35-48.

27. Композиція за будь-яким з пп. 13-26, у якій вказане антитіло або його функціональний фрагмент містить амінокислотну послідовність, яка має принаймні 70 % тотожності до відповідної амінокислотної послідовності, позначеної будь-яким з номерів SEQ ID №№ 1-48 та 52-56, переважно до відповідної амінокислотної послідовності, позначеної будь-яким з номерів SEQ ID №№ 1-18 та 56 та/або до амінокислотної послідовності каркасних ділянок у межах амінокислотної послідовності, позначеної будь-яким з номерів SEQ ID №№ 19-48 та 52-55.

28. Композиція за будь-яким з попередніх пунктів, яка містить

i) приблизно 100-180 мг/мл сполуки, що нейтралізує ГМ-КСФ,

- ii) приблизно 5 % (вага/об'єм) сорбіту,
- iii) приблизно 30 мМ L-гістидину та
- iv) має рН приблизно 5.8.

29. Композиція за п. 28, яка містить приблизно 150 мг/мл сполуки, що нейтралізує ГМ-КСФ.

30. Композиція за будь-яким з попередніх пунктів, яка є рідкою, переважно водною.

31. Композиція за будь-яким з попередніх пунктів, яка є стійкою протягом принаймні 24 місяців при температурі приблизно 2-8 °С або принаймні 28 днів при кімнатній температурі.

32. Композиція за будь-яким з попередніх пунктів для застосування у терапії.

33. Композиція за будь-яким з попередніх пунктів, яка є призначеною для внутрішньовенного та/або підшкірного введення.

34. Композиція за будь-яким з попередніх пунктів для застосування у лікуванні запальних та аутоімунних розладів, переважно включаючи алергічні та псоріатичні розлади, а також розлади, пов'язані з артритом та бронхіальною астмою.

35. Набір, який містить композицію за будь-яким з попередніх пунктів.

[0196] Слід розуміти, що описані тут винаходи не обмежені конкретною методологією, протоколами, або реагентами, які в силу цього можуть змінюватися. Наведені тут обговорення та приклади надані виключно з метою опису певних втілень та не призначені для обмеження обсягу цього винаходу, визначеного виключно формулою винаходу. Наступні приклади ілюструють даний винахід.

Приклад 1: Матеріал.

У наступних прикладах були застосовані моноклональні антитіла IgG1 людини (надалі позначено, як "антитіло"), які зв'язуються з ГМ-КСФ людини та нейтралізують його з високою спорідненістю та специфічністю. Ці антитіла також описані у WO 2006/111353 та їх отримання у Прикладі 2 WO 2006/111353. Більше докладно кажучи, цей тип антитіл містить легколанцюгові та важколанцюгові послідовності CDR, позначені, як SEQ ID №№ 16, 17, 18, 14, 15 та 2. Ці послідовності CDR знаходяться у складі змінного домену важкого та легкого ланцюга та відповідно показані у вигляді послідовностей SEQ ID №№ 34 та 35. У численних прозапальних та аутоімунних захворюваннях людини відбувається аномальне надлишкове продукування білка ГМ-КСФ та було показано, що додавання рекомбінантного ГМ-КСФ веде до загострення цих захворювань. Можливі хворобливі показання до лікування з застосуванням антитіл, які нейтралізують ГМ-КСФ охоплюють ревматоїдний артрит (РА), бронхіальну астму та інші форми легеневих запалень, розсіяний склероз (МС) та псоріаз.

Зазначені антитіла були отримані у біореакторі з застосуванням безсироваткового та безбілкового середовища. Інокулюм для ферментеру було отримано з одиничного флакону з клоном, який продукував антитіла. По закінченню процесу ферментації, середовище, яке містило отримані шляхом секреції антитіла піддали обробці шляхом фільтрації для відділення клітин та дебрису з супернатанту. Очищення отриманого середовища здійснювали на основі загальноприйнятих хроматографічних способів зменшення вмісту білків клітини-хазяїна, ДНК та потенційних вірусів. Додатковою частиною наступного процесу був загальний етап інактивації вірусів. Також для отримання композиції складовою частиною процесу була стадія концентрування та заміни буфера.

Приклад 2: Способи перевірки.

Для визначення рівня агрегації антитіл було застосовано ексклюзивну ВЕРХ-хроматографію (SE-HPLC) (програмне забезпечення Agilent 1100 Chemstation; колонка Tosoh Biosep TSKgel G4000SWXL). Кількісний аналіз результатів, отриманих шляхом SE-HPLC здійснювали шляхом дев'ятиточкової перевірки інтервалу значень, з допомогою якої були визначені та перевірені точність (шість повторних ін'єкцій) та лінійність (потрійні стандартні криві). Всі аналізи проводили з застосуванням 100 мМ KH_2PO_4 , 200 мМ Na_2SO_4 , рН 6.6 у якості рухливого буфера.

Для визначення рівня зв'язувальної активності антитіл до імобілізованого ГМ-КСФ було застосовано спосіб поверхневого плазмонного резонансу (SPR). (Biacore 3000 / сенсорний чип CM5 / рухливий буфер HBS-EP). Кількісний аналіз результатів, отриманих шляхом поверхневого плазмонного резонансу здійснювали шляхом дев'ятиточкової перевірки інтервалу значень, з допомогою якої були визначені та перевірені точність (шість повторних ін'єкцій) та лінійність (потрійні стандартні криві).

Для визначення деградації продуктів (фрагментів) та агрегації антитіл було застосовано електрофорез в поліакриламідному гелі у присутності додецилсульфату натрію (SDS-PAGE) у відновлювальних та невідновлювальних умовах

Приклад 3: Дія рН та температурного стресу.

Ці дослідження проводили для оцінки стійкості антитіл у скринінг-буфері з низькою іонною силою (LISSB: 2 мМ гліцин, 2 мМ лимонна кислота, 2 мМ HEPES, 2 мМ MES та 2 мМ Tris) при

pH у діапазоні 3-10. Зразки антитіл зберігали у прийнятних розчинах при температурі 55 °C протягом до 14 днів. Аналіз зразків проводили у 0, 7 та 14 день досліджень (відповідно T0, T7 та T14). Результати, отримані з допомогою аналізу шляхом поверхневого плазмонного резонансу показали, що антитіла були найбільш стійкими при pH 4-7. При дослідженні шляхом ексклюзійної ВЕРХ-хроматографії було показано, що мономери антитіл були найбільш стійкими при pH 4-6 (T14). Електрофорез зразків T14 в поліакриламідному гелі у присутності додецилсульфату натрію (SDS-PAGE) у відновлювальних та невідновлювальних умовах виявив лише утворення мінімальної кількості продуктів деградації та агрегування при pH 4-6.

Приклад 4: Дія іонної сили та температурного стресу.

Ці дослідження проводили для оцінки стійкості антитіл у скринінг-буфері з низькою іонною силою (LISSB) у присутності 0, 10, 100 та 500 mM NaCl. Зразки антитіл діалізували у розчинах LISSB (pH 4.5 та pH 7.5) з додаванням NaCl до концентрації приблизно 1 мг/мл та зберігали при 55 °C протягом до 14 днів. Аналіз зразків проводили у 0, 7 та 14 день досліджень (відповідно T0, T7 та T14) з допомогою поверхневого плазмонного резонансу та ексклюзійної ВЕРХ-хроматографії.

Дослідження з допомогою поверхневого плазмонного резонансу та ексклюзійної ВЕРХ-хроматографії показали, що додавання солі погіршує стійкість антитіл та цей ефект є більш вираженим при pH 4.5, ніж при pH 7.5. Крім того, дані ексклюзійної ВЕРХ-хроматографії показали, що дестабілізація антитіл з підвищеними концентраціями солі (≥ 100 mM) при pH 4.5 головним чином веде до накопичування агрегатів антитіл. При pH 7.5 дестабілізація антитіл з підвищеними концентраціями солі (500 mM) звичайно призводила до деградації продуктів антитіл. Рівень преципітації (T7 та T14) антитіл у буфері LISSB (pH 4.5; 500 mM NaCl) був дуже високим.

Приклад 5: Вплив буферів.

Ці дослідження проводили для оцінки стійкості антитіл у різних буферах при pH 5-7. Зразки антитіл діалізували у розчинах 20 mM цитратного буферу (pH 5, 6 та 7); 20 mM фосфатного буферу (pH 6 та pH 7); 20 mM сукцинатного буферу (pH 6 та pH 7), 20 mM гістидинового буферу (pH 6 та pH 7) та 20 mM ацетатного буферу (pH 5 та pH 6) до концентрації у приблизно 1 мг/мл та зберігали при 55 °C протягом 14 днів. Аналіз зразків проводили у 0, 7 та 14 день досліджень (відповідно T0, T7 та T14) шляхом поверхневого плазмонного резонансу, ексклюзійної ВЕРХ-хроматографії та електрофорезу в поліакриламідному гелі у присутності додецилсульфату натрію (SDS-PAGE) у відновлювальних та невідновлювальних умовах.

Дослідження мономерів та агрегації, проведені з допомогою поверхневого плазмонного резонансу, ексклюзійної ВЕРХ-хроматографії та електрофорезу в поліакриламідному гелі у присутності додецилсульфату натрію (SDS-PAGE) у відновлювальних та невідновлювальних умовах показали, що антитіла були найбільш стійкими у ацетатному буфері з pH 5, гістидиновому буфері з pH 6 та у цитратному буфері з pH 5, 6 та 7 (дані T14).

Приклад 6: Вплив амінокислот.

Ці дослідження проводили для оцінки стійкості антитіл у скринінг-буфері з низькою іонною силою (LISSB) з додаванням різних амінокислот. Зразки антитіл зберігали у розчині з 250 mM відповідних амінокислот при pH 6 та при температурі 55 °C протягом 14 днів. Аналіз зразків проводили у 0, 7 та 14 день досліджень (відповідно T0, T7 та T14). Дослідження з допомогою поверхневого плазмонного резонансу показали наявність легкого стабілізуючого ефекту, особливо при додаванні глютамінової кислоти, треоніну, лізину та валіну (T14). Дані, отримані з допомогою ВЕРХ-хроматографії свідчать про наявність значного стабілізуючого ефекту глютамінової кислоти, треоніну та аланіну, що призвело до появи приблизно на 2-3 % більше неушкоджених мономерів та, відповідно, до зниження кількості агрегатів на 30 %, 31 % та 20 % порівняно до еталонного зразка без додавання будь-яких амінокислот.

Приклад 7: Вплив цукрів та поверхнево-активних речовин.

Ці дослідження проводили для оцінки стійкості антитіл у скринінг-буфері з низькою іонною силою (LISSB) з додаванням різних цукрів або поверхнево-активних речовин. Зразки антитіл діалізували у розчинах буферу LISSB, pH 6.0 до концентрації приблизно 1 мг/мл з додаванням 6 % (вага/об'єм) цукрів (D-маніт, D-сорбіт, цукроз, D-маноза, D-мальтоза, D-трегалоза, D-глюкоза), 0.05 % (у об'ємному співвідношенні) Твеен 20 або 0.02 % (у об'ємному співвідношенні) Твеен 80 та зберігали при 55 °C протягом 14 днів. Аналіз зразків проводили у 0, 7 та 14 день досліджень (відповідно T0, T7 та T14) шляхом поверхневого плазмонного резонансу, ексклюзійної ВЕРХ-хроматографії та електрофорезу в поліакриламідному гелі у присутності додецилсульфату натрію (SDS-PAGE) у відновлювальних та невідновлювальних умовах.

Дослідження з допомогою поверхневого плазмонного резонансу (SPR) та ВЕРХ-хроматографії (HPLC) показали, що D-сорбіт та D-маніт відповідно покращують стійкість антитіл

приблизно на 20 % / 3 %, та на 14 % / 4 % (дані SPR/HPLC, T14). Трегалоза та цукроза мають меншу дію та відповідно покращують стійкість антитіл приблизно на 7 % / 0.7 % та на 6 % / 2 % (дані SPR/HPLC, T14). Крім того, дані, отримані з допомогою ВЕРХ- хроматографії свідчать про те, що D-сорбіт та D-маніт зменшують утворення агрегатів антитіл відповідно на 43 % та 50 %, що також підтверджується даними, отриманими шляхом SDS-PAGE. Дія поверхнево-активної речовини Tween 20 (0.05 % (у об'ємному співвідношенні)) та Tween 80 (0.02 % (у об'ємному співвідношенні)) жодним чином не призвела до значного покращення стійкості антитіл.

Приклад 8: Дія комбінацій буферів, амінокислот та цукрів.

Ці дослідження проводили на основі попередніх досліджень для оцінки стійкості 1 мг/мл антитіл, отриманих у комбінаціях буферів, амінокислот та цукрів. Попередні дослідження показали наявність стабілізуючих ефектів 20 мМ ацетатного буферу, рН 5; 20 мМ гістидинового буферу, рН 6; 250 мМ глютамінової кислоти; 250 мМ треоніну, 6 % (вага/об'єм) сорбіту та 6 % (вага/об'єм) маніту. Антитіла отримали у концентрації 5.4 мг/мл у розчинах комбінацій 20 мМ буферу, 250 мМ амінокислоти та 6 % (у об'ємному співвідношенні) цукру, як вказано у Таблиці 1 та зберігали при 55 °C протягом 14 днів. Антитіла у 1x буфері PBS застосували у якості контролю. Аналіз зразків проводили у 0, 7 та 14 день досліджень (відповідно T0, T7 та T14) шляхом поверхневого плазмонного резонансу та ексклюзивної ВЕРХ-хроматографії.

Крім того, зразки T0, які містили антитіла (5.4 мг/мл) у 1xPBS перевірили на чутливість до заморожування та відтавання. Флакони для зберігання швидко заморозили до -20 °C у холодильнику. Після закінчення заморожування зразки піддали відтаванню при кімнатній температурі. Цей процес повторювали до закінчення п'яти циклів заморожування-відтавання. Кожен зразок після другого та п'ятого циклу дослідили з допомогою поверхневого плазмонного резонансу та ексклюзивної ВЕРХ-хроматографії.

Таблиця 1:

Комбінація буферів, цукрів та амінокислот
(Ac = ацетатний буфер; His = гістидиновий буфер; M = маніт; S = сорбіт).

Зразок		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Буфер	Ac	x	x			x	x			x	x	x	x					1 x PBS
	His			x	x			x	x					x	x	x	x	
Аміно кислота	Glu	x		x						x	x			x	x			
	Thr		x		x							x	x			x	x	
Цукор	M					x		x		x		x		x		x		
	S						x		x		x		x		x		x	

Дані, отримані з допомогою поверхневого плазмонного резонансу показують, що зв'язувальна активність у зразках 5-16 (T14/55 °C) дорівнювала >93 % у порівнянні з T0. Для антитіл у 1x буфері PBS (зразок 17) та зразків 1-4 (без додавання маніту або сорбіту) ці значення, відповідно, дорівнювали 62 %, 19 %, 26 %, 91 % та 85 %. Отже, дані, отримані з допомогою поверхневого плазмонного резонансу вказують на те, що додавання маніту або сорбіту посилює стійкість зв'язувальної активності. Крім того, зразки 1-4 у моментах часу T7 та T14 стали жовтуватими, що свідчить про окислення. Дані, отримані з допомогою ексклюзивної ВЕРХ-хроматографії показують, що найнижчі рівні агрегування (3,5 % - 5,6 %) та деградації продуктів (4,2 % - 5,4 %) спостерігали у зразках 5-8, 11-12 та 15-16 (дані T14/55 °C), що підтверджує наявність стабілізуючої дії маніту та сорбіту на мономер антитіла та вказує на можливий незначний вплив додавання 250 мМ треоніну. Однак, якщо судити з отриманих рівнів мономерів у зразках 5-8, 11-12 та 15-16 (відповідно, 91,2 %, 89,8 %, 91,5 %, 90,8 %, 89,8 %, 89,0 %, 91,4 % та 90,9 %,) у порівнянні з показником для зразка 17 (PBS), який дорівнює 80.3 % (дані T14/55 °C), то дія треоніну є принаймні лише мінімальною. Додавання глютамінової кислоти (250 мМ) разом з сорбітом або манітом негативно впливає на стійкість мономерного антитіла, особливо у ацетатному буфері. Нарешті слід зазначити, що мономерні антитіла, схоже, були найбільш стійкими у комбінації 20 мМ ацетатного буфера (рН 5) або 20 мМ гістидинового буфера (рН 6) та 6 % (вага/об'єм) сорбіту або 6 % (вага/об'єм) маніту.

Результати експериментів по заморожуванню/відтаванню, отримані з допомогою ексклюзивної ВЕРХ-хроматографії свідчать про те, що сорбіт має трохи кращий вплив на стабілізацію мономерного антитіла, ніж маніт. Вміст мономерів у зразках 6 та 8 після 5 циклів заморожування/відтавання дорівнював, відповідно, 98.6 % та 98.4 % порівняно до вмісту мономерів у зразках 5 та 7 (96,9 % та 96,0 %).

Приклад 9: Дія комбінацій гістидинового або ацетатного буферів, сорбіту або маніту та Tween 20 або Tween 80.

Ці нові дослідження проводили з метою оцінки стійкості 10 мг/мл антитіл, отриманих у комбінаціях гістидинового або ацетатного буферів, сорбіту або маніту та поверхнево-активних речовин Tween 20 або Tween 80 на основі результатів попередніх досліджень стійкості (у яких дослідники спостерігали стабілізуючу дію 20 мМ ацетатного буфера, pH 5, 20 мМ гістидинового буфера, pH 6, 6 % (вага/об'єм) сорбіту та 6 % (вага/об'єм) маніту). Завдяки концентраціям антитіл, які дорівнювали 10 мг/мл також було перевірено вплив сполук Tween 20 та Tween 80 на агрегацію шляхом дослідження додавання 0.02 % (вага/об'єм) Tween 20 та 0.02 % (вага/об'єм) Tween 80.

Антитіла були отримані з концентрацією у 10 мг/мл у розчинах 20 мМ ацетатного буфера, pH 5.0 або 20 мМ гістидинового буфера, pH 6.0 та з домішками, як зазначено у Таблиці 2, після чого їх зберігали протягом 14 днів при 55 °С. Аналіз зразків проводили у 0, 7 та 14 день досліджень (відповідно T0, T7 та T14) шляхом поверхневого плазмонного резонансу та ексклюзійної ВЕРХ-хроматографії.

Додатково зразки антитіл також перевірили на чутливість до заморожування та відтавання. Антитіла, концентрація яких дорівнювала 10 мг/мл піддали повільному заморожуванню при – 20 °С у холодильнику. Після закінчення заморожування зразки були піддані відтаванню при кімнатній температурі та цей процес повторили до завершення трьох та/або п'яти циклів заморожування-відтавання. Після завершення трьох та/або п'яти циклів заморожування-відтавання кожен зразок дослідили шляхом поверхневого плазмонного резонансу та ексклюзійної ВЕРХ-хроматографії.

Таблиц 2:

Комбінація буферів, цукрі та детергентів (Ac = ацетатний буфер;
His = гістидиновий буфер; M = маніт; S = сорбіт; T20=Tween 20; T80=Tween 80)

Зразок		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Буфер	Ac	x	x			x	x	x	x				
	His			x	x					x	x	x	x
Цукор	M		x		x			x	x			x	x
	S	x		x		x	x			x	x		
Детергент	T20					x		x		x		x	
	T80						x		x		x		x

Дані, отримані з допомогою ВЕРХ-хроматографії показали, що додавання 0.02 % (вага/об'єм) Tween 20 та 0.02 % (вага/об'єм) Tween 80 негативно впливає на стійкість мономерного антитіла. Після 14 днів зберігання при 55 °С від антитіл, отриманих без додавання детергентів залишилося приблизно 89-90 % мономерів та приблизно 83-88 % мономерів залишилося від антитіл, отриманих з додаванням детергентів. Втрата мономерних антитіл головним чином була спричинена збільшенням рівнів агрегатів антитіл (приблизно 7.6 % - 10.3 %) при додаванні детергентів. Без додавання Tween 20 та Tween 80 відсоток агрегатів антитіл складав приблизно 5.2 % - 6.4 %. Хоча різниця між ацетатом та гістидином у якості буферної системи є незначною, схоже, що застосування гістидину є трохи кращим, ніж застосування ацетату.

Експерименти по заморожуванню та відтаванню показали принаймні відсутність позитивної дії детергентів на кількість мономерних антитіл після п'яти циклів заморожування-відтавання. Однак мономерні антитіла були більш стійкими при додаванні до композиції 6 % (вага/об'єм) сорбіту порівняно з додаванням до неї 6 % (вага/об'єм) маніту. При додаванні маніту спостерігався більший рівень агрегації мономерних антитіл після п'яти циклів заморожування-відтавання. Дані досліджень заморожування/відтавання, отримані з допомогою ВЕРХ-хроматографії показали відсутність помітної різниці між застосуванням ацетату та гістидину.

Нарешті слід зазначити, що попередня композиція, яка містить 20 мМ гістидин, pH 6.0 та 6 % (вага/об'єм) сорбіту здається оптимальною для стійкості мономерного антитіла.

Приклад 10: Короткочасна перевірка стійкості попередньої композиції з 20 мМ гістидином та 6 % (вага/об'єм) D-сорбітом.

Цю короткочасну перевірку стійкості проводили на основі ідентифікації 20 мМ гістидину, pH 6.0 та 6 % (вага/об'єм) сорбіту у якості оптимальної попередньої композиції для оцінки її дії при підвищених концентраціях антитіл.

Антитіла було отримано у вищенаведеному розчині з концентраціями, які дорівнювали приблизно 22, 36, 42, 83 та 118 мг/мл. Отримані антитіла зберігали при 5 °C та 25 °C протягом періоду до 4 тижнів. Аналіз зразків проводили у 0, 14 та 28 день досліджень (відповідно T0, T14 та T28) шляхом ексклюзійної ВЕРХ-хроматографії.

Дані, отримані шляхом ексклюзійної ВЕРХ-хроматографії ясно показують, що антитіла є стійкими у композиції, яка містить 20 мМ гістидин рН 6.0 та 6 % (вага/об'єм) сорбіт. Концентрація мономерного антитіла, визначена після 28 - денного зберігання при 5 °C або 25 °C завжди була вищою, ніж 97 %, за виключенням найвищої перевіреної при 25 °C концентрації антитіл (118 мг/мл), у якій концентрація мономерних антитіл дорівнювала приблизно 96,5 %. Результати наведено у Фіг. 1.

Приклад 11: Детальне налаштування кінцевих наповнювачів.

На основі даних, отриманих у попередніх експериментах, для надання антитілам стійкості були вибрані сорбіт та гістидин. У наступному етапі було здійснено більш детальне налаштування кількості наповнювачів та значення рН для концентрацій антитіл у межах 10-100 мг/мл з застосуванням "Планування Експерименту" (DOE), яке містить три основних пункти та відображається у 30 окремих пробігах. Рандомізований експериментальний план було здійснено з наступними параметрами:

Антитіло: 10 - 55 - 100 мг/мл

рН: 5 - 6 - 7

Гістидин: 10 - 30 - 50 мМ

Сорбіт: 2 - 6 - 10 % (вага/об'єм)

Для здійснення короткочасної оцінки зразки піддали стресу в умовах прискореної деградації при температурі 50 °C протягом 14 днів. Крім того, для імітації зберігання антитіл було здійснено три цикли заморожування / відтавання (-20 °C).

Результати:

Для забезпечення фізіологічних умов для композиції була визначена осмоляльність. Прийнятним діапазоном осмоляльності для внутрішньовенного або підшкірного введення антитіл є 250-450 мОсм/кг. Як показано у Фіг. 2, осмоляльність головним чином контролювали за кількістю сорбіту у композиції. Низькі концентрації гістидину (10-50 мМ) та антитіла (самі по собі) мали тільки мінімальний вплив на осмоляльність.

Залежність осмоляльності від концентрації сорбіту та гістидину може бути зображена у вигляді лінійного графіка. Цей графік демонструє необхідність додавання сорбіту у концентрації 3 % - 7 % (вага/об'єм) для підтримки осмоляльності у фізіологічному інтервалі. Отримані дані вказують на оптимальну концентрацію сорбіту, яка дорівнює приблизно 6 %, що веде до появи досить високого значення осмоляльності (>400 мОсм/кг). Оскільки певне зменшення концентрації сорбіту не впливає на стійкість антитіл, ця концентрація може бути зниженою до 5 % для досягнення рівня осмоляльності приблизно у 350 мОсм/кг, що покращить зручність для пацієнта.

На основі отриманих даних також була встановлена оптимальна концентрація для гістидину, яка дорівнювала 30 мМ. З допомогою ексклюзійної ВЕРХ-хроматографії було визначено, що застосування концентрацій гістидину у діапазоні 10-50 мМ не впливає на агрегацію або фрагментацію.

Агрегація антитіл головним чином залежить від концентрації. Підвищені концентрації антитіл ведуть до збільшення кількості агрегатів та до підвищення показників прозорості під час заморожування/відтавання та в умовах прискореної деградації та температурного стресу. Додатково на мономерний вміст антитіл також впливає значення рН. У той час, як прискорені стресові умови при рН<6 ведуть до підвищення фрагментації антитіл, стійкість протягом заморожування/відтавання не тільки залишається незмінною, але й спостерігається незначне її покращення. Зменшення мономерного вмісту при значеннях рН>6 в умовах прискореного температурного стресу та при обробці шляхом заморожування / відтавання лікування може бути виміряне з допомогою ексклюзійної ВЕРХ-хроматографії та аналізу прозорості. Схоже, що найбільш прийнятним значенням рН для врівноваження протилежних ефектів у композиціях на основі антитіл є рН 5,8.

В ході досліджень була отримана композиція з наступними параметрами:

Антитіло: 10 мг/мл - 55 мг/мл - 100 мг/мл

D-сорбіт: 5 % (вага/об'єм)

L-гістидиновий буфер 30 мМ (гідрохлориду моногідрат)

рН 5,8 (доведено з допомогою 2M NaOH)

Як буде показано у наступному прикладі, умови або параметри цієї композиції також можуть бути надані іншій композиції, яка має більш високу концентрацію антитіл.

Приклад 12: Дослідження стійкості.

а) Довготривалі дослідження.

Ці дослідження були розроблені для періоду перевірки, який сягав до 60 місяців. Протягом цього періоду зразки антитіл зберігали при $+5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ у скляних флаконах DIN R2. Додатково були проведені дослідження в умовах прискореної деградації при температурі $+25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ та дослідження у стресових умовах при $+40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ (також у скляних флаконах DIN R2 протягом, відповідно, 12 та 6 місяців), Перевірку здійснювали з застосуванням концентрацій антитіл, які дорівнювали 106 мг/мл та 145 мг/мл у поєднанні з 30 мМ моногідрохлоридом гістидину та 5 % (вага/об'єм) сорбітом при pH 5.8.

У дослідженнях були виміряні наступні параметри, як-то pH, осмоляльність, концентрація (OD280), відсоток мономерів, агрегатів та фрагментів (шляхом ексклюзійної ВЕРХ-хроматографії), ефективність (аналіз на клітинній основі). Результати наведені у наступних Таблицях 3-8.

Таблиця 3:

Перевірка стійкості при температурі $+5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ (концентрація антитіп - 106 мг/мл).

Час зберігання (місяців)	pH	Осмоляльність (мОсм/кг ⁻¹)	Концентрація (OD280) (мг/мл ⁻¹)	M / A / F [%]			Відносна ефективність (у порівнянні зі стандарт. зразком)
0	5,83	379	106,51	99,20	0,80	0	0,83
1	5,88	379	103,00	99,18	0,82	0	1,03
3	5,90	379	108,75	99,07	0,93	0	1,23
6	5,89	376	100,05	98,87	1,13	0	0,89
9	5,83	377	102,59	99,01	0,99	0	1,00
12	5,86	387	103,34	98,97	1,03	0	1,01
18	5,87	379	102,49	98,78	1,04	0,18	0,84
24	5,85	377	101,73	98,68	1,11	0,21	1,05
30	5,81	383	102,52	98,55	1,17	0,28	0,83
36	5,84	380	107,78	98,56	1,18	0,25	1,06
42	5,92	384	96,32	98,34	1,11	0,55	1,26
48	5,90	376	94,33	98,54	1,23	0,23	1,03
54	5,86	382	107,67	98,25	1,28	0,47	1,04
60	5,90	379	106,79	98,26	1,26	0,48	0,97

M / A / F [%] - Відсоткове співвідношення мономерів/агрегатів/фрагментів, виміряне з допомогою ексклюзійної ВЕРХ-хроматографії.

Ефективність - Відносна ефективність (у порівнянні з еталонним стандартом), виміряна з допомогою аналізу на клітинній основі.

OD280 - оптична густина при довжині хвилі у 280 нм.

Таблиця 4:

Перевірка стійкості при температурі $+5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ (концентрація антитіп - 145 мг/мл).

Час зберігання (місяців)	pH	Осмоляльність (мОсм/кг ⁻¹)	Концентрація (OD280) (мг/мл ⁻¹)	M / A / F [%]			Відносна ефективність (у порівнянні зі стандарт. зразком)
0	5,91	392	143,31	99,10	0,90	0	0,72
1	5,91	393	139,52	99,06	0,94	0	0,95
3	5,93	385	139,44	98,89	1,11	0	1,06
6	5,90	381	145,66	98,79	1,21	0	0,81
9	5,87	383	144,12	98,86	1,14	0	1,07
12	5,89	388	140,52	98,80	1,20	0	1,13
18	5,90	387	143,66	98,62	1,22	0,16	1,09

Таблиця 4:

Перевірка стійкості при температурі $+5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ (концентрація антитіп - 145 мг/мл).

Час зберігання (місяців)	pH	Осмоляльність (мОсм/кг ⁻¹)	Концентрація (OD280) (мг/мл ⁻¹)	М / А / F [%]			Відносна ефективність (у порівнянні зі стандарт. зразком)
24	5,85	385	137,07	98,45	1,38	0,17	0,83
30	5,84	387	131,98	98,30	1,42	0,28	0,87
36	5,88	384	148,55	98,35	1,39	0,26	0,99
42	5,94	383	134,11	98,17	1,33	0,50	0,97
48	5,94	385	125,09	98,23	1,50	0,26	1,03
54	5,90	394	150,81	97,94	1,57	0,49	1,04
60	5,90	386	147,01	97,94	1,53	0,53	0,82

Таблиця 5:

Перевірка стійкості при температурі $+25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ (концентрація антитіп - 106 мг/мл).

Час зберігання (місяців)	pH	Осмоляльність (мОсм/кг ⁻¹)	Концентрація (OD280) (мг/мл ⁻¹)	М / А / F [%]			Відносна ефективність (у порівнянні зі стандарт. зразком)
0	5,83	379	106,51	99,20	0,80	0	0,83
1	5,84	385	101,35	98,77	1,06	0,17	1,20
3	5,90	382	107,36	98,15	1,44	0,42	0,92
6	5,85	387	100,14	97,85	1,51	0,64	1,00
9	5,83	374	107,49	94,71	1,49	3,80	1,10
12	5,85	383	106,27	94,71	1,56	3,73	1,30

Таблиця 6:

Перевірка стійкості при температурі $+25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ (концентрація антитіл - 145 мг/мл).

Час зберігання (місяців)	pH	Осмоляльність (мОсм/кг ⁻¹)	Концентрація (OD280) мг/мл ⁻¹)	М / А / F [%]			Відносна ефективність (у порівнянні зі стандарт. зразком)
0	5,91	392	143,31	99,10	0,90	0	0,72
1	5,90	384	142,84	98,49	1,19	0,31	0,95
3	5,93	386	147,84	98,12	1,50	0,37	1,04
6	5,88	383	134,73	97,62	1,78	0,60	0,78
9	5,91	387	144,59	94,46	1,85	3,69	0,97
12	5,87	387	143,12	94,36	1,90	3,74	1,23

Таблиця 7:

Перевірка стійкості при температурі $+40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ (концентрація антитіл -106 мг/мл).

Час зберігання (місяців)	pH	Осмоляльність (мОсм/кг ⁻¹)	Концентрація (OD280) (мг/мл ⁻¹)	M / A / F [%]			Відносна ефективність (у порівнянні зі стандарт. зразком)
0	5,83	379	106,51	99,20	0,80	0	0,83
1	5,88	377	102,68	94,66	1,34	3,99	1,05
3	5,89	382	108,60	91,85	2,06	6,09	1,01
6	5,85	378	99,75	87,39	2,46	10,15	0,97

Таблиця 8:

Перевірка стійкості при температурі $+40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ (концентрація антитіл -145 мг/мл).

Час зберігання (місяців)	pH	Осмоляльність (мОсм/кг ⁻¹)	Концентрація (OD280) (мг/мл ⁻¹)	M / A / F [%]			Відносна ефективність (у порівнянні зі стандарт. зразком)
0	5,91	392	143,31	99,10	0,90	0	0,72
1	5,92	388	136,96	94,96	1,69	3,35	0,77
3	5,91	386	143,07	92,02	2,40	5,58	0,87
6	5,88	388	137,11	86,56	3,33	10,11	0,94

б) Дослідження в умовах прискореної деградації / дослідження в умовах стресу.

5 Для демонстрації порівнянності речовини лікарського препарату після збільшення обсягу її виробництва були проведені дослідження в умовах прискореної деградації (25 °C) та дослідження в умовах стресу (40 °C) з застосуванням двох партій речовини лікарського препарату з концентраціями антитіл у 165 мг/мл та 171 мг/мл, отриманими у розчині 30 мМ гістидину, 5 % сорбіту, pH 5.8.

10 У цих дослідженнях були виміряні наступні параметри, як-то pH, осмоляльність, концентрація (OD280), відсоток мономерів, агрегатів та фрагментів (шляхом ексклюзійної ВЕРХ-хроматографії), ефективність (аналіз на клітинній основі). Результати для антитіл з концентрацією 171 мг/мл наведені у наступних Таблицях 9 та 10.

Таблиця 9:

Перевірка стійкості при температурі $+25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ (концентрація антитіл -171 мг/мл).

Час зберігання (місяців)	pH	Осмоляльність (мОсм/кг ⁻¹)	Концентрація (OD280) мг/мл ⁻¹	M / A / F [%]			Відносна ефективність (у порівнянні зі стандарт. зразком)
0	5,7	--	169,00	>99,0	0,6	<1 %	0,97
2	5,6	--	171,00	98,3	1,7	<1 %	0,92
3	5,7	--	173,00	98,0	2,0	<1 %	1,14

15

Таблиця 10:

Перевірка стійкості при температурі $+40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ (концентрація антитіл -171 мг/мл).

Час зберігання (місяців)	pH	Осмоляльність (мОсм/кг ⁻¹)	Концентрація (OD280) (мг/мл ⁻¹)	М / А / F [%]			Відносна ефективність (у порівнянні зі стандарт. зразком)
0	5,7	--	169,0	>99,0	0,6	<1 %	0,97
2	5,6	--	171,0	92,5	2,9	<5 %	0,90
3	5,7	--	175,0	90,3	3,5	<7 %	0,91

с) Дослідження заморожування / відтавання.

У цих дослідженнях була перевірена стійкість до заморожування/відтавання для антитіл з концентраціями 106 мг/мл та 145 мг/мл, отриманих у розчині 30 мМ гістидину (pH 5.8) та 5 % сорбіту. Антитіла піддали заморожуванню при $-80\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 10\text{ }^{\circ}\text{C}$ щонайменш протягом ночі. Відтавання проводили протягом ≥ 6 год. при кімнатній температурі. Загальна кількість циклів заморожування-відтавання дорівнювала 0, 1, 3, 5, 7 та 10.

У дослідженнях були виміряні наступні параметри, як-то pH, осмоляльність, концентрація (OD280), відсоток мономерів, агрегатів та фрагментів (шляхом ексклюзійної ВЕРХ-хроматографії), ефективність (аналіз на клітинній основі). Результати наведені у наступних Таблицях 11 та 12.

Таблиця 11:

Перевірка стійкості до заморожування / відтавання при температурі $-80\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 10\text{ }^{\circ}\text{C}$ (концентрація антитіл - 106 мг/мл).

Кількість циклів заморожування, /відтавання	pH	Осмоляльність (мОсм/кг ⁻¹)	Концентрація (OD280) (мг/мл ⁻¹)	М / А / F [%]			Відносна ефективність (у порівнянні зі стандарт. зразком)
0х	5,86	373	99,07	99,05	0,95	0	0,84
1х	5,86	381	99,37	99,19	0,81	0	1,05
3х	5,89	379	98,23	99,20	0,80	0	1,11
5х	5,87	380	99,69	99,15	0,85	0	1,15
7х	5,86	380	99,96	99,12	0,88	0	1,24
10х	5,87	378	98,94	99,08	0,92	0	0,83

Таблиця 12:

Перевірка стійкості до заморожування / відтавання при температурі $-80\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 10\text{ }^{\circ}\text{C}$ (концентрація антитіл - 145 мг/мл).

Кількість циклів заморожування, /відтавання	pH	Осмоляльність (мОсм/кг ⁻¹)	Концентрація (OD280) (мг/мл ⁻¹)	М / А / F [%]			Відносна ефективність (у порівнянні зі стандарт. зразком)
0х	5,86	373	133,13	98,94	1,06	0	0,81
1х	5,90	379	132,98	99,11	0,89	0	1,16
3х	5,89	380	134,56	99,09	0,91	0	1,04
5х	5,90	384	132,74	99,07	0,93	0	1,11
7х	5,90	383	134,54	99,03	0,97	0	1,04
10х	5,91	385	132,89	98,96	1,04	0	1,05

d) Досліджування стійкості до струшування.

Метою цих досліджень було отримання інформації про вплив напруження зсуву на антитіла, починаючи від їх фасування до доставки пацієнту (наприклад, протягом їх фасування, пакування, перевезення). У цих дослідженнях, антитіла з концентраціями 106 мг/мл та 145 мг/мл, отримані у розчині 30 мМ гістидину (pH 5.8) та 5 % сорбіту розмістили на вертикальній мішалці у основному матеріалі для пакування (скляні флакони DIN R2) та струшували протягом часу (до 14 днів) при $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ з порівнянням отриманих результатів з результатами, отриманими від контрольних зразків, які інкубували з температурою $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ без струшування. Збір даних здійснювали через 0, 1, 2, 3, 7 та 14 днів.

У дослідженнях були виміряні наступні параметри, як-то pH, осмоляльність, концентрація (OD280), відсоток мономерів, агрегатів та фрагментів (шляхом ексклюзійної ВЕРХ-хроматографії), ефективність (аналіз на клітинній основі). Результати наведені у наступних Таблицях 13-16.

Таблиця 13:

Перевірка стійкості до струшування при температурі $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ (106 мг/мл антитіл) зі струшуванням.

Час зберігання (днів)	pH	Осмоляльність (мОсм/кг ⁻¹)	Концентрація (OD280) (мг/мл ⁻¹)	M / A / F [%]			Відносна ефективність (у порівнянні зі стандарт. зразком)
0	5,86	373	99,07	99,05	0,95	0	0,84
1	5,89	375	96,37	99,07	0,93	0	n, d,
2	5,92	376	99,84	99,04	0,96	0	n, d,
3	5,88	384	99,69	99,04	0,96	0	0,95
7	5,85	377	99,39	99,05	0,95	0	1,00
14	5,89	379	100,14	99,06	0,94	0	0,87

n.d.- не визначено

Таблиця 14:

Перевірка стійкості до струшування при температурі $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ (106 мг/мл антитіл) без струшування.

Час зберігання (днів)	pH	Осмоляльність (мОсм/кг ⁻¹)	Концентрація (OD280) (мг/мл ⁻¹)	M / A / F [%]			Відносна ефективність (у порівнянні зі стандарт. зразком)
0	5,86	373	99,07	99,05	0,95	0	0,84
1	5,93	380	96,54	99,09	0,91	0	n, d,
2	5,94	379	99,60	99,08	0,92	0	n, d,
3	5,86	378	98,98	99,05	0,95	0	0,98
7	5,85	378	98,79	99,02	0,98	0	1,04
14	5,92	384	99,43	99,08	0,92	0	1,13

Таблиця 15:

Перевірка стійкості до струшування
при температурі $+5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ (145 мг/мл антитіл) зі струшуванням.

Час зберігання (днів)	pH	Осмоляльність (мОсм/кг ⁻¹)	Концентрація (OD280) (мг/мл ⁻¹)	M / A / F [%]			Відносна ефективність (у порівнянні зі стандарт. зразком)
0	5,96	382	133,13	98,94	1,06	0	0,81
1	5,92	381	132,32	98,97	1,03	0	n, d,
2	5,94	385	135,31	98,93	1,07	0	n, d,
3	5,89	384	133,54	98,91	1,09	0	0,89
7	5,85	382	132,17	99,01	0,99	0	1,19
14	5,90	384	134,88	98,95	1,05	0	0,98

Таблиця 16:

Перевірка стійкості до струшування
при температурі $+5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ (145 мг/мл антитіл) без струшування.

Час зберігання (днів)	pH	Осмоляльність (мОсм/кг ⁻¹)	Концентрація (OD280) (мг/мл ⁻¹)	M / A / F [%]			Відносна ефективність (у порівнянні зі стандарт. зразком)
0	5,96	382	133,13	98,94	1,06	0	0,81
1	5,92	382	132,70	98,98	1,02	0	n, d,
2	5,95	383	137,85	98,98	1,02	0	n, d,
3	5,89	385	138,28	98,93	1,07	0	0,71
7	5,88	380	133,11	98,93	1,07	0	1,16
14	5,90	387	135,40	98,93	1,07	0	0,79

е) Результати та висновки.

5 Довготривалі дослідження стійкості, в тому числі дослідження в умовах прискореної деградації та у стресових умовах для антитіл з концентраціями приблизно 106 мг/мл - 145 мг/мл проводили протягом періоду, який тривав до 60 місяців. Також були проведені додаткові дослідження стійкості в умовах прискореної деградації та у стресових умовах для антитіл з концентраціями приблизно до 171 мг/мл.

10 Протягом 60-місячного періоду зразки (обидві концентрації антитіл), які зберігали при $+5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ показали менш, ніж 2 % агрегації та мали таку ж саме ефективність, як і еталонний зразок.

15 Після 12 місяців зберігання в умовах прискореної деградації ($+25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) зразки (обидві концентрації антитіл, як-то 106 мг/мл та 145 мг/мл) показали менш, ніж 2 % агрегації та мали таку ж саме ефективність, як і еталонний зразок. Після 6 місяців зберігання у стресових умовах ($+40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$), обидві концентрації антитіл показали менш, ніж 5 % агрегації та мали приблизно таку ж саме ефективність, як і еталонний зразок.

20 Додаткові дослідження в умовах прискореної деградації та у стресових умовах показали наявність стійкості композицій при інкубуванні протягом 3 місяців та 1 місяця при відповідних температурах $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ та $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Це свідчить про те, що при $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ можна очікувати таку стійкість, яку можна буде порівняти з показниками стійкості, отриманими для антитіл з концентраціями 106 мг/мл та 145 мг/мл, як було обговорено вище.

25 Крім того, антитіла були стійкими протягом принаймні 10 циклів заморожування-відтавання при температурі $-80\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 10\text{ }^{\circ}\text{C}$ (обидві перевірені концентрації антитіл, як-то приблизно 106 мг/мл та приблизно 145 мг/мл).

Зрештою були проведені 14-денні дослідження стійкості при струшуванні на вертикальній мішалці при температурі $+5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ з порівнянням досліджуваних зразків з контролем, який зберігали без струшування. Протягом цього періоду не було виявлено жодного прийнятного для визначення впливу на параметри оцінки (pH, осмоляльність, деградація, агрегація,

фрагментація, концентрація або ефективність). Отже, скоріш за все, струшування зразків жодним чином не вплинуло на стійкість антитіл.

На основі наведених вище даних, для концентрацій приблизно до 171 мг/мл може бути запропоновано строк зберігання принаймні у 60 місяців при температурі $+5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5 Приклад 13: Оцінка в'язкості.

В'язкість визначають з допомогою реометра, який застосовують для тих рідин, які не можуть бути визначені у вигляді одиничного значення в'язкості та тому потребують налаштування та вимірювання більшої кількості параметрів, ніж це має місце у віскозиметрі.

10 Для деяких рідин в'язкість є сталою величиною у широкому діапазоні швидкостей зсуву (ньютонівські рідини). Рідини без постійної в'язкості (неньютонівські рідини) не можуть бути описані одним числом та демонструють різні кореляції між напруженням зсуву та швидкістю зсуву. Таким чином, в'язкість для неньютонівських рідин залежить від температури, а також від швидкості зсуву. В'язкість позначають у міліпаскалях * секунду (мПа * с) при заданій температурі та швидкості зсуву $\dot{\gamma}$ [1/сек].

15 В'язкість композиції, що містить приблизно 150 мг/мл антитіл є нижчою, ніж 12 мПа*с при швидкості зсуву у межах приблизно 50-1000 [1/сек.] та температурі 20 °C.

В'язкість композиції, що містить приблизно 150 мг/мл антитіл є нижчою, ніж 20 мПа*с при швидкості зсуву приблизно 50-1000 [1/сек] та температурі 5 °C.

Перелік послідовностей

<110> Амген Рісерч (Мюнх) ГМБГ; Такеда ГМБГ

<120> Рідка композиція, яка містить сполуку, що нейтралізує ГМ-КСФ

<130> MIM14487PCT

<150> US61/720,892

<151> 2012-10-31

<150> EP12199191.3

<151> 2012-12-21

<160> 56

<170> Програмне забезпечення PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 10

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> CDR-H3 7A-701

<400> 1

Ser Gly Leu Ile Ala Asn His Met Thr Pro

1 5 10

<210> 2

<211> 10

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> CDR-H3 7B1-502

<400> 2

Thr	Thr	Leu	Ile	Ser	Val	Tyr	Phe	Asp	Tyr
1			5						10

<210> 3

<211> 10

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> CDR-H3 L38-A1

<400> 3

Ser	Gly	Leu	Ile	Phe	Asp	Tyr	Trp	Leu	Asp
1			5						10

<210> 4

<211> 10

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> CDR-H3 L38-A12

<400> 4

Ser Gly Leu Ile Ile Asp Ala Leu Ser Pro

1 5 10

<210> 5

<211> 10

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> CDR-H3 L38-G7

<400> 5

Thr Ser Leu Met Ser Ile Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 6

<211> 10

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> CDR-H3 L39-D11

<400> 6

Ser Gly Leu Leu Phe Leu Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 7

<211> 10

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> CDR-H3 E1-37-E7

<400> 7

Ser Gly Leu Ile Asn Leu Gly Met His Pro

1 5 10

<210> 8

<211> 10

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> CDR-H3 M1_3-82

<400> 8

Ser Gly Leu Ile Phe Asp Ala Leu Arg Asp

1 5 10

<210> 9

<211> 10

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> CDR-H3 Ln4p-23

<400> 9

Ser Gly Leu Ile Phe Asp Lys Leu Thr Ser

1 5 10

<210> 10
 <211> 10
 <212> білок
 <213> штучна послідовність

<220>
 <223> CDR-H3 Ln4p-28

<400> 10

Ser Gly Leu Ile Asn Leu His Phe Asp Thr
 1 5 10

<210> 11
 <211> 10
 <212> білок
 <213> штучна послідовність

<220>
 <223> CDR-H3 Ln4p-50

<400> 11

Ser Thr His Phe Ser Ala Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 12
 <211> 10
 <212> білок
 <213> штучна послідовність

<220>

<223> CDR-H3 Ln4p-65

<400> 12

Ser Gly Leu Ile Met Asp Lys Leu Asp Asn

1 5 10

<210> 13

<211> 10

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> CDR-H3 Ln4p-90

<400> 13

Ser Gly Leu Ile Ile Asp Asn Leu Asn Pro

1 5 10

<210> 14

<211> 5

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> CDR-H1 7B1-502

<400> 14

Asp Tyr Leu Leu His

1 5

<210> 15
 <211> 17
 <212> білок
 <213> штучна послідовність

<220>
 <223> CDR-H2 7B1-502

<400> 15

Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15
 Gly

<210> 16
 <211> 11
 <212> білок
 <213> штучна послідовність

<220>
 <223> CDR-L1 5-306

<400> 16

Arg Ala Ser Gln Asn Ile Arg Asn Ile Leu Asn
 1 5 10

<210> 17
 <211> 7
 <212> білок
 <213> штучна послідовність

<220>

<223> CDR-L2 5-306

<400> 17

Ala Ala Ser Asn Leu Gln Ser

1 5

<210> 18

<211> 9

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> CDR-L3 5-306

<400> 18

Gln Gln Ser Tyr Ser Met Pro Arg Thr

1 5

<210> 19

<211> 107

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> VL 5-306* L- форма

<400> 19

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ala Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Arg Asn Ile

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Gln Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Met Pro Arg
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 20

<211> 119

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> VH з CDR-H3 = 7A-701

<400> 20

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

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 21
<211> 119
<212> білок
<213> штучна послідовність

<220>
<223> VH з CDR-H3 = 7B1-502*

<400> 21

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

<210> 22
<211> 119
<212> білок
<213> штучна послідовність

<220>

<223> VH з CDR-H3 = 3077*

<400> 22

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

<210> 23

<211> 119

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> VH з CDR-H3 = L38-A1

<400> 23

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

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

<210> 24
<211> 119
<212> білок
<213> штучна послідовність

<220>
<223> VH з CDR-H3 = L38-A12

<400> 24

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

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Ser Gly Leu Ile Ile Asp Ala Leu Ser Pro Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 25
<211> 119
<212> білок
<213> штучна послідовність

<220>
<223> VH з CDR-H3 = L38-G7

<400> 25

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

<210> 26
 <211> 119
 <212> білок
 <213> штучна послідовність

<220>
 <223> VH з CDR-H3 = L39-D11

<400> 26

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

<210> 27
 <211> 119
 <212> білок
 <213> штучна послідовність

<220>
 <223> VH з CDR-H3 = E1-37-E7

<400> 27

```

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

```

<210> 28

<211> 119

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> VH з CDR-H3 = M1_3-82

<400> 28

```

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1      5      10      15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Phe Gly Tyr Pro Phe Thr Asp Tyr
      20      25      30
Leu Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
      35      40      45

```

Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Gly Leu Ile Phe Asp Ala Leu Arg Asp Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 29

<211> 119

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> VH з CDR-H3 = Ln4p-23

<400> 29

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

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 30
<211> 119
<212> білок
<213> штучна послідовність

<220>
<223> VH з CDR-H3 = Ln4p-28

<400> 30

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

<210> 31
<211> 119
<212> білок
<213> штучна послідовність

<220>

<223> VH з CDR-H3 = Ln4p-50

<400> 31

```

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

```

<210> 32

<211> 119

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> VH з CDR-H3 = Ln4p-65

<400> 32

```

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

```

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

<210> 33

<211> 119

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> VH з CDR-H3 = Ln4p-90

<400> 33

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

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Ser Gly Leu Ile Ile Asp Asn Leu Asn Pro Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 34
<211> 214
<212> білок
<213> штучна послідовність

<220>
<223> легкий панцюг 5-306* L- форма

<400> 34

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Ala Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Arg Asn Ile
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Gln Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Met Pro Arg
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 35

<211> 449

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> важкий ланцюг з CDR-H3 = 7B1-502*

<400> 35

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

Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445
 Lys

<210> 36

<211> 449

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> важкий ланцюг з CDR-H3 =7A-701*

<400> 36

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Phe Gly Tyr Pro Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Leu Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Ser Gly Leu Ile Ala Asn His Met Thr Pro Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445
 Lys

<210> 37
 <211> 449
 <212> білок
 <213> штучна послідовність

<220>
 <223> важкий ланцюг з CDR-H3 = L38-A1*

<400> 37

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Phe Gly Tyr Pro Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Leu Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Gly Leu Ile Phe Asp Tyr Trp Leu Asp Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445
 Lys

<210> 38

<211> 449

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> важкий ланцюг з CDR-H3 = L38-A12*

<400> 38

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Phe Gly Tyr Pro Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Leu Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Gly Leu Ile Ile Asp Ala Leu Ser Pro Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

Lys

<210> 39

<211> 449

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> важкий ланцюг з CDR-H3 = L38-G7*

<400> 39

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Phe Gly Tyr Pro Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Leu Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Thr Ser Leu Met Ser Ile Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445
 Lys

<210> 40

<211> 449

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> важкий ланцюг з CDR-H3 = L39-D11*

<400> 40

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Phe Gly Tyr Pro Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Leu Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Ser Gly Leu Leu Phe Leu Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445
 Lys

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> важкий ланцюг з CDR-H3 = E1-37-E7*

<400> 41

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Phe Gly Tyr Pro Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Leu Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Gly Leu Ile Asn Leu Gly Met His Pro Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205

<210> 41

<211> 449

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445
 Lys

<210> 42

<211> 449

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> важкий ланцюг з CDR-H3 = M1_3-82*

<400> 42

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Phe Gly Tyr Pro Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Leu Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Gly Leu Ile Phe Asp Ala Leu Arg Asp Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445
 Lys

<210> 43

<211> 449

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> важкий ланцюг з CDR-H3 = Ln4p-23*

<400> 43

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Phe Gly Tyr Pro Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Leu Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Gly Leu Ile Phe Asp Lys Leu Thr Ser Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445
 Lys

<210> 44

<211> 449

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> важкий ланцюг з CDR-H3 = Ln4p-28*

<400> 44

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Phe Gly Tyr Pro Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Leu Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Gly Leu Ile Asn Leu His Phe Asp Thr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445
 Lys

<210> 45

<211> 449

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> важкий ланцюг з CDR-H3 = Ln4p-50*

<400> 45

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Phe Gly Tyr Pro Phe Thr Asp Tyr
20 25 30
Leu Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Arg Ser Thr His Phe Ser Ala Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445
 Lys

<210> 46

<211> 449

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> важкий ланцюг з CDR-H3 = Ln4p-65*

<400> 46

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Phe Gly Tyr Pro Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Leu Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Gly Leu Ile Met Asp Lys Leu Asp Asn Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445
 Lys

<210> 47

<211> 449

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> важкий ланцюг з CDR-H3 = Ln4p-90*

<400> 47

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Phe Gly Tyr Pro Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Leu Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Gly Leu Ile Ile Asp Asn Leu Asn Pro Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445
 Lys

<210> 48

<211> 449

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> важкий ланцюг з CDR-H3 = 3077*

<400> 48

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Phe Gly Tyr Pro Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Leu Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Trp Leu Asn Pro Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Ser Gly Leu Ile Ala Val Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445
 Lys

<210> 49
 <211> 127
 <212> білок
 <213> GM-CSF людини

<400> 49

Ala Pro Ala Arg Ser Pro Ser Pro Ser Thr Gln Pro Trp Glu His Val
 1 5 10 15
 Asn Ala Ile Gln Glu Ala Arg Arg Leu Leu Asn Leu Ser Arg Asp Thr
 20 25 30
 Ala Ala Glu Met Asn Glu Thr Val Glu Val Ile Ser Glu Met Phe Asp
 35 40 45
 Leu Gln Glu Pro Thr Cys Leu Gln Thr Arg Leu Glu Leu Tyr Lys Gln
 50 55 60
 Gly Leu Arg Gly Ser Leu Thr Lys Leu Lys Gly Pro Leu Thr Met Met

65 70 75 80
 Ala Ser His Tyr Lys Gln His Cys Pro Pro Thr Pro Glu Thr Ser Cys
 85 90 95
 Ala Thr Gln Ile Ile Thr Phe Glu Ser Phe Lys Glu Asn Leu Lys Asp
 100 105 110
 Phe Leu Leu Val Ile Pro Phe Asp Cys Trp Glu Pro Val Gln Glu
 115 120 125

<210> 50
 <211> 127
 <212> білок
 <213> GM-CSF макаки

<400> 50

Ala Pro Ala Arg Ser Pro Ser Pro Gly Thr Gln Pro Trp Glu His Val
 1 5 10 15
 Asn Ala Ile Gln Glu Ala Arg Arg Leu Leu Asn Leu Ser Arg Asp Thr
 20 25 30
 Ala Ala Glu Met Asn Lys Thr Val Glu Val Val Ser Glu Met Phe Asp
 35 40 45
 Leu Gln Glu Pro Ser Cys Leu Gln Thr Arg Leu Glu Leu Tyr Lys Gln
 50 55 60
 Gly Leu Gln Gly Ser Leu Thr Lys Leu Lys Gly Pro Leu Thr Met Met
 65 70 75 80
 Ala Ser His Tyr Lys Gln His Cys Pro Pro Thr Pro Glu Thr Ser Cys
 85 90 95
 Ala Thr Gln Ile Ile Thr Phe Gln Ser Phe Lys Glu Asn Leu Lys Asp
 100 105 110
 Phe Leu Leu Val Ile Pro Phe Asp Cys Trp Glu Pro Val Gln Glu
 115 120 125

<210> 51
 <211> 127

<212> білок

<213> GM-CSF гібону

<400> 51

```

Ala Pro Ser Arg Ser Pro Ser Pro Ser Thr Gln Pro Trp Glu His Val
1      5      10      15
Asn Ala Ile Gln Glu Ala Arg Arg Leu Leu Asn Leu Ser Arg Asp Thr
      20      25      30
Ala Ala Glu Ile Asn Glu Thr Val Glu Val Val Ser Glu Met Phe Asp
      35      40      45
Leu Gln Glu Pro Thr Cys Leu Gln Thr Arg Leu Glu Leu Tyr Lys Gln
      50      55      60
Gly Leu Arg Gly Ser Leu Thr Lys Leu Lys Gly Pro Leu Thr Met Met
65      70      75      80
Ala Ser His Tyr Lys Gln His Cys Pro Pro Thr Pro Glu Thr Ser Cys
      85      90      95
Ala Thr Gln Ile Ile Ile Phe Glu Ser Phe Lys Glu Asn Leu Lys Asp
      100     105     110
Phe Leu Leu Val Ile Pro Phe Asp Cys Trp Glu Pro Val Gln Gly
      115     120     125

```

<210> 52

<211> 119

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> VH з CDR-H3 7B1-502

<400> 52

```

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1      5      10      15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Phe Gly Tyr Pro Phe Thr Asp Tyr

```

```

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

```

<210> 53

<211> 119

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> VH з CDR-H3 3077

<400> 53

```

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

```

85 90 95
 Thr Arg Ser Gly Leu Ile Ala Val Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 54
 <211> 107
 <212> білок
 <213> штучна послідовність

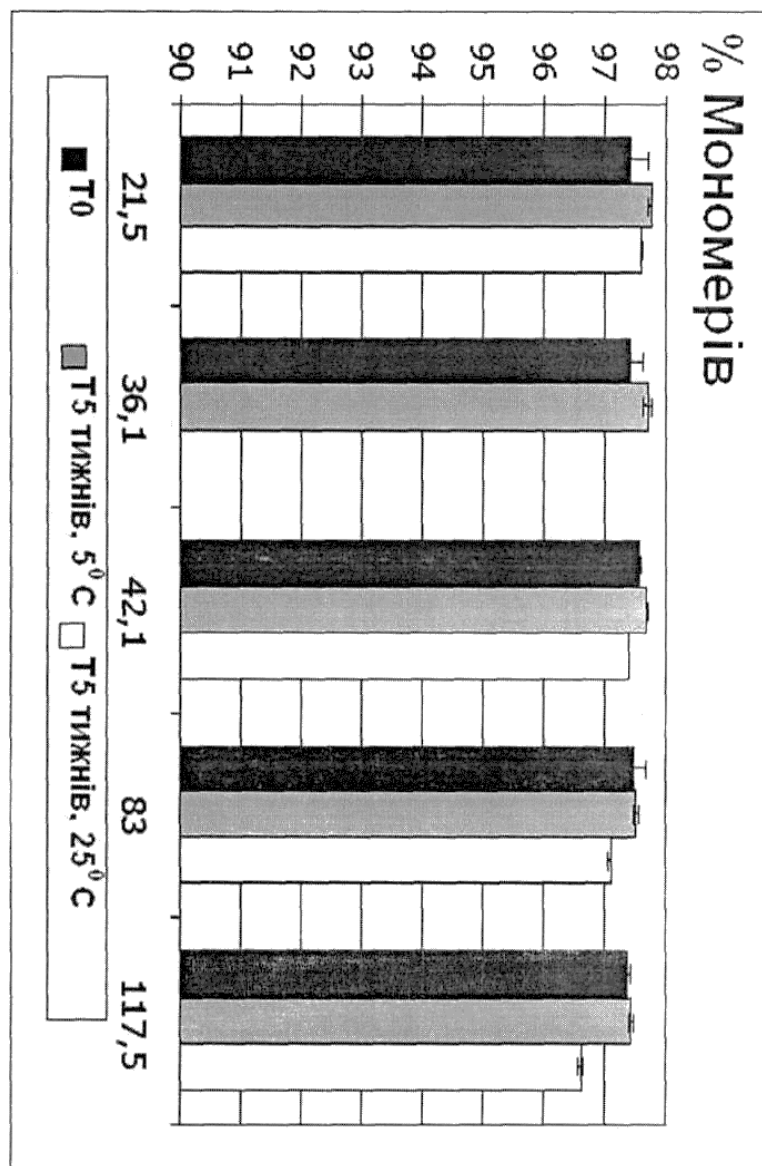
<220>
 <223> VL 5-306

<400> 54

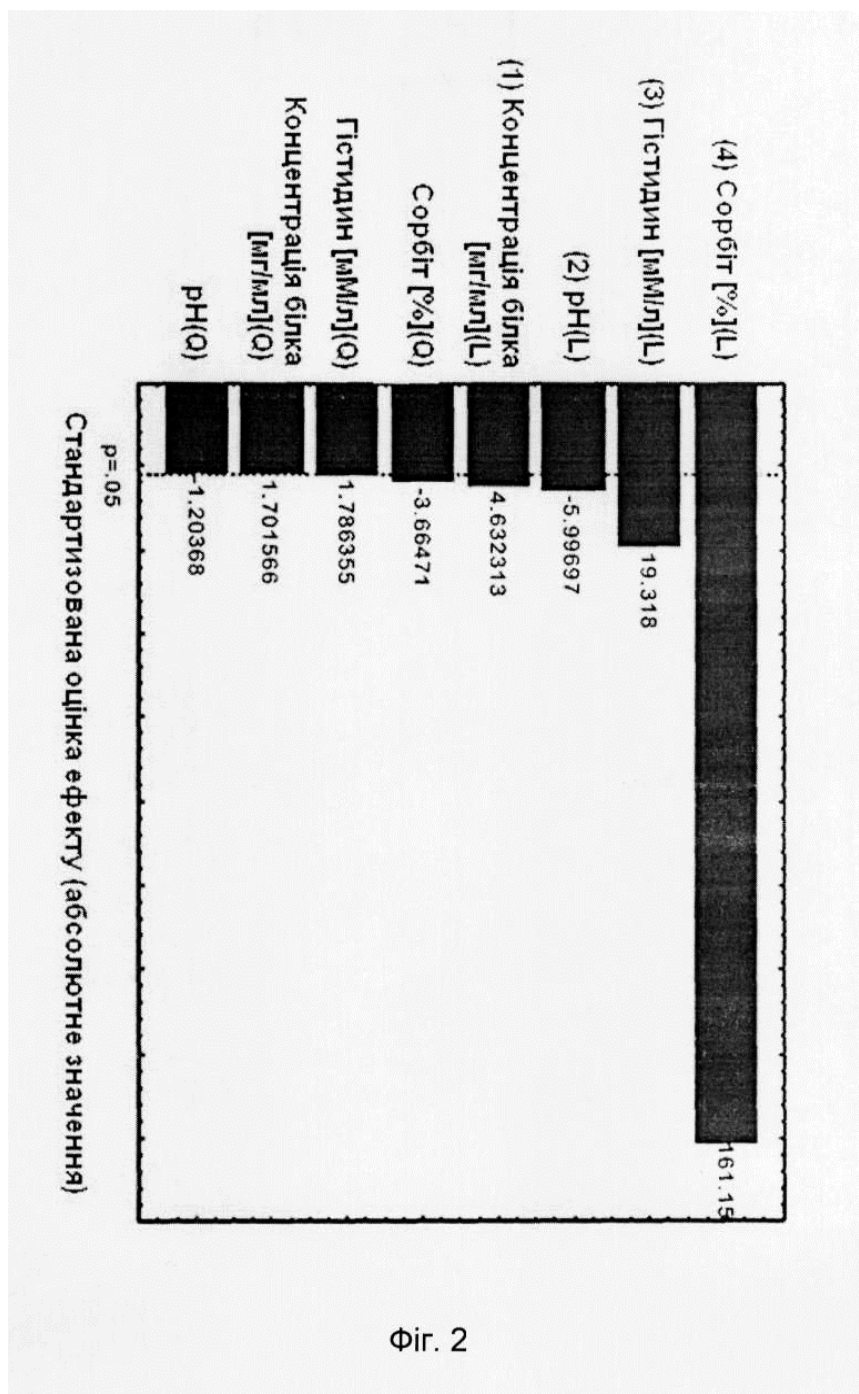
Glu Leu Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Ala Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Arg Asn Ile
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Gln Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
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

<210> 55
 <211> 107
 <212> білок

- як SEQ ID NO: 15, та ділянку CDR3, що містить амінокислотну послідовність, позначену будь-яким з номерів SEQ ID NO: 1-13 та 56, в концентрації від 100 мг/мл до 180 мг/мл,
 ii) 5% (маса/об'єм) сорбіту;
 iii) 30 mM L-гістидину та
 5 iv) має pH 5,8.
2. Композиція за п. 1, яка є вільною від поверхнево-активних речовин або амінокислот.
3. Композиція за пп. 1 або 2, яка містить 150 мг/мл антитіла або його функціонального фрагменту, що зв'язується з ГМ-КСФ,
- 10 4. Композиція за будь-яким з пп. 1-3, де антитіло або його функціональний фрагмент є моноклональним антитілом людини або його функціональним фрагментом, що зв'язується з ГМ-КСФ, містить у своїй змінній ділянці легкого ланцюга ділянку CDR1, яка містить амінокислотну послідовність, позначену як SEQ ID NO: 16, ділянку CDR2, що містить амінокислотну послідовність, позначену як SEQ ID NO: 17, та ділянку CDR3, що містить амінокислотну послідовність, позначену як SEQ ID NO: 18, та містить у своїй змінній ділянці важкого ланцюга ділянку CDR1, що містить амінокислотну послідовність, позначену як SEQ ID NO: 14, ділянку CDR2, що містить амінокислотну послідовність, позначену як SEQ ID NO: 15, та ділянку CDR3, що містить амінокислотну послідовність, позначену як SEQ ID NO: 2.
- 20 5. Композиція за будь-яким з пп. 1-4, де антитіло або його функціональний фрагмент містить у своїй змінній ділянці легкого ланцюга амінокислотну послідовність, позначену будь-яким з номерів SEQ ID NO: 19, 54 та 55, та у своїй змінній ділянці важкого ланцюга амінокислотну послідовність, позначену будь-яким з номерів SEQ ID NO: 20-33, 52 та 53.
6. Композиція за будь-яким з пп. 1-5, де антитіло або його функціональний фрагмент містить амінокислотну послідовність легкого ланцюга, позначену як SEQ ID NO: 34, та амінокислотну послідовність важкого ланцюга, позначену як SEQ ID NO: 35.
- 25 7. Композиція за будь-яким з пп. 1-6, яка є стабільною протягом принаймні 24 місяців при температурі 2-8 °C або принаймні 28 днів при кімнатній температурі.
8. Спосіб лікування запальних та аутоімунних розладів шляхом введення водної композиції за будь-яким з пп. 1-7.
- 30 9. Спосіб за п. 8, де розлади вибрані з алергічних, псоріатичних, артритних та астматичних розладів.
10. Набір, що містить композицію за будь-яким з пп. 1-7.



Фіг. 1



Фіг. 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