



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **108912** (13) **C2**

(51) МПК

A61K 39/395 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

C12P 21/06 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки: а 2013 08481	(72) Винахідник(и): Хсієх Чунг-мінг (US), Гудро Керрі (US), Гхаюр Тарік (US), Меллер Ахім (DE), Боуз Сахана (US)
(22) Дата подання заявки: 08.12.2011	(73) Власник(и): ЕББВІ ІНК., 1 North Waukegan Road, North Chicago, IL 60064, United States of America (US)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 25.06.2015	(74) Представник: Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр. №115
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 61/420,999	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 2009149185 A2, 10.12.2009 WO 9729131 A1, 14.08.1997 US 2006024308 A1, 02.02.2003 WO 2004050683 A2, 17.06.2004 WO 2006131013 A2, 14.12.2006
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 08.12.2010	
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: US	
(41) Публікація відомостей про заявку: 25.10.2013, Бюл.№ 20	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.06.2015, Бюл.№ 12	
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: PCT/US2011/063955, 08.12.2011	

(54) БІЛОК, ЯКИЙ ЗВ'ЯЗУЄ TNF- α

(57) Реферат:

Винахід належить до зв'язувального білка, який зв'язує TNF- α , фармацевтичної композиції, що містить зв'язувальний білок, клітини-хазяїна, способів застосування зв'язувального білка для зниження активності TNF- α та для лікування захворювання або порушення, при якому активність TNF- α є шкідливою.

UA 108912 C2

За даною заявкою вимагається пріоритет тимчасової заявки США № 61/420999, поданої 8 грудня 2010 року.

Галузь винаходу

Винахід стосується білків, що зв'язують TNF- α , і їх застосування для профілактики і/або лікування гострих і хронічних імунологічних захворювань, таких як ревматоїдний артрит, остеоартрит, псоріаз, розсіяний склероз і інші аутоімунні захворювання.

Рівень техніки

У даній галузі існує потреба в удосконалених антитілах, здатних зв'язувати TNF- α .

Суть винаходу

Винахід стосується нового сімейства білків, антитіл з пересадженою CDR, гуманізованих антитіл і їхніх фрагментів, здатних зв'язувати TNF- α , зв'язувати TNF- α з високою афінністю і зв'язувати і нейтралізувати TNF- α . Також винахід стосується антитіл і їхніх антиген-зв'язувальних частин, здатних зв'язувати TNF- α , що містить будь-яку амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 31-46.

Докладний опис

Винахід стосується зв'язувальних TNF- α білків, наприклад, антитіл або їх антиген-зв'язувальних частин, що зв'язують TNF- α . Різні аспекти стосуються антитіл і фрагментів антитіл, і їх фармацевтичних композицій, а також нуклеїнових кислот, рекомбінантних експресуючих векторів і клітин-хазяїв для одержання таких антитіл і їх фрагментів. Винахід також стосується способів застосування зв'язувальних білків для виявлення TNF- α людини, для інгібування TNF- α людини, або *in vitro*, або *in vivo*, і для регуляції експресії генів.

Якщо в даному описі не визначено інакше, наукові і технічні терміни, використовувані в рамках даного винаходу, будуть мати ті значення, що звичайно розуміють фахівці в даній галузі. Значення й об'єм термінів повинні бути очевидні, однак у випадку якої-небудь прихованої невизначеності, визначення, представлені в даному описі, мають перевагу над будь-яким словником або стороннім визначенням. Крім того, якщо контекстом не потрібно інше, терміни в однині включають множину, і терміни в множині включають однину. Термін "або" включає "і/або", якщо немає інших указівок. Застосування терміна "що включає", "включає" і "включений", є необмежуваним. Також терміни, такі як "елемент" або "компонент", охоплюють як елементи і компоненти, що містять одну одиницю, так і елементи і компоненти, що включають більше однієї субодиниці, якщо немає інших конкретних вказівок.

Способи і технології, головним чином, здійснюють відповідно до загальноприйнятих способів, добре відомими в галузі культивування клітин і тканин, молекулярної біології, імунології, мікробіології, генетики, хімії білків і нуклеїнових кислот і гібридизації, аналітичної хімії, синтетичної органічної хімії, медичної і фармацевтичної хімії, одержання, складання і доставки фармацевтичних препаратів і лікування пацієнтів. Такі способи також описані в посиланнях, цитованих у даному описі. Ферментативні реакції і способи очищення проводять відповідно до описів виготівника, як широко відомо в даній галузі або в іншому випадку описано в даному описі.

Терміни "поліпептид", "пептид" і "білок" використовують взаємозамінно, і вони позначають полімерний ланцюг амінокислот. Термін "поліпептид" стосується нативних або штучних білків, фрагментів білків і аналогів білкової послідовності. Поліпептид може бути мономерним або полімерним.

Термін "виділений білок" або "виділений поліпептид" означає або білок поліпептид, який не асоційований з компонентами, які супроводжують його в його нативному стані, наприклад, він по суті не містить інших білків або клітин або клітинних компонентів того ж виду, експресується клітиною відмінного виду або яка не зустрічається в природі. Таким чином, поліпептид, що є хімічно синтезованим або синтезованим в клітинній системі, відмінний від клітини, що є його природним джерелом, є "виділеним" з асоційованих з ним у природі компонентів. Також білок можна робити таким, що по суті не містить асоційованих з ним у природі компонентів, виділенням з використанням способів очищення білка, добре відомих у даній галузі.

Термін "виділення" стосується процесу, коли хімічна молекула, така як поліпептид, по суті не містить зв'язаних з нею в природі компонентів, за допомогою виділення, наприклад, з використанням способів очищення білків, добре відомих у даній галузі.

Термін "TNF- α людини" (позначається скорочено в даному описі як hTNF- α) включає димерний білок-цитокін. Термін включає гомотримерний білок, що містить три білки масою TNF- α 17,5 кДа. Гомотримерний білок позначають як "білок TNF- α ". Термін "TNF- α " людини включає рекомбінантний TNF- α людини (TNF- α), що може бути отриманий стандартними способами рекомбінантної експресії. Послідовність TNF- α людини представлена в таблиці 1.

Послідовність TNF-α людини

Білок	Ідентифікатор послідовності	Послідовність
		123456789012345678901234567890
TNF-α людини	SEQ ID NO:1	VRSSSRTPSDKPVANPQAEGQLQWLNDNRANALLANGVELRDNQL VVPSEGLYLIYSQVLFGKQGCPSTHVLLTHTISRIAVSYQTKVNLLSAIKSP CQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQV YFGIIAL

Термін "біологічна активність" стосується всіх властивих молекулі біологічних властивостей. Біологічні властивості TNF-α включають, але не обмежуються ними, зв'язування рецептора TNF.

- 5 Терміни "специфічне зв'язування" або "що специфічно зв'язується" відносно взаємодії антитіла, білка або пептиду з другою хімічною молекулою, означає, що взаємодія залежить від наявності конкретної структури (наприклад, антигенної детермінанти або епітопа) на хімічній молекулі; наприклад, антитіло розпізнає і зв'язує конкретну білкову структуру, а не білок загалом. Якщо антитіло є специфічним до епітопа "А", наявність молекули, що містить епітоп А
- 10 (вільного або неміченого А), у реакційній суміші, що містить мічений "А" і антитіло, буде знижувати кількість міченого А, що зв'язався з антитілом.

Термін "зв'язувальний білок" включає, але не обмежується ними, будь-яке антитіло або його антиген-зв'язувальну частину. Зв'язувальні білки також включають інші конструкції, що зберігають афінність зв'язування з мішенню. У деяких випадках, ці зв'язувальні білки можуть

15 мати структурну подібність з антитілами або їх антиген-зв'язувальними частинами, і вони також можуть мати структурні відмінності, що відрізняють їх від антитіл і їхніх антиген-зв'язувальних частин.

Термін "антитіло" у широкому значенні стосується будь-якої молекули імунoglobуліну (Ig), що містить чотири поліпептидні ланцюги: два важкі (H) ланцюги і два легкі (L) ланцюги, або

20 будь-якого її функціонального фрагмента, мутанту, варіанта або похідного, які зберігають істотні ознаки зв'язування епітопа молекулою Ig. Такі форми мутантів, варіантів або похідних антитіл відомі в даній галузі, і їх необмежуючі варіанти здійснення розглянуті нижче.

У повнорозмірному антитілі кожен важкий ланцюг містить варіабельну область важкого ланцюга (позначається скорочено в даному описі як HCVR або VH) і константну область

25 важкого ланцюга. Константна область важкого ланцюга містить три домена: CH1, CH2 і CH3. Кожен легкий ланцюг містить варіабельну область легкого ланцюга (позначається скорочено в даному описі як LCVR або VL) і константну область легкого ланцюга. Константна область легкого ланцюга містить один домен CL. Області VH і VL далі можуть бути підрозділені на області гіперваріабельності, що називаються визначальними комплементарними областями

30 (CDR), розташовані між областями, що є більш консервативними, які називаються каркасними областями (FR). Кожна VH і VL складається з трьох CDR і чотирьох FR, розташованих від N-кінця до C-кінця в наступному порядку: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Молекули імунoglobулінів можуть належати до будь-якого типу (наприклад, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA і IgY), класу (наприклад, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 і IgA2) або підкласу.

35 Термін "антиген-зв'язувальна частина" антитіла стосується одного або декількох фрагментів антитіла, що зберігають здатність специфічно зв'язуватися з антигеном (наприклад, hTNFα). Антиген-зв'язувальну функцію антитіла може виконувати один або декілька фрагментів повнорозмірного антитіла. Такі варіанти здійснення антитіл також можуть бути біспецифічними, що мають подвійну специфічність, або поліспецифічними, що специфічно зв'язуються з двома

40 або більше різними антигенами. Приклади зв'язувальних фрагментів, охоплюваних терміном "антиген-зв'язувальна частина" антитіла, включають (i) Fab-фрагмент - одновалентний фрагмент, що складається з доменів VL, VH, CL і CH1; (ii) F(ab')₂-фрагмент - двовалентний фрагмент, що містить два Fab-фрагменти, зв'язані дисульфідним зв'язком у шарнірній області; (iii) Fd-фрагмент, що складається з доменів VH і CH1; (iv) Fv-фрагмент, що складається з доменів VL і VH одного плеча антитіла, (v) dAb-фрагмент (Ward et al. (1989) Nature, 341: 544-546; Winter et al., публікація PCT № WO 90/05144), що містить один варіабельний домен; і (vi) окрему визначальну комплементарність область (CDR). Більше того, хоча два домена Fv-фрагменти, VL і VH, кодуються окремими генами, їх можна зв'язувати з використанням рекомбінантних способів синтетичним лінкером, що дозволяє одержання їх як єдиного білкового

45

ланцюга, у якій області VL і VH утворюють пари, формуючи одновалентні молекули (відомі як одноланцюжкові Fv (scFv); див. наприклад, Bird et al. (1988) Science 242:423-426; і Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Такі одноланцюжкові антитіла також охоплюються терміном "антиген-зв'язувальна частина" антитіла. Також охоплюються інші форми одноланцюжкових антитіл, такі як діантитіла. Діантитіла являють собою двовалентні біспецифічні антитіла, у яких домени VH і VL експресуються на одному поліпептидному ланцюзі, але з використанням лінкера, що є занадто коротким, щоб забезпечувати утворення пар між двома доменами на одному ланцюзі, тим самим змушуючи домени утворювати пари з комплементарними доменами іншого ланцюга і формувати дві антиген-зв'язувальні ділянки (див., наприклад, Holliger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak et al. (1994) Structure 2:1121-1123). Такі зв'язувальні частини антитіл відомі в даній галузі (Kontermann і Dubel eds., Antibody Engineering (2001) Springer-Verlag. New York. 790 pp. (ISBN 3-540-41354-5).

Термін "конструкція антитіла" стосується поліпептиду, що містить одну або декілька антиген-зв'язувальних частин, зв'язаних з лінкерним поліпептидом або константним доменом імуноглобуліну. Лінкерні поліпептиди містять два або більше амінокислотних залишків, зв'язаних пептидними зв'язками, і їх використовують для зв'язування однієї або декількох антиген-зв'язувальних частин. Такі лінкерні поліпептиди добре відомі в даній галузі (див., наприклад, Holliger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak et al. (1994) Structure 2:1121-1123). Константний домен імуноглобуліну стосується константного домену важкого (гамма) або легкого ланцюга (каппа і дельта). Амінокислотні послідовності константних доменів важких і легких ланцюгів IgG людини відомі в даній галузі і представлені в таблиці 2.

Таблиця 2

Послідовність константного домена
важкого ланцюга і константного домена легкого ланцюга IgG людини

Блок	Ідентифікатор послідовності	Послідовність
		12345678901234567890123456789012
Константна область гамма-1 Ig	SEQ ID NO:2	ASTKGPSVFLLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Мутантна константна область гамма-1 Ig	SEQ ID NO:3	ASTKGPSVFLLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Константна область каппа Ig	SEQ ID NO:4	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
Константна область лямбда Ig	SEQ ID NO:5	QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

Більше того, антитіло або його антиген-зв'язувальна частина можуть бути частиною більшої молекули імуноадгезії, утвореної ковалентним або нековалентним зв'язуванням антитіла або антиген-зв'язувальної частини з одним або декількома іншими білками або пептидами. Приклади таких молекул імуноадгезії включають застосування центральної області стрептавідину для одержання тетрамерної молекули scFv (Kipriyanov et al. (1995) Human Antibod. Hybridom. 6:93-101) і застосування залишку цистеїну, маркерного пептиду і C-кінцевої полігістидинової мітки для одержання двовалентних і біотинілованих молекул scFv (Kipriyanov et al. (1994) Mol. Immunol. 31: 1047-1058). Антиген-зв'язувальні частини антитіл, такі як Fab- і F(ab')₂-фрагменти, можна одержувати з цілих антитіл з використанням загальноприйнятих

способів, таких як розщеплення папаїном або пепсином, відповідно, цілих антитіл. Більше того, антитіла, їх антиген-зв'язувальні частини і молекули імуноадгезії можна одержувати з використанням стандартних способів рекомбінантних ДНК, як описано в даному описі.

Термін "виділене антитіло" стосується антитіла, що по суті вільне від інших антитіл, що мають відмінну специфічність зв'язування (наприклад, виділене антитіло, що специфічно зв'язує hTNF α , по суті вільне від антитіл, що специфічно зв'язують антигени, відмінні від hTNF α). Однак виділене антитіло, що специфічно зв'язує hTNF α , може мати перехресну реактивність до інших антигенів, таких як молекули TNF α з інших видів. Більше того, виділене антитіло може бути по суті вільне від іншого клітинного матеріалу і/або хімічних речовин.

Термін "антитіло людини" включає антитіла, що мають варіабельні і константні області з послідовностей імуноглобулінів ембріонального типу людини. Антитіла людини можуть включати амінокислотні залишки, не кодовані послідовностями імуноглобулінів ембріонального типу людини (наприклад, мутації, внесені випадковим або сайт-специфічним мутагенезом *in vitro* або за допомогою соматичної мутації *in vivo*), наприклад, у CDR, і зокрема, у CDR3. Однак термін "антитіло людини" не включає антитіла, у яких послідовності CDR, утворені з послідовностей ембріонального типу інших видів ссавців, таких як миша, пересажені в каркасні послідовності людини.

Термін "рекомбінантне антитіло людини" включає всі антитіла людини, що одержують, експресують, створюють або виділяють рекомбінантними способами, такі як антитіла, що експресуються з використанням рекомбінантного експресуючого вектора, трансфікованого в клітину-хазяїна (додатково описану в розділі II, нижче), антитіла, виділені з рекомбінантної комбінаторної бібліотеки антитіл людини (Hoogenboom (1997) TIB Tech. 15:62-70; Azzazy and Highsmith (2002) Clin. Biochem. 35: 425-445; Gavilondo and Larrick (2002) BioTechniques 29:128-145; Hoogenboom and Chames (2000) Immunol. Today 21: 371-378), антитіла, виділені з тварини (наприклад, миші), що є трансгенною по генах імуноглобулінів людини (див., наприклад, Taylor et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295; Kellermann and Green (2002) Current Opin. Biotechnol. 13:593-597; Little et al. (2000) Immunol. Today 21: 364-370), або антитіла, отримані, експресовані, утворені або виділені будь-яким іншим способом, що залучає сплайсинг послідовностей генів імуноглобулінів людини з іншими послідовностями ДНК. Такі рекомбінантні антитіла людини мають варіабельні і константні області, утворені з послідовностей імуноглобулінів ембріонального типу. Однак у визначених варіантах здійснення такі рекомбінантні антитіла людини піддають мутагенезу *in vitro* (або, коли використовують тварину, трансгенну по послідовностях Ig людини, вони піддаються соматичному мутагенезу *in vivo*), і, таким чином, амінокислотні послідовності областей VH і VL рекомбінантних антитіл являють собою послідовності, які, коли вони утворені з послідовностей VH і VL ембріонального типу людини або коли вони є спорідненими їм, можуть не існувати в природі в наборі антитіл ембріонального типу людини *in vivo*.

Термін "химерне антитіло" стосується антитіл, що містять послідовності варіабельних областей важкого і легкого ланцюгів з одного виду і послідовності константних областей з іншого виду, таких як антитіла, що мають варіабельні області важкого і легкого ланцюгів миші, зв'язані з константними областями людини.

Термін "антитіло з пересаженої CDR" стосується антитіл, що містять послідовності варіабельних областей важкого і легкого ланцюгів одного виду, але в яких послідовності однієї або декількох з областей CDR VH- і/або VL-областей замінені послідовностями CDR іншого виду, таких як антитіла, що мають варіабельні області важкого і легкого ланцюгів людини, у яких одна або декілька з CDR людини (наприклад, CDR3) замінені послідовностями CDR миші.

Термін "CDR" стосується визначальної комплементарності області у варіабельних послідовностях антитіла. У кожній з варіабельних областей важкого і легкого ланцюга є три CDR, що позначають як CDR1, CDR2 і CDR3, для кожної з варіабельних областей. Термін "набір CDR" стосується групи з трьох CDR, що зустрічаються в одній варіабельній області (тобто VH або VL) антиген-зв'язувального центра. Точні межі цих CDR визначаються по-різному відповідно до різних систем. Система, описана Кабат (Kabat et al. (1987, 1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland), не тільки забезпечує однозначну систему нумерації залишків, застосовну до будь-якої варіабельної області антитіла, але також надає точні межі залишків, що визначають три CDR. Ці CDR можуть бути позначені як CDR по Кабат. Chothia і колеги (Chothia and Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917 і Chothia et al. (1989) Nature 342:877-883) знайшли, що визначені ділянки в CDR по Кабат приймають практично ідентичні конформації пептидного кістяка, незважаючи на наявність великої різноманітності на рівні амінокислотної послідовності. Ці ділянки були позначені як L1, L2 і L3 або H1, H2 і H3, де "L" і "H" позначають області легкого ланцюга і важкого ланцюга, відповідно.

Ці області можуть бути позначені як CDR по Chothia, що мають межі, які перекривають CDR по Кабат. Інші межі, які визначають CDR, що перекриваються з CDR по Кабат, були описані Padlan et al. (FASEB J. 9:133-139 (1995)) і MacCallum et al. (J Mol. Biol 262 (5): 732-45 (1996)). Інші визначення меж CDR можуть не точно відповідати одній із систем, але проте, вони перекривають CDR по Кабат, хоча вони можуть мати більшу або меншу довжину з урахуванням передбачення або експериментальних даних про те, що конкретні залишки або групи залишків або навіть цілі CDR не роблять значного впливу на зв'язування антигену. У способах, використовуваних у рамках винаходу, можуть бути використані CDR, визначені відповідно до кожної з цих систем, хоча у визначених варіантах здійснення використовуються CDR, визначені по Кабат або Chothia.

Терміни "нумерація по Кабат", "визначення по Кабат" і "позначення по Кабат" використовують у даному описі взаємозамінний. Ці терміни стосуються системи нумерації амінокислотних залишків, що є більш варіабельними (тобто гіперваріабельними), ніж інші амінокислотні залишки у варіабельних областях важкого і легкого ланцюгів антитіла або його антиген-зв'язувальної частини (Kabat et al. (1971) Ann. NY Acad. Sci. 190:382-391 і Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242). Що стосується варіабельної області важкого ланцюга, гіперваріабельна область знаходиться в діапазоні амінокислотних положень з 31 по 35 для CDR1, амінокислотних положень з 50 по 65 для CDR2, і амінокислотних положень з 95 по 102 для CDR3. Що стосується варіабельної області легкого ланцюга, гіперваріабельна область знаходиться в діапазоні амінокислотних положень з 24 по 34 для CDR1, амінокислотних положень з 50 по 56 для CDR2 і амінокислотних положень з 89 по 97 для CDR3.

Розширення й аналіз великих суспільних баз даних амінокислотних послідовностей варіабельних областей важкого і легкого ланцюгів протягом останніх двадцяти років привели до розуміння типових меж між послідовностями каркасних областей (FR) і CDR у послідовностях варіабельних областей і дозволили фахівцям у даній галузі точно визначити CDR відповідно до нумерації Кабат, нумерації Chothia або інших систем. Див., наприклад, Martin, Kontermann and Dubel, eds., Antibody Engineering (Springer-Verlag, Berlin, 2001), chapter 31, pages 432-433. Прийнятний спосіб визначення амінокислотних послідовностей CDR по Кабат в амінокислотних послідовностях варіабельної області важкого ланцюга (VH) і варіабельної області легкого ланцюга (VL) представлений нижче:

Для ідентифікації амінокислотної послідовності CDR-L1:

Починається приблизно через 24 амінокислотних залишків від N-кінця області VL;

Залишок перед послідовністю CDR-L1 завжди являє собою цистеїн (C);

Залишок після послідовності CDR-L1 завжди являє собою залишок триптофану (W), як правило, Trp-Tyr-Gln (W-Y-Q), але також Trp-Leu-Gln (W-L-Q), Trp-Phe-Gln (W-F-Q) і Trp-Tyr-Leu (W-Y-L);

Довжина, як правило, складає від 10 до 17 амінокислотних залишків.

Для ідентифікації амінокислотної послідовності CDR-L2:

Починається завжди через 16 залишків після кінця CDR-L1;

Залишки перед послідовністю CDR-L2, як правило, являють собою Ile-Tyr (I-Y), але також Val-Tyr (V-Y), Ile-Lys (I-K) і Ile-Phe (I-F);

Довжина завжди складає 7 амінокислотних залишків.

Для ідентифікації амінокислотної послідовності CDR-L3:

Починається завжди через 33 амінокислоти після кінця CDR-L2;

Залишок перед амінокислотною послідовністю CDR-L3 завжди являє собою цистеїн (C);

Залишки після послідовності CDR-L3 завжди являють собою Phe-Gly-X-Gly (F-G-X-G) (SEQ ID NO: 6), де X являє собою будь-яку амінокислоту;

Довжина, як правило, складає від 7 до 11 амінокислотних залишків.

Для ідентифікації амінокислотної послідовності CDR-H1:

Починається приблизно через 31 амінокислотний залишок після N-кінця VH-області і завжди через 9 залишків після цистеїну (C);

Залишки перед послідовністю CDR-H1 завжди являють собою Cys-X-X-X-X-X-X-X (SEQ ID NO: 7), де X являє собою будь-яку амінокислоту;

Залишок після послідовності CDR-H1 завжди являє собою Trp (W), як правило, Trp-Val (W-V), але також Trp-Ile (W-I) і Trp-Ala (W-A);

Довжина, як правило, складає від 5 до 7 амінокислотних залишків.

Для ідентифікації амінокислотної послідовності CDR-H2:

Починається завжди через 15 амінокислотних залишків після кінця CDR-H1;

Залишки перед послідовністю CDR-H2, як правило, являють собою Leu-Glu-Trp-Ile-Gly (L-E-W-I-G) (SEQ ID NO: 8), а також інші варіанти;

Залишки після послідовності CDR-H2 являють собою Lys/Arg-Leu/Ile/Val/Phe/Thr/Ala-Thr/Ser/Ile/Ala (K/R-L/I/V/F/T/A-T/S/I/A);

5 Довжина, як правило, складає від 16 до 19 амінокислотних залишків.

Для ідентифікації амінокислотної послідовності CDR-H3:

Починається завжди через 33 амінокислотних залишки після кінця CDR-H2 і завжди через 3 залишки після цистеїну (C),

10 Залишки перед послідовністю CDR-H3 завжди являють собою Cys-X-X (C-X-X), де X являє собою будь-яку амінокислоту, як правило, Cys-Ala-Arg (C-A-R);

Залишки після послідовності CDR-H3 завжди являють собою Trp-Gly-X-Gly (W-G-X-G) (SEQ ID NO: 9), де X являє собою будь-яку амінокислоту;

Довжина, як правило, складає від 3 до 25 амінокислотних залишків.

15 Терміни "акцептор" і "акцепторне антитіло" стосуються антитіла або послідовності нуклеїнової кислоти, що забезпечує або кодує щонайменше приблизно 80 %, щонайменше приблизно 85 %, щонайменше приблизно 90 %, щонайменше приблизно 95 %, щонайменше приблизно 98 % або 100 % амінокислотних послідовностей однієї або декількох з каркасних областей. У деяких варіантах здійснення термін "акцептор" стосується амінокислотної послідовності або послідовності нуклеїнової кислоти антитіла, що забезпечує або кодує константну область(-і). В іншому варіанті здійснення термін "акцептор" стосується амінокислотної послідовності або послідовності нуклеїнових кислот антитіла, що забезпечує або кодує одну або декілька з каркасних областей і константну область(-і). У конкретному варіанті здійснення термін "акцептор" стосується амінокислотної послідовності або послідовності нуклеїнових кислот антитіла людини, що забезпечують або кодують щонайменше приблизно 20 80 %, щонайменше приблизно 85 %, щонайменше приблизно 90 %, щонайменше приблизно 95 %, щонайменше 98 % або приблизно 100 % амінокислотних послідовностей однієї або декількох з каркасних областей. Відповідно до цього варіанта здійснення акцептор може містити щонайменше 1, щонайменше 2, щонайменше 3, щонайменше 4, щонайменше 5 або щонайменше 10 амінокислотних залишків, що не зустрічаються в одному або декількох конкретних положеннях антитіла людини. Акцепторна каркасна область і/або акцепторна константна область(-і) може бути утворена або отримана, наприклад, з гена антитіла ембріонального типу, зрілого гена антитіла, функціонального антитіла (наприклад, антитіл, добре відомих у даній галузі, розроблювальних антитіл або комерційно доступних антитіл).

30 Термін "канонічний" залишок стосується залишку в CDR або каркасної області, що визначає конкретну канонічну структуру CDR, при визначенні по Chothia et al. (1987) J. Mol. Biol. 196:901-907 і Chothia et al. (1992) J. Mol. Biol. 227:799. Згідно Chothia et al., критичні положення CDR багатьох антитіл мають практично ідентичні конформації пептидного кістяка, незважаючи на велику різноманітність на рівні амінокислотної послідовності. Кожна канонічна структура визначає, головним чином, набір кутів повороту пептидного кістяка для безперервного сегмента 40 з амінокислотних залишків, що утворюють петлю.

Терміни "донор" і "донорне антитіло" стосуються антитіла, що надає одну або декілька CDR. У конкретному варіанті здійснення донорне антитіло являє собою антитіло з виду, що відрізняється від виду, з якого отримані або походять каркасні області. У контексті гуманізованого антитіла термін "донорне антитіло" стосується не антитіла, що не є людським, 45 що надає одну або декілька CDR.

Термін "каркасна область" або "послідовність каркасної області" стосується інших послідовностей варіабельної області без CDR. Оскільки точне визначення послідовності CDR можна проводити за допомогою різних систем, значення каркасної послідовності інтерпретують, відповідно, по-різному. Шість CDR (CDR-L1, -L2 і -L3 легкого ланцюга і CDR-H1, -H2 і -H3 50 важкого ланцюга) також поділяють каркасні області легкого ланцюга і важкого ланцюга на підобласті (FR1, FR2, FR3 і FR4) на кожному ланцюзі, у яких CDR1 розташована між FR1 і FR2, CDR2 розташована між FR2 і FR3, і CDR3 розташована між FR3 і FR4. Без указівки конкретних підобластей як FR1, FR2, FR3 або FR4, каркасна область, відповідно до інших джерел, являє собою об'єднані FR біля варіабельної області одного ланцюга імуноглобуліну, що зустрічається в природі. FR, вказана в однині, являє собою одну з чотирьох підобластей, і FR, вказані в множині, являють собою дві або більше з чотирьох підобластей, що складають каркасну область.

Акцепторні послідовності важкого ланцюга і легкого ланцюга людини відомі в даній галузі. В одному з варіантів здійснення винаходу акцепторні послідовності важкого ланцюга і легкого ланцюга людини вибрані з послідовностей, перерахованих у V-base (<http://vbase.mrc-> 60

сre.cam.ac.uk/) або в IMGT®, міжнародній системі ImMunoGeneTics information system® (<http://imgt.cines.fr/textes/IMGTrepertoire/LocusGenes/>). В іншому варіанті здійснення акцепторі послідовності важкого ланцюга і легкого ланцюга людини вибрані з послідовностей, описаних у таблиці 3 і таблиці 4.

5

Таблица 3

Акцепторні послідовності важкого ланцюга

SEQ ID NO:	Область білка	Послідовність
		12345678901234567890123456789012
10	VH1-18 FR1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT
11	VH1-18 FR2	WVRQAPGQGLEWMG
12	VH1-18 FR3	rvtmttdtststaymelrslrsddtavyyca
13	VH7-4.1 FR1	qvqlvqsgselkpgasvkvscasgytft
14	VH7-4.1FR2	wvrqapggglewmg
15	VH7-4.1 FR3	rfvsltdsvstaylqisslkaedtavyyca
16	JH1/JH4/JH5 FR4	WGQGTTLTVSS
17	JH2 FR4	WGRGTLTVSS
18	JH6 FR4	WGQGTTLTVSS
19	jh3 fR4	WGQGTMTVSS

Таблица 4

Акцепторні послідовності легкого ланцюга

SEQ ID NO:	Область білка	Послідовність
		12345678901234567890123456789012
20	1-39/o12 FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC
21	1-39/o12 FR2	WYQQKPGKAPKILY
22	1-39/o12 FR3	GVPSRFSGSGSGTdTFTLTISLQPEDFATYYC
23	6d-41/A14 FR1	dvVmTQSPaFISVTPgEKVTITC
24	6d-41/A14 FR2	WYQQKPDQaPKLLIK
25	6d-41/A14 FR3	GVPSRFSGSGSGTDFtTIsSLEAEDAATYYC
26	JK2 FR4	FGQGTLKLEIKr
27	jk5 fr4	fgqgtrleikr
28	jk1 fr4	fgqgkveikr
29	jk4 fr4	FGGGTKVEIKr
30	JK3 FR4	FGpGTKVdIKr

Термін "ген антитіла ембріонального типу" або "фрагмент гена" стосується послідовності імуноглобуліну, кодованої нелімфоїдними клітинами, що не піддавалася процесу дозрівання, що приведе до генетичного реаранжування і мутації для експресії конкретного імуноглобуліну. (Див., наприклад, Shapiro et al. (2002) Crit. Rev. Immunol. 22(3): 183-200; Marcatonis et al. (2001) Adv. Exp. Med. Biol. 484:13-30 (2001)). Одна з переваг, забезпечуваних різними варіантами здійснення є наслідком усвідомлення, що гени антитіла ембріонального типу з більшою імовірністю, ніж гени зрілих антитіл, зберігають основні структури амінокислотної послідовності, характерні для індивідуумів у виді, таким чином, вони з меншою імовірністю будуть розпізнаватися як послідовності з чужорідного джерела, при їхньому терапевтичному застосуванні в цього виду.

Термін "ключові" залишки стосується визначених залишків у варіабельній області, що впливають на специфічність зв'язування і/або афінність антитіла, зокрема, гуманізованого антитіла. Ключовий залишок включає, але не обмежується ними, один або декілька з наступних: залишок, сусідній з CDR, потенційна ділянка глікозилування (може являти собою ділянку або N-, або O-глікозилування), рідкий залишок, залишок, здатний взаємодіяти з антигеном, залишок, здатний взаємодіяти з CDR, канонічний залишок, контактний залишок між варіабельною областю важкого ланцюга і варіабельною областю легкого ланцюга, залишок у зоні Vernier і залишок в області, що перекриває варіабельну область важкого ланцюга CDR1, визначену по Chothia, і першу каркасну область важкого ланцюга, визначену по Кабат.

Термін "гуманізоване антитіло" стосується антитіл, що містять послідовності варіабельних областей важкого і легкого ланцюгів з виду, що не є людиною (наприклад, миші), але в який щонайменше частина послідовності VH і/або VL змінена так, щоб вона була більш "подібною до людської", тобто більш подібною з варіабельними послідовностями ембріонального типу людини. Одним з типів гуманізованого антитіла є антитіло з пересадженими CDR, у якому послідовності не є людськими CDR убудовані в послідовності VH і VL людини, для заміни відповідних послідовностей, які не є людськими послідовностями каркасної області (FR). Наприклад, "гуманізоване антитіло" являє собою антитіло або його варіант, похідне, аналог або фрагмент, що імуноспецифічно зв'язується з антигеном, що представляє інтерес, і які містять каркасну (FR) область, по суті амінокислотну послідовність, що має антитіла людини, і визначальну комплементарність область (CDR), по суті амінокислотну послідовність, що має антитіла, яке не є людським. Термін "по суті" у контексті CDR стосується CDR, що має амінокислотну послідовність, щонайменше приблизно на 80 %, щонайменше приблизно на 85 %, щонайменше приблизно на 90 %, щонайменше приблизно на 95 %, щонайменше приблизно на 98 % або щонайменше приблизно на 99 % ідентичну амінокислотній послідовності CDR антитіла, що не є людським. Гуманізоване антитіло містить по суті усі зі щонайменше одного, і як правило, двох, варіабельних доменів (Fab, Fab', F(ab')₂, Fab, Fv), у яких усі або по суті усі з CDR-областей відповідають CDR-областям не є людським імуноглобуліну (тобто, донорного антитіла), і всі або по суті усі з каркасних областей являють собою каркасні області консенсусної послідовності імуноглобуліну людини. В одному з варіантів здійснення гуманізоване антитіло також містить щонайменше частину константної області (Fc) імуноглобуліну, як правило, константної області імуноглобуліну людини. У деяких варіантах здійснення гуманізоване антитіло містить як легкий ланцюг, так і щонайменше варіабельний домен важкого ланцюга. Антитіло також може включати CH1-область, шарнірну область, CH2-, CH3- і CH4-області важкого ланцюга. У деяких варіантах здійснення гуманізоване антитіло містить тільки гуманізований легкий ланцюг. У деяких варіантах здійснення гуманізоване антитіло містить тільки гуманізований важкий ланцюг. У конкретних варіантах здійснення гуманізоване антитіло містить тільки гуманізований варіабельний домен легкого ланцюга і/або гуманізований важкий ланцюг.

Гуманізоване антитіло може бути вибрано з будь-якого класу імуноглобулінів, включаючи IgM, IgG, IgD, IgA і IgE, і будь-якого ізотипу, включаючи, але не обмежуючи ними, IgG1, IgG2, IgG і IgG4. Гуманізоване антитіло може містити послідовності з більше ніж одного або класу ізотипу, і конкретні константні домени можуть бути вибрані, щоб оптимізувати бажані ефекторні функції з використанням способів, добре відомих у даній галузі.

Каркасні області і CDR гуманізованого антитіла не обов'язково повинні точно відповідати вихідним послідовностям, наприклад, CDR донорного антитіла або консенсусну каркасну область можна піддавати мутагенезу заміщенням, вставкою і/або делецією щонайменше приблизно одного амінокислотного залишку, так щоб залишок CDR або каркасної області в цій ділянці не відповідав ні донорному антитілу, ні консенсусній каркасній області. У конкретному варіанті здійснення такі мутації не є великими. Як правило, щонайменше приблизно 80 %, щонайменше приблизно 85 %, щонайменше приблизно 90 % і щонайменше приблизно 95 % залишків гуманізованого антитіла будуть відповідати залишкам вихідних послідовностей FR і CDR. Термін "консенсусна каркасна область" стосується каркасної області в консенсусній послідовності імуноглобуліну. Термін "консенсусна послідовність імуноглобуліну" стосується послідовності, утвореної амінокислотами, що найчастіше зустрічаються (або нуклеотидами) у сімействі споріднених послідовностей імуноглобулінів (див. наприклад, Winnaker, (1987) *From Genes to Clones* (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany)). У такий спосіб "консенсусна послідовність імуноглобуліну" може включати "консенсусний варіабельний домен" і/або "консенсусний константний домен". "Консенсусний варіабельний домен", у свою чергу, може включати одну або декілька "консенсусних каркасних областей" і/або одну або декілька "консенсусних CDR". У сімействі імуноглобулінів кожне положення в консенсусній послідовності займає амінокислота, що зустрічається найчастіше в цьому положенні в сімействі. Якщо дві амінокислоти зустрічаються з однаковою частотою, кожна з них може бути включена в консенсусну послідовність.

Термін зона "Vernier" стосується підгрупи каркасних залишків, що можуть коректувати структуру CDR і регулювати відповідність антигену, як описано Foote and Winter (1992) *J. Mol. Biol.* 224:487-499). Залишки зони Vernier утворюють шар, що лежить під CDR, і вони можуть впливати на структуру CDR і афінність антитіла.

Термін "полівалентний зв'язувальний білок" використовують у даному описі для позначення зв'язувального білка, що містить дві або більше антиген-зв'язувальні ділянки. В одному варіанті

здійснення полівалентний зв'язувальний білок переважно конструюють, щоб він мав три або більше антиген-зв'язувальних ділянок, і, як правило, він являє собою антитіло, що не зустрічається в природі. Термін "поліспецифічний зв'язувальний білок" стосується зв'язувального білка, здатного зв'язувати дві або більше споріднені або неспоріднені мішені.

5 Зв'язувальні білки "з подвійним варіабельним доменом" ("DVD") за винаходом містять дві або більше антиген-зв'язувальні ділянки і являють собою чотиривалентні або полівалентні зв'язувальні білки. Такі зв'язувальні білки з DVD можуть бути моноспецифічними, тобто здатними зв'язувати один антиген, або поліспецифічними, тобто здатними зв'язувати два або більше антигенів. Зв'язувальний білок з DVD, що містить два поліпептиди DVD важкого ланцюга і два поліпептиди DVD легкого ланцюга, називають молекулою DVD-IgTM. Кожна половина DVD-Ig містить поліпептид DVD важкого ланцюга і поліпептид DVD легкого ланцюга, і дві антиген-зв'язувальні ділянки. Кожна зв'язувальна ділянка містить варіабельний домен важкого ланцюга і варіабельний домен легкого ланцюга усього з 6 CDR, залученими до зв'язування антигену, на антиген-зв'язувальну ділянку. Зв'язувальні білки з DVD і способи одержання зв'язувальних білків з DVD описані в патенті США № 7612181.

Один аспект стосується зв'язувального білка з DVD, що включає зв'язувальні білки, здатні зв'язувати TNF α . В одному варіанті здійснення зв'язувальний білок з DVD здатний зв'язувати TNF- α і другу мішень.

Термін "нейтралізуючий" стосується нейтралізації біологічної активності цитокіну, коли зв'язувальний білок специфічно зв'язується з цитокіном. В одному варіанті здійснення нейтралізуючий зв'язувальний білок являє собою нейтралізуюче антитіло, зв'язування якого з hTNF- α приводить до інгібування біологічної активності hTNF- α . В одному варіанті здійснення нейтралізуючий зв'язувальний білок зв'язує hTNF α і знижує біологічну активність hTNF- α щонайменше приблизно на 20 %, щонайменше приблизно на 40 %, щонайменше приблизно на 60 %, щонайменше приблизно на 80 %, щонайменше приблизно на 85 % або більше. Інгібування біологічної активності hTNF α нейтралізуючим зв'язувальним білком можна оцінювати шляхом вимірювання одного або декількох індикаторів біологічної активності hTNF- α , добре відомих у даній галузі. Наприклад, індикатором є нейтралізація цитотоксичності TNF α на клітинах L929.

Термін "активність" включає види активності, такі як специфічність/афінність зв'язування антитіла з антигеном, наприклад, антитіла проти hTNF- α , що зв'язується з антигеном TNF- α , і/або нейтралізуюча ефективність антитіла, наприклад, антитіла проти hTNF- α , зв'язування якого з hTNF- α інгібує біологічну активність hTNF- α , наприклад, нейтралізує цитотоксичність TNF α на клітинах L929.

Термін "епітоп" включає будь-яку поліпептидну детермінанту, здатну специфічно зв'язуватися з імуноглобуліном або Т-клітинним рецептором. У визначених варіантах здійснення детермінанти епітопів включають хімічно активні поверхневі групи молекул, такі як амінокислоти, бічні ланцюги цукрів, фосфорил або сульфоніл, і, у визначених варіантах здійснення, вона може мати конкретні характеристики тривимірної структури і/або конкретні характеристики заряду. Епітоп являє собою область антигену, що зв'язується антитілом. Таким чином, епітоп складається з амінокислотних залишків області антигену (або його фрагмента), про які відомо, що вони зв'язуються з комплементарною ділянкою на специфічному зв'язувальному партнері. Антигенний фрагмент може містити більше одного епітопа. У визначених варіантах здійснення, антитіло специфічно зв'язує антиген, коли воно переважно розпізнає його антиген-мішень у комплексній суміші білків і/або макромолекул. Таким чином, епітоп складається з амінокислотних залишків області антигену (або його фрагмента), про які відомо, що вони зв'язуються з комплементарною ділянкою на специфічному зв'язувальному партнері. Антигенний фрагмент може містити більше одного епітопа.

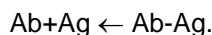
Термін "поверхневий плазмонний резонанс" стосується оптичного явища, що дозволяє аналіз у режимі реального часу біоспецифічних взаємодій шляхом виявлення змін концентрацій білків на біосенсорній матриці, наприклад, з використанням системи BIACORE (Biacore International AB, a GE Healthcare company, Uppsala, Sweden and Piscataway, New Jersey). Для додаткових описів, див. Jonsson et al. (1993) Ann. Biol. Clin. 51: 19-26; Jonsson et al. (1991) Biotechniques 11:620-627; Johnsson et al. (1995) J. Mol. Recognit. 8:125-131; і Johnsson et al. (1991) Anal. Biochem. 198:268-277.

Термін " K_{on} " стосується константи швидкості асоціації для асоціації зв'язувального білка (наприклад, антитіла) з антигеном з утворенням, наприклад, комплексу антитіло/антиген, як відомо в даній галузі. " K_{on} " також відома під термінами "константа швидкості асоціації" або " k_a ", Як використовують у рамках винаходу взаємозамінно. Цю величину вказує на швидкість

зв'язування антитіла з його мішенню або швидкість утворення комплексу між антитілом і антигеном, як показано за допомогою рівняння:



Термін " K_{off} " стосується константи швидкості дисоціації зв'язувального білка (наприклад, антитіла) з, наприклад, комплексу антитіло/антиген), як відомо в даній галузі. " K_{off} " також відома під термінами "константа швидкості дисоціації" або " k_d ", як використовують у даному описі взаємозамінно. Ця величина, указує на швидкість дисоціації антитіла від його мішені або поділу комплексу Ab-Ag з часом на вільне антитіло й антиген, як показують за допомогою рівняння, нижче:



Терміни "рівноважна константа дисоціації" або " K_D ", як використовують у даному описі взаємозамінно, стосуються величини, одержуваної шляхом титраційного вимірювання при рівновазі, або шляхом розподілу константи швидкості дисоціації (K_{off}) на константу швидкості асоціації (K_{on}). Константу швидкості асоціації, константу швидкості дисоціації і рівноважну константу дисоціації використовують для відображення афінності зв'язування антитіла з антигеном. Способи визначення констант швидкості асоціації і дисоціації добре відомі в даній галузі. Застосування флуоресцентних способів забезпечує високу чутливість і можливість досліджувати зразки у фізіологічних буферах при рівновазі. Можна використовувати інші експериментальні підходи й інструменти, такі як BIACORE (аналіз біомолекулярної взаємодії) (наприклад, інструмент, доступний від BIAcore International AB, GE Healthcare company, Uppsala, Швеція). Крім того, також можна використовувати KinExA® (аналіз кінетики виключення), доступний від Savidyne Instruments (Boise, Idaho).

Термін "мічений зв'язувальний білок" стосується білка з міткою, що забезпечує ідентифікацію зв'язувального білка. В одному з варіантів здійснення мітка являє собою маркер, що піддається виявленню, як наприклад, включення радіоактивно міченої амінокислоти або приєднання до поліпептиду біотинільних груп, які можна виявляти за допомогою маркірованого авідину (наприклад, стрептавідину, що містить флуоресцентний маркер або маркер, що має ферментативну активність, яку можна виявляти оптичними або колориметричними способами). Приклади міток для поліпептидів включають, але не обмежуються ними, наступні: радіоізотопи або радіонукліди (наприклад, ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho або ^{153}Sm); флуоресцентні мітки (наприклад, FITC, родамін, лантаноїдні люмінофори), ферментні мітки (наприклад, пероксидаза хрому, люцифераза, лужна фосфатаза); хемілюмінесцентні маркери; біотинільні групи; визначені поліпептидні епітопи, розпізнавані вторинним репортером (наприклад, парні послідовності "лейцинових блискавок", ділянки зв'язування для вторинних антитіл, домени, що зв'язують метал, і епітопні мітки); і магнітні агенти, такі як хелати гадолінію.

Термін "кон'югат антитіла" стосується зв'язувального білка, такого як антитіло, хімічно зв'язаного з другою хімічною групою, такою як терапевтичний або цитотоксичний засіб. Термін "засіб" позначає хімічну сполуку, суміш хімічних сполук, біологічну макромолекулу або екстракт, отримані з біологічних матеріалів. В одному варіанті здійснення терапевтичний або цитотоксичний засоби включають, але не обмежуються ними, коклюшний токсин, таксол, цитохалазин В, граміцидин D, бромід етидію, еметин, мітоміцин, етопозид, тенопозид, вінкристин, вінбластин, колхіцин, доксорубіцин, даунорубіцин, дигідроксіантрацидін, мітоксантрон, мітраміцин, актиноміцин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоїди, прокаїн, татракаїн, лідокаїн, пропранолол і пуроміцин і їх аналоги або гомологи.

Терміни "кристал" і "кристалізований" стосуються антитіла або його антиген-зв'язувальної частини, що існують у формі кристала. Кристали являють собою одну з форм твердого стану речовини, що відрізняється від інших форм, таких як аморфний твердий стан або рідкокристалічний стан. Кристали складаються з регулярних, повторюваних, тривимірних структур з атомів, іонів, молекул (наприклад, білків, таких як антитіла) або молекулярних агрегатів (наприклад, комплексів антиген/антитіло). Ці тривимірні структури упорядковані відповідно до визначеної математичної залежності, що добре зрозуміла в даній галузі. Основна ланка або структурний блок, що повторюється в кристалі, називають асиметричним елементом. Повторення асиметричного елемента в порядку, що надає даної чітко визначеної кристалографічної симетрії, забезпечує "елементарну комірку" кристала. Повторення елементарної комірки за допомогою правильного руху у всіх трьох вимірах дає кристал. Див. Giege and Ducruix (1999) Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach, 2nd ea., pp. 20 1-16, Oxford University Press, New York, New York.

Термін "полінуклеотид" означає полімерну форму з двох або більше нуклеотидів: або рибонуклеотидів, або дезоксинуклеотидів, або модифіковану форму нуклеотидів будь-якого типу. Термін включає одноланцюжкову і дволанцюжкову форми ДНК або РНК.

Термін "виділений полінуклеотид" означає полінуклеотид (наприклад, геномного походження, із кДНК, або синтетичного походження, або їх комбінації), що не асоційований із усім полінуклеотидом, або частиною, з якими він асоційований у природі; з якими він функціонально зв'язаний у природі; або з якими він зустрічається в природі як частину більшої послідовності.

Термін "вектор" стосується молекули нуклеїнової кислоти, здатної транспортувати іншу нуклеїнову кислоту, з якою вона зв'язана. Одним з типів вектора є "плазмід", що стосується кільцевої дволанцюжкової петлі ДНК, у яку можна лігувати додаткові сегменти ДНК. Іншим типом вектора є вірусний вектор, де у вірусний геном можуть бути ліговані додаткові сегменти ДНК. Деякі вектори здатні до аутосомної реплікації в клітині-хазяїні, у якій вони введені (наприклад, бактеріальні вектори, що мають бактеріальний оріджин реплікації і епісомні вектори ссавців). Інші вектори (наприклад, неепісомні вектори ссавців) можуть вбудовуватися в геном клітини-хазяїна при введенні в клітину-хазяїна, і, тим самим, реплікуватися разом з геномом хазяїна. Більше того, визначені вектори здатні спрямовувати експресію генів, з якими вони функціонально зв'язані. Такі вектори позначають у даному описі як "рекомбінантні експресуючі вектори" (або просто, "експресуючі вектори"). Як правило, експресуючі вектори, застосовні в способах рекомбінантних ДНК, часто мають форму плазмід. У даному описі, терміни "плазмід" і "вектор" можуть бути використані взаємозамінно, оскільки плазмід є найчастіше використовуваною формою вектора. Однак мають на увазі, що варіанти здійснення включають інші форми експресуючих векторів, такі як вірусні вектори (наприклад, ретровіруси з дефектом реплікації, аденовіруси й аденоасоційовані віруси), що виконують еквівалентні функції.

Термін "функціонально зв'язаний" стосується розташування компонентів, так щоб вони могли функціонувати передбачуваним для них чином. Послідовність контролю, "функціонально зв'язану" з кодуючою послідовністю, лігують таким чином, щоб досягати експресії кодуючої послідовності, в умовах, сумісних з послідовностями контролю. "Функціонально зв'язані" послідовності включають послідовності контролю експресії, що є суміжними з нуклеїною кислотою, що представляє інтерес, і послідовності контролю експресії, що здійснюють трансрегуляцію, тобто розташовані на іншій молекулі нуклеїнової кислоти щодо нуклеїнової кислоти, що представляє інтерес, але, проте, здійснюють їхній контроль над нуклеїною кислотою, що представляє інтерес, і послідовності контролю експресії, що розташовані на тій же молекулі нуклеїнової кислоти, що і нуклеїнова кислота, яка представляє інтерес, але на відстані від неї. Термін "послідовність контролю експресії" стосується полінуклеотидних послідовностей, що необхідні для здійснення експресії і процесингу кодуючої послідовностей, з якими вони ліговані. Послідовності контролю експресії включають відповідні послідовності ініціації, термінації транскрипції, промоторні і енхансерні послідовності; сигнали ефективного процесингу РНК, такі як сигнали сплайсингу і поліаденілування; послідовності, що стабілізують цитоплазматичну мРНК; послідовності, що підсилюють ефективність трансляції (тобто консенсусна послідовність Козака); послідовності, що підсилюють стабільність білка; і, якщо бажано, послідовності, що підсилюють секрецію білка. Тип таких послідовностей контролю відрізняється, залежно від організму хазяїна; у прокаріотах такі послідовності контролю, як правило, включають промотор, ділянку зв'язування рибосом і послідовність термінації транскрипції; у еукаріот, як правило, такі послідовності контролю включають промотори і послідовність термінатора транскрипції. Термін "послідовності контролю" включає компоненти, наявність яких необхідно для експресії і процесингу, і також він може включати додаткові компоненти, наявність яких є переважним, наприклад, лідерні послідовності і послідовності партнера по злиттю.

"Трансформація", як визначають у рамках винаходу, стосується будь-якого процесу, за допомогою якого ДНК проникає в клітину-хазяїна. Трансформація може відбуватися в природних або штучних умовах з використанням різних способів, добре відомих у даній галузі, для вбудовування послідовностей чужорідних нуклеїнових кислот, наприклад, у прокаріотичну або еукаріотичну клітину-хазяїна. Спосіб вибирають, виходячи з трансформованої клітини-хазяїна, і він може включати, але не обмежуватися ними, вірусну інфекцію, електропорацію, ліпофекцію і бомбардування частками. Такі "трансформовані" клітини включають стабільно трансформовані клітини, у яких убудована ДНК здатна реплікуватися або як плазмід, що аутосомно реплікується, або як частина хромосоми хазяїна. Також вони включають клітини, що тимчасово експресують убудовану ДНК або РНК протягом обмежених періодів часу.

Термін "рекомбінантна клітина-хазяїн" (або просто "клітина-хазяїн") стосується клітини, у яку вводять екзогенну ДНК. Варто розуміти, що такі терміни стосуються не тільки конкретної розглянутої клітини, але також нащадків такої клітини. Оскільки в наступних поколіннях можуть відбуватися визначені модифікації внаслідок або мутації, або впливів навколишнього середовища, такі нащадки, у дійсності, можуть не бути ідентичними батьківській клітині, однак

вони, проте, включені в об'єм терміну "клітина-хазяїн". В одному з варіантів здійснення клітини-хазяїни включають прокаріотичні і еукаріотичні клітини, вибрані з кожного з царств живих організмів. В одному варіанті здійснення еукаріотичні клітини включають одноклітинні організми, клітини грибів, рослин і тварин. В одному варіанті здійснення клітини-хазяїни включають, але не обмежуються ними, лінію прокаріотичних клітин *Escherichia coli*; клітинні лінії ссавців CHO, HEK 293 і COS; клітинну лінію комах Sf9; і клітини грибів *Saccharomyces cerevisiae*.

Для одержання рекомбінантних ДНК, синтезу олігонуклеотидів і культивування тканин і трансформації (наприклад, електропорація, ліпофекція) можна використовувати стандартні способи. Ферментативні реакції і способи очищення можна проводити відповідно до вказівок виготівника або як звичайно проводять у даній галузі, або як описано в даному описі. Вказані вище способи і процеси можна виконувати, головним чином, відповідно до загальноприйнятих способів, добре відомих в даній галузі, і як описано в різних загальних і більш конкретних посиланнях, що цитовані і розглянуті протягом даного опису. Див. наприклад, Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)).

Термін "трансгенний організм" стосується організму, що має клітини, які містять трансген, де трансген, введений в організм (або батьківський організм), експресує поліпептид, що не експресується в організмі в природі. "Трансген" являє собою конструкцію ДНК, що стабільно і функціонально убудована в геном клітини, з якої розвивається трансгенний організм, на пряму експресію кодованого продукту гена в одному або декількох типах клітин або тканин трансгенного організму.

Терміни "регулює" і "модулює" використовують взаємозамінно, і вони стосуються переключення або зміни активності молекули, що представляє інтерес, (наприклад, біологічної активності hTNF- α). Модулювання може являти собою підвищення або зниження інтенсивності визначеної або активності функції молекули, що представляє інтерес. Ілюстративні види активності і функції молекули включають, але не обмежуються ними, характеристики зв'язування, ферментативну активність, активацію клітинного рецептора і передачу сигналу.

Відповідно, термін "модулятор" являє собою сполуку, здатну переключати або змінювати активність або функцію молекули, що представляє інтерес, (наприклад, біологічну активність hTNF- α). Наприклад, модулятор може викликати підвищення або зниження інтенсивності визначеної активності або функції молекули в порівнянні з інтенсивністю або активності функції, що спостерігається за відсутності модулятора. У визначених варіантах здійснення модулятор являє собою інгібітор, що знижує інтенсивність щонайменше одного виду активності або функції молекули. Ілюстративні інгібітори включають, але не обмежуються ними, білки, пептиди, антитіла, пептидні антитіла, вуглеводи або низькомолекулярні органічні сполуки. Пептидні антитіла описані, наприклад, у публікації WO01/83525.

Термін "агоніст" стосується модулятора, що при контактуванні з молекулою, що представляє інтерес, викликає підвищення інтенсивності визначеного виду або активності функції молекули в порівнянні з інтенсивністю виду або активності функції, що спостерігається під час відсутності агоніста. Конкретні представляючі інтерес агоністи можуть включати, але не обмежуватися ними, поліпептиди TNF- α або поліпептиди, нуклеїнові кислоти, або вуглеводи будь-які інші молекули, що зв'язуються з hTNF- α .

Терміни "антагоніст" або "інгібітор" стосуються модулятора, що при контактуванні з молекулою, що представляє інтерес, викликає зниження інтенсивності визначеного виду або активності функції молекули в порівнянні з інтенсивністю виду або активності функції, що спостерігається під час відсутності антагоніста. Конкретні антагоністи, що представляють інтерес, включають антагоністи, що блокують або модулюють біологічну або імунологічну активність hTNF- α . Антагоністи й інгібітори hTNF- α можуть включати, але не обмежуватися ними, білки, нуклеїнові кислоти, вуглеводи або будь-які інші молекули, що зв'язуються з hTNF- α .

Термін "ефективна кількість" стосується кількості лікарського засобу, що є достатнім для зниження або зм'якшення ваги і/або зменшення тривалості або порушення одного або декількох його симптомів, запобігання прогресування порушення, забезпечення регресії порушення, запобігання рецидиву, розвитку, виникнення або прогресування одного або декількох симптомів, асоційованих з порушенням, виявлення порушення, або посилення або поліпшення профілактичного або терапевтичного ефекту(-ів) іншої терапії (наприклад, профілактичного або терапевтичного засобу).

Термін "біологічний зразок" включає, але не обмежується ними, будь-яка кількість матеріалу з живої істоти або раніше живої істоти. Такі живі істоти включають, але не обмежуються ними, людей, мишей, щурів, мавп, собак, кроликів і інших тварин. Такі матеріали включають, але не

обмежуються ними, кров, сироватку, сечу, синовіальну рідину, клітини, органи, тканини, кістковий мозок, лімфатичні вузли і селезінку.

Антитіла, що зв'язують TNF- α людини

Один аспект стосується виділених моноклональних антитіл миші або їх антиген-зв'язувальних частин, що зв'язуються з TNF з високою афінністю, низькою швидкістю дисоціації і високою нейтралізуючою здатністю. Другий аспект стосується химерних антитіл, що зв'язують TNF- α . Третій аспект стосується антитіл з пересадженими CDR або їх антиген-зв'язувальних частин, що зв'язують TNF- α . Четвертий аспект стосується гуманізованих антитіл або їхніх антиген-зв'язувальних частин, що зв'язують TNF- α . В одному варіанті здійснення антитіла або їхні частини являють собою виділені антитіла. В одному варіанті здійснення антитіла являють собою нейтралізуючі антитіла проти TNF- α людини.

А. Спосіб одержання антитіл проти TNF- α антитіла

Антитіла можна одержувати кожним з ряду способів, відомих у даній галузі.

1. Одержання моноклональних антитіл проти TNF- α з використанням технології гібридом

Моноклональні антитіла можна одержувати з використанням широкої множини способів, відомих у даній галузі, включаючи застосування гібридом, рекомбінантні технології і технології фагового дисплею або їхнє поєднання. Наприклад, моноклональні антитіла можна одержувати з використанням способів гібридом, що включає способи, відомі в даній галузі й описані, наприклад, у Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, 2nd ed., (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1988); Hammerling, et al. eds., "Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas" In *Research Monographs in Immunology*, vol. 3 (J.L. Turk, General Editor) (Elsevier, N.Y., 1981). Термін "моноклональне антитіло" не обмежується антитілами, продукованими технологією гібридом. Термін "моноклональне антитіло" стосується антитіла, що отримано з одного клону, що включає будь-який еукаріотичний, прокаріотичний або фаговий клон, а не способу, за допомогою якого воно отримано.

Способи продукування і скринінгу специфічних антитіл з використанням технології гібридом є загальноприйнятими і добре відомі в даній галузі. Один варіант здійснення стосується способів одержання моноклональних антитіл, а також антитіл, що продукується способом, який включає культивування клітини гібридами, що секретує антитіло, де, в одному варіанті здійснення, гібридома отримана злиттям спленоцитів, виділених з миші, імунізованої антигеном, із клітинами мієломи, а потім скринінг гібридом, отриманих злиттям, відносно клонів гібридами, що секретують антитіло, здатне зв'язувати поліпептид. У короткому викладі, мишей можна імунізувати антигеном TNF- α . В одному варіанті здійснення для стимуляції імунної відповіді антиген TNF- α вводять з ад'ювантом. Такі ад'юванти включають повний або неповний ад'ювант Фрейнда, RIBI (мураміддипептиди) або ISCOM (імуностимулюючі комплекси). Такі ад'юванти можуть захищати поліпептид від швидкого розсіювання шляхом ізоляції в локальному депо, або вони можуть містити речовини, що стимулюють секрецію хазяїном факторів, що є хемотаксичними факторами для макрофагів і інших компонентів імунної системи. В одному варіанті здійснення, якщо вводять поліпептид, схема імунізації включає два або більше введення поліпептиду, розосереджених на декількох тижнів.

Після імунізації тварини антигеном TNF- α , із тварини можна одержувати антитіла і/або антитілопродукуючі клітини. Сироватку, що містить антитіло проти TNF- α , одержують із тварини шляхом забору крові або умиртвіння тварини. Сироватку можна використовувати в такому вигляді, як її одержують із тварини, із сироватки можна одержувати фракцію імуноглобулінів або із сироватки можна очищати антитіла проти TNF- α . або Сироватка імуноглобуліни, отримані таким чином, є поліклональними, таким чином, що мають гетерогенний набір властивостей.

Після виявлення імунної відповіді в сироватці миші виявляють, наприклад, антитіла, специфічні до антигену TNF- α , селезінку мишей витягають і виділяють спленоцити. Потім спленоцити піддають злиттю добре відомими способами з будь-якими придатними клітинами мієломи, наприклад, клітинами з клітинної лінії SP20, доступної від ATCC. Гібридами піддають селекції і клонують способом лімітуючи розведення. Потім клони гібридами оцінюють способами, відомими в даній галузі, відносно клітин, що секретують антитіла, здатні зв'язувати TNF- α . Асцитну рідину, що, як правило, містить високі рівні антитіл, можна одержувати імунізацією мишей позитивними клонами гібридом.

В іншому варіанті здійснення з імунізованої тварини можна одержувати антитілопродукуючі іморталізовані гібридами. Після імунізації тварину умиртвляють і В-клітини селезінки піддають злиттю з іморталізованими клітинами мієломи, як добре відомо в даній галузі. Див., наприклад, Harlow and Lane, вище. В одному варіанті здійснення клітини мієломи не секретують поліпептиди імуноглобулінів (несекретуюча клітинна лінія). Після злиття і селекції на антибіотику, гібридами піддають скринінгу з використанням TNF- α або його частини, або

клітини, експресуючі TNF- α . В одному варіанті здійснення вихідний скринінг проводять з використанням твердофазного імуноферментного аналізу (ELISA) або радіоімунного аналізу (RIA). Приклад скринінгу за допомогою ELISA наданий у публікації міжнародної заявки № WO 00/37504.

Гібридами, які продукують антитіло проти TNF- α , піддають селекції, клонують і далі піддають скринінгу відносно необхідних ознак, включаючи активний ріст гібридами, високу продукцію антитіл і необхідні характеристики антитіла, як додатково розглянуто нижче. Гібридами можна культивувати і розмножувати *in vivo* у сингенних тварин, у тварин, що позбавлені імунної системи, наприклад, у мишей nude, або в клітинній культурі *in vitro*. Способи селекції, клонування і розмноження гібридом добре відомі фахівцям у даній галузі.

В одному варіанті здійснення гібридами являють собою гібридами миші, як описано вище. В іншому кращому варіанті здійснення одержують гібридами видів не людини і не миші, таких як щура, вівці, свині, кози, велика рогата худоба або коні. В іншому варіанті здійснення, гібридами являють собою гібридами людини, у яких несекретуючу мієлому людини піддають злиттю з клітиною людини, експресуючою антитіло проти TNF- α .

Фрагменти антитіл, що розпізнають визначені епітопи, можна одержувати відомими способами. Наприклад, Fab- і F(ab')₂-фрагменти можна одержувати протеолітичним розщепленням молекул імуноглобулінів з використанням ферментів, таких як папаїн (для одержання Fab-фрагментів) або пепсин (для одержання F(ab')₂-фрагментів). F(ab')₂-фрагменти містять варіабельну область, константну область легкого ланцюга і CH1-домен важкого ланцюга.

2. Одержання моноклональних антитіл проти TNF- α з використанням SLAM

В іншому аспекті одержують рекомбінантні антитіла з одиничних виділених лімфоцитів з використанням способу, називаного в даній галузі способом одержання антитіл з підданих селекції лімфоцитів (SLAM), як описано в патенті США № 5627052; публікації PCT № WO 92/02551 і Babcook et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7843-7848. У цьому способі окремі клітини, секретуючі антитіла, що представляють інтерес, наприклад, лімфоцити, отримані з імунізованих тварин, піддають скринінгу з використанням аналізу антигенспецифічних гемолітичних бляшок, де антиген TNF- α , субодиницю TNF- α або їхній фрагмент зв'язують з еритроцитами вівці з використанням лінкера, такого як біотин, і використовують для ідентифікації окремих клітин, що секретують антитіла зі специфічністю до TNF- α . Після ідентифікації представляючих інтерес секретуючих антитіло клітин з цих клітин одержують кДНК варіабельних областей важкого і легкого ланцюгів за допомогою ПЛР зі зворотною транскриптазою, і ці варіабельні ділянки потім можна експресувати зв'язаними з відповідними константними ділянками імуноглобулінів (наприклад, константними ділянками людини) у клітинах-хазяїнах ссавців, таких як клітини COS або CHO. Потім клітини-хазяїни, трансфіковані ампліфікованими послідовностями імуноглобулінів, отриманих з підданих селекції *in vivo* лімфоцитів, можна подавати подальшому аналізу і селекції *in vitro*, наприклад, за допомогою пенінгу трансфікованих клітин для виділення клітин, експресуючих антитіла до TNF- α . Ампліфікованими послідовностями імуноглобулінів можна далі маніпулювати *in vitro*, наприклад, способами дозрівання афінності *in vitro*, такими як способи, описані в публікаціях PCT № WO 97/29131 і WO 00/56772.

3. Одержання моноклональних антитіл проти TNF- α з використанням трансгенних тварин

В іншому варіанті здійснення антитіла одержують імунізацією тварини, що не є людиною, що містить частину або весь локус імуноглобулінів людини, антигеном TNF- α . В одному варіанті здійснення тварина, що не є людиною, являє собою трансгенну мишу XENOMOUSE, отриману способами інженерії лінії мишей, що містить великі фрагменти локусів імуноглобулінів людини і є дефіцитною по продукції антитіл миші. Див., наприклад, Green et al. (1994) Nature Genet. 7:13-21, і патенти США № 5916771; 5939598; 5985615; 5998209; 6075181; 6091001; 6114598 і 6130364. Також див. публікації PCT № WO 91/10741; WO 94/02602; WO 96/34096; WO 96/33735; WO 98/16654; WO 98/24893; WO 98/50433; WO 99/45031 WO 99/53049; WO 00/09560 і WO 00/37504. У трансгенній миші XENOMOUSE® продукується набір цілком людських антитіл, подібний до набору дорослої людини, і утворюються антигенспецифічні моноклональні антитіла людини. Трансгенна миша XENOMOUSE® містить приблизно 80 % набору антитіл людини унаслідок введення фрагментів YAC розміром, що складає мільйони пар основ, з ембріональною конфігурацією локусів важкого ланцюга людини і локусів легкого ланцюга людини. Див. Mendez et al. (1997) Nature Genet. 15: 146-156 і Green and Jakobovits (1998) J. Exp. Med. 188:483-495.

4. Одержання моноклональних антитіл проти TNF- α з використанням бібліотек рекомбінантних антитіл

Також для одержання антитіл можна використовувати способи *in vitro*, де бібліотеку антитіл піддають скринінгу для ідентифікації антитіла, що має необхідну специфічність зв'язування. Способи такого скринінгу бібліотек рекомбінантних антитіл добре відомі в даній галузі і включають способи, описані, наприклад, у патенті США № 5223409; публікаціях PCT № WO 92/18619, WO 91/17271, WO 92/20791, WO 92/15679, WO 93/01288, WO 92/01047, WO 92/09690; WO 97/29131; Fuchs et al. (1991) *Bio/Technology* 9:1369-1372; Hay et al. (1992) *Hum. Antibod. Hybridomas* 3:81-85; Huse et al. (1989) *Science* 246:1275-1281; McCafferty et al. (1990) *Nature* 348:552-554; Griffiths et al. (1993) *EMBO J.* 12:725-734; Hawkins et al. (1992) *J. Mol. Biol.* 226:889-896; Clackson et al. (1991) *Nature* 352:624-628; Gram et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3576-3580; Garrard et al. (1991) *Bio/Technology* 9:1373-1377; Hoogenboom et al. (1991) *Nucl. Acids Res.* 19:4133-4137; і Barbas et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7978-7982, і публікації патенту США № 2003/0186374.

Бібліотека рекомбінантних антитіл може бути з будь-якого індивідуума, імунізованого TNF- α або частиною TNF- α . Альтернативно, бібліотека рекомбінантних антитіл може бути з наївного індивідуума, тобто індивідуума, якого не імунізували TNF- α , така як бібліотека, отримана від людини, яку не імунізували TNF- α людини. Антитіла відбирають скринінгом бібліотеки рекомбінантних антитіл за допомогою пептиду, що містить TNF- α людини, для селекції тим самим антитіл, що розпізнають TNF- α . Способи проведення такого скринінгу і селекції добре відомі в даній галузі, як описано в посиланнях у попередньому абзаці. Для добору антитіл, що мають конкретну афінність зв'язування відносно hTNF- α , таких як антитіла, що дисоціюють від TNF- α людини з конкретною константою швидкості k_{off} , можна використовувати відомий у даній галузі спосіб поверхневого плазмонного резонансу для відбору антитіл, що мають бажану константу швидкості k_{off} . Для відбору антитіл, що мають конкретну нейтралізуючу активність відносно hTNF- α , таких як антитіла з конкретною IC_{50} , можна використовувати стандартні відомі в даній галузі способи оцінки інгібування активності hTNF- α .

Один аспект стосується виділеного антитіла або його антиген-зв'язувальній частині, що зв'язує TNF- α людини. В одному варіанті здійснення антитіло являє собою нейтралізуюче антитіло. У різних варіантах здійснення антитіло являє собою рекомбінантне антитіло або моноклональне антитіло.

Наприклад, антитіла також можна одержувати з використанням різних способів фагового дисплея, відомих у даній галузі. У способах фагового дисплея функціональні домени антитіла експонують на поверхні фагових частинок, що мають полінуклеотидні послідовності, що кодують їх. Зокрема, такий фаг можна використовувати для експонування антиген-зв'язувальних доменів, експресованих з бібліотеки набору антитіл або комбінаторної бібліотеки антитіл (наприклад, людини або миші). Фаг, експресуючий антиген-зв'язувальний домен, що зв'язує антиген, що представляє інтерес, можна піддавати селекції й ідентифікувати за допомогою антигену, наприклад, з використанням міченого антигену або антигену, зв'язаного або фіксованого на твердій або поверхні гранулах. Фаг використовуваний у цих способах, як правило, являє собою нитковидний фаг, що включає fd і M13, що зв'язує домени, які експресуються з фага з доменами антитіла Fab, Fv або стабілізованого дисульфідом Fv, рекомбінантно злитими з фаговим білком гена III або гена VIII. Приклади способів фагового дисплея, які можна використовувати для одержання антитіл, включають способи, описані в Brinkmann et al. (1995) *J. Immunol. Methods* 182:41-50; Ames et al. (1995) *J. Immunol. Methods* 184:177-186; Kettleborough et al. (1994) *Eur. J. Immunol.* 24:952-958; Persic et al. (1997) *Gene* 187 9-18; Burton et al. (1994) *Adv. Immunol.* 57:191-280; заявці PCT № PCT/GB91/01134; публікаціях PCT № WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; і патентах США № 5698426; 5223409; 5403484; 5580717; 5427908; 5750753; 5821047; 5571698; 5427908; 5516637; 5780225; 5658727; 5733743 і 5969108.

Після селекції фага кодуючі області антитіла з фага можна виділяти і використовувати для одержання цілих антитіл, включаючи антитіла людини, або будь-якого іншого бажаного антиген-зв'язувального фрагмента, і експресувати у будь-якому бажаному хазяїні, включаючи клітини ссавців, клітини комах, клітини рослин, дріжджі і бактерії, наприклад, як докладно описано в даному описі. Наприклад, також можна використовувати технології рекомбінантної продукції Fab-, Fab'- і F(ab')₂-фрагментів з використанням способів, відомих у даній галузі, таких як способи, описані в публікації PCT № WO 92/22324; Mullinax et al. (1992) *BioTechniques* 12(6):864-869; Sawai et al. (1995) *Am. J. Reprod. Immunol.* 34:26-34; і Better et al. (1988) *Science* 240: 1041-1043. Приклади технологій, які можна використовувати для одержання одноланцюжкових Fv і антитіл включають способи, описані в патентах США № 4946778 і 5258498; Huston et al. (1991) *Methods Enzymol.* 203: 46-88; Shu et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:7995-7999; і Skerra et al. (1988) *Science* 240: 1038-1041.

Альтернативно скринінгу бібліотек рекомбінантних антитіл за допомогою фагового дисплея для ідентифікації антитіл з подвійною специфічністю, можна використовувати інші відомі в даній галузі способи скринінгу великих комбінаторних бібліотек. Одним типом альтернативної експресуючої системи є система, у якій бібліотека рекомбінантних антитіл експресується як злиті конструкції РНК-білок, як описано в публікації PCT № WO 98/31700 і в Roberts and Szostak (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 12297-12302. У цій системі проводять ковалентне злиття між мРНК і пептидом або білком, які вона кодує, за допомогою трансляції *in vitro* синтетичних мРНК, що мають пуроміцин, пептидильний акцепторним антибіотиком, на їх 3'-кінці. Таким чином, комплексну суміш мРНК (наприклад, комбінаторну бібліотеку) можна збагачувати конкретною мРНК, виходячи з властивостей конкретного пептиду або білка, наприклад, антитіла або його частини, таких як зв'язування антитіла або його частини, з антигеном з подвійною специфічністю. Послідовності нуклеїнових кислот, що кодують антитіла або їхні частини, виділені шляхом скринінгу таких бібліотек, можна експресувати рекомбінантними способами, як описано вище (наприклад, у клітинах-хазяїнах ссавців), і, більше того, їх можна піддавати подальшому дозріванню афінності або за допомогою додаткових раундів скринінгу злитих конструкцій мРНК-пептид, у яких у вихідно відібрану послідовність(-і) були внесені мутації, або іншими способами дозрівання афінності *in vitro* для рекомбінантних антитіл, як описано вище.

В іншому підході антитіла також можна одержувати з використанням способів дріжджового дисплея, відомих у даній галузі. У способах дріжджового дисплея використовують способи генетики для зв'язування доменів антитіл із клітинною стінкою дріжджів і експонування їх на поверхні дріжджів. Зокрема, такі дріжджі можна використовувати для дисплея антиген-зв'язувальних доменів, експресованих з бібліотек наборів або антитіл комбінаторних бібліотек антитіл (наприклад, людини або миші). Приклади способів дріжджового дисплея, які можна використовувати для одержання антитіл, включають способи, описані в патенті США № 6699658.

В. Продукування рекомбінантних антитіл проти TNF- α

Антитіла можна одержувати кожним з множини способів, відомих у даній галузі, наприклад, експресією з клітин-хазяїнів, де експресуючий вектор(-и), що кодує важкий і легкий ланцюги трансфікований(-і) у клітину-хазяїна стандартними способами. Мають на увазі, що різні форми терміна "трансфекція" включають широку множину способів, звичайно використовуваних для введення екзогенної ДНК у прокаріотичну або еукаріотичну клітину-хазяїна, наприклад, електропорацію, осадженням фосфатом кальцію, трансфекцію DEAE-декстраном і т. п. Хоча можна експресувати антитіла як у прокаріотичних, так і в еукаріотичних клітинах-хазяїнах, в одному варіанті здійснення в клітинах-хазяїнах ссавців як таких еукаріотичних клітин (і зокрема, клітин ссавців) з більшою імовірністю, ніж у прокаріотичних клітинах, збереться і буде секретуватися належним чином згорнуте і імунологічно активне антитіло.

Клітини-хазяїни ссавців для експресії рекомбінантних антитіл включають клітини яєчника китайського хом'яка (клітини CHO) (включаючи клітини dhfr-CHO, описані в Urlaub and Chasin (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, використовувани із селективним маркером DHFR, наприклад, як описано в Kaufman and Sharp (1982) J. Mol. Biol. 159:601-621), клітини мієломи NSO, клітини COS і клітини SP2. Коли рекомбінантні експресуючі вектори, що кодують гени антитіла, вводять у клітини-хазяїни ссавців, антитіла одержують культивуванням клітин-хазяїнів протягом періоду часу, достатнього для забезпечення експресії антитіла в клітинах-хазяїнах, або секреції антитіла в культуральне середовище, у якій клітини-хазяїни вирощують. Антитіла можна виділяти з культурального середовища з використанням стандартних способів очищення білка.

Також клітини-хазяїни можна використовувати для одержання функціональних фрагментів антитіла, таких як Fab-фрагменти або молекули scFv. Зрозуміло, що варіанти вказаного вище способу знаходяться в обсязі варіантів здійснення. Наприклад, може бути бажаною трансфекція клітини-хазяїна ДНК, що кодує функціональні фрагменти або легкого ланцюга, і/або важкого ланцюга антитіла. Також можна використовувати технологію рекомбінантних ДНК для видалення деякої частини або всієї ДНК, що кодує будь-який або обидві з легкого ланцюга і важкого ланцюга, що не є необхідною для зв'язування антигенів, що представляють інтерес. Молекули, експресовані з таких укорочених молекул ДНК, також охоплюються антитілами. Крім того, можна одержувати біфункціональні антитіла, у яких один важкий й один легкий ланцюг являють собою антитіло, а інший важкий і легкий ланцюг є специфічними до антигену, відмінному від антигенів, що представляють інтерес, шляхом поперечного зшивання антитіла з другим антитілом стандартними способами хімічного зшивання.

В ілюстративній системі для рекомбінантної експресії антитіла або його антиген-зв'язувальної частини рекомбінантний експресуючий вектор, що кодує як важкий ланцюг

антитіла, так і легкий ланцюг антитіла, вводять у клітини dhfr-CHO опосередкованою фосфатом кальцію трансфекцією. У рекомбінантному експресуючому векторі кожний з генів важкого і легкого ланцюгів антитіла функціонально зв'язаний з регуляторними елементами енхансер CMV/промотор AdMLP для забезпечення високих рівнів транскрипції генів. Також рекомбінантний експресуючий вектор має ген DHFR, що дозволяє селекцію клітин CHO, що трансфіковані вектором, з використанням селекції/ампліфікації за допомогою метотрексату. Відібрані трансформовані клітини-хазяїни культивують для забезпечення експресії важкого і легкого ланцюгів антитіла, і інтактне антитіло виділяють з культурального середовища. Для одержання рекомбінантного експресуючого вектора, трансфекції клітин-хазяїнів, селекції трансформантів, культивування клітин-хазяїнів і виділення антитіла з культурального середовища використовують стандартні способи молекулярної біології. Крім того, передбачається спосіб синтезу рекомбінантного антитіла культивуванням клітини-хазяїна в придатному середовищі, доти, доки не синтезується рекомбінантне антитіло. Крім того, спосіб може включати виділення рекомбінантного антитіла з культурального середовища.

1. Антитіла проти hTNF- α

У таблиці 5 представлений перелік амінокислотних послідовностей VH- і VL-областей антитіл проти hTNF- α миші.

Таблиця 5

Перелік амінокислотних послідовностей VH- і VL-областей антитіл проти hTNF- α миші

SEQ ID NO:	Область білка		Послідовність
			123456789012345678901234567890
31	VH mak199		Qiqlvqsgpelkkpgetvmisckasgytftnygmnnwvkqapgkglkwmgwintygeptyaddfkgrf afsletsastaylqinnlknedtatyfcarkflttvvvtdyamdywgqgtsvtvss
	VH MAK199 CDR-H1	Залишки 31-35 SEQ ID NO:31	nygmnn
	VH MAK199 CDR-H2	Залишки 50-66 SEQ ID NO:31	wintygeptyaddfkgrf
	VH MAK199 CDR-H3	Залишки 99-113 SEQ ID NO:31	kflttvvvtdyamdy
32	VL MAK199		Diqmtqtsslsaslgdrvtiscrasqdisnylnwyqqkpdgtvkliyytsrlqsgvpsrfsqsgsgtdysltis nleqediattyfcqqgntlpptfgvgtklelk
	VL MAK199 CDR-L1	Залишки 24-34 SEQ ID NO:32	rasqdisnyln
	VL MAK199 CDR-L2	Залишки 50-56 SEQ ID NO:32	ytsrlqs
	VL MAK199 CDR-L3	Залишки 89-97 SEQ ID NO:32	qqgntlppt
			123456789012345678901234567890

2. Химерні антитіла проти hTNF- α

Химерне антитіло являє собою молекулу, у якій різні частини антитіла отримані з різних видів тварин, таку як антитіла, що мають варіабельну область, утворену з моноклонального антитіла миші, і константну область імуноглобуліну людини. Способи одержання химерних

антитіл відомі в даній галузі і докладно розглянуті в прикладах. Morrison (1985) Science 229:1202; Oi et al. (1986) BioTechniques 4:214; Gillies et al. (1989) J. Immunol. Methods 125:191-202; і патенти США № 5807715; 4816567 і 4816397. Крім того, можна використовувати способи, розроблені для одержання "химерних антитіл" за допомогою сплайсингу генів молекули антитіла миші з відповідною антигенною специфічністю з генами молекули антитіла людини з відповідною біологічною активністю (Morrison et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. 81:851-855; Neuberger et al. (1984) Nature 312:604-608; Takeda et al. (1985) Nature 314:452-454).

В одному з варіантів здійснення химерні антитіла одержують, замінюючи константну область важкого ланцюга моноклональних антитіл миші проти TNF- α людини, описаних у розділі 1, константною областю Ig1 людини.

3. Антитіла проти TNF- α з пересадженими CDR

Антитіла з пересадженими CDR містять послідовності варіабельних областей важкого і легкого ланцюга з антитіла людини, де одна або декілька з областей CDR VH і/або VL замінені послідовностями CDR антитіла миші. Матрицею для пересадження CDR може служити каркасна послідовність з будь-якого антитіла людини. Однак пряма заміна ланцюгів у такій каркасній області часто приводить до деякої втрати афінності зв'язування з антигеном. Чим більш гомологічним є антитіло людини вихідному антитілу миші, тим менш ймовірним є те, що об'єднання CDR миші з каркасною областю людини внесе перекручування в CDR, що можуть знизити афінність. Таким чином, в одному варіанті здійснення каркасна область варіабельної області людини, що вибрана для заміни каркасної області варіабельної області миші, за винятком CDR, має щонайменше приблизно 65 %, щонайменше приблизно 70 %, щонайменше приблизно 75 %, щонайменше приблизно 80 %, щонайменше приблизно 85 %, щонайменше приблизно 90 %, щонайменше приблизно 95 %, приблизно 100 %, ідентичність послідовності з каркасною областю варіабельної області антитіла миші. Способи одержання антитіл з пересадженими CDR відомі в даній галузі і докладно описані разом з гуманізацією таких антитіл з пересадженими CDR у прикладах (також див. патент EP № EP 0 239 400; публікацію PCT № WO 91/09967; патенти США № 5225539; 5530101 і 5585089); гіперхимеризацією або зміною поверхні (патенти EP № EP 0 592 106 і EP 0 519 596; Padlan (1991) Mol. Immunol. 28(4/5):489-498; Studnicka et al. (1994) Protein Eng. 7(6):805-814; Roguska et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:969-973), і шафлінгом ланцюгів (патент США № 5565352).

У конкретному варіанті здійснення передбачені антитіла з пересадженими CDR з ланцюгами VH і/або VL, як описано в таблиці 6.

Таблиця 6

Антитіла з пересадженими CDR

SEQ ID NO:	Область білка	Послідовність
		123456789012345678901234567890
33	hMAK199VH.1z	Qvqlvqsgselkpgasvkvscasgyftnngmnwvrqapggglewmgwintytgeptyaddfkgrfvfsldtsvstaylqisslkaedtavvyrcarkflttvvtdyamdywgqgtttvss
34	hMAK199VH.2z	Qvqlvqsgaevkpgasvkvscasgyftnngmnwvrqapggglewmgwintytgeptyaddfkgrvtmttdtststaymelrslrddtavvyrcarkflttvvtdyamdywgqgtttvss
35	hMAK199VL.1	Diqmtqspsslsasvgrvritcrasqdisnynwyqqkpgkapklliytsrlqsgvpsrfsqsgsgtdftltisslqpedfatyycqggntlpptfgggtkleik
36	hMAK199VL.2	Dvvtqspafsvtpgkvtitcrasqdisnynwyqqkpdqapkllytsrlqsgvpsrfsqsgsgtdftltissl eaedaatyycqggntlpptfgggtkleik

4. Гуманізовані антитіла проти hTNF- α

Гуманізовані антитіла являють собою молекули антитіл, що мають одну або декілька визначальних комплементарність областей (CDR) не є людиною виду і каркасні області з молекули імунoglobulinу людини. Відомі послідовності Ig людини описані, наприклад, на www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi; www.atcc.org/phage/hdb.html; www.sciquest.com/; www.abcam.com/; www.antibodyresource.com/onlinecomp.html; www.public.iastate.edu/about.pedro/research_tools.html; www.mgen.uni-heidelberg.de/SD/IT/IT.html; www.whfreeman.com/immunology/CH-05/kuby05.htm; www.library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html; www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/; www.path.cam.ac.uk/about.mrc7/m-ikeimages.html; www.antibodyresource.com/;

mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html; www.immunologylink.com/;
 pathbox.wustl.edu/.about.hcenter/index.-html; www.biotech.ufl.edu/.about.hcl/;
 www.pebio.com/pa/340913/340913.html; www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/; www.m.ehime-
 u.ac.jp/.about.yasuhito-/Elisa.html; www.biodesign.com/table.asp; www.icnet.uk/axp/facs/davies/lin-
 5 ks.html; www.biotech.ufl.edu/.about.fccl/protocol.html; www.isac-net.org/sites_geo.html;
 aximtl.imt.unimarburg.de/.about.rek/AEP-Start.html; baserv.uci.kun.nl/.about.jraats/linksl.html;
 www.recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwu.edu/; www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/pu-blic/INTRO.html;
 www.ibt.unam.mx/vir/V_mice.html; imgt.cnusc.fr:8104/;
 www.biochem.ucl.ac.uk/.about.martin/abs/index.html; antibody.bath.ac.uk/;
 10 abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html; www.unizh.ch/.about.honegger/AHOsem-inar/Slide01.html;
 www.cryst.bbk.ac.uk/.about.ubcg07s/; www.nimr.mrc.ac.uk/CC/ccaewg/ccaewg.htm;
 www.path.cam.ac.uk/.about.mrc7/humanisation/TAHHP.html;
 www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat_aim.html; www.biosci.missouri.edu/smithgp/index.html;
 www.cryst.bioc.cam.ac.uk/.abo-ut.fmolina/Web-pages/Pept/spottech.html;
 15 www.jerini.de/frroducts.htm; www.patents.ibm.com/ibm.html.Kabat et al., Sequences of Proteins of
 Immunological Interest, U.S. Dept. Health (1983). Такі імпортні послідовності можна
 використовувати для зниження імуногенності або зниження, підвищення або модифікації
 зв'язування, афінності, константи асоціації, константи дисоціації, авідності, специфічності, часу
 або напівжиття будь-якої іншої прийнятої характеристики, як відомо в даній галузі.
 20 Каркасні залишки в каркасних областях людини можна замінити відповідним залишком з
 антитіла, що є донором CDR, для зміни, наприклад, підвищення, зв'язування антигену. Ці заміни
 в каркасній області ідентифікують способами, добре відомими в даній галузі, наприклад, за
 допомогою моделювання взаємодій залишків CDR і каркасної області для ідентифікації
 залишків каркасної області, важливих для зв'язування антигену, і порівняння послідовностей
 25 для ідентифікації незвичайних залишків каркасної області в конкретних положеннях. (Див.,
 наприклад, патент США № 5585089; Riechmann et al. (1988) Nature 332:323-327). Тривимірні
 моделі імуноглобулінів широко доступні і відомі фахівцям у даній галузі. Доступні комп'ютерні
 програми, що ілюструють і виводять на екран можливі тривимірні конформаційні структури
 вибраних послідовностей імуноглобулінів-кандидатів. Дослідження цих виведених на екран
 30 структур дозволяє аналіз можливої ролі залишків у функціонуванні послідовності
 імуноглобуліну-кандидата, тобто аналіз залишків, що впливають на здатність імуноглобуліну-
 кандидата зв'язувати його антиген. Таким чином, можна відбирати і комбінувати залишки FR з
 консенсусної і імпортової послідовностей, щоб досягати бажаних характеристик антитіла, таких
 як підвищена афінність до антигену(-ів)-мішені. Як правило, залишки CDR прямо і найбільше
 35 істотно залучені до впливу на зв'язування антигену. Антитіла можна гуманізувати з
 використанням різних способів, відомих у даній галузі, таких як, але не обмежуючи ними,
 способи, описані в Jones et al. (1986) Nature 321:522-525; Verhoeven et al. (1988) Science
 239:1534-1536; Sims et al. (1993) J. Immunol. 151: 2296-2308; Chothia i Lesk (1987) J. Mol. Biol.
 196:901-917; Carter et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285-4289; Presta et al. (1993) J.
 40 Immunol. 151:2623-2632; Padlan (1991) Mol. Immunol. 28(4/5):489-498; Studnicka et al. (1994)
 Protein Eng. 7(6):805-814; Roguska. et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:969-973; публікаціях
 PCT № WO 91/09967, WO 99/06834 (PCT/US98/16280), WO 97/20032 (PCT/US96/18978), WO
 92/11272 (PCT/US91/09630), WO 92/03461 (PCT/US91/05939), WO 94/18219 (PCT/US94/01234),
 WO 92/01047 (PCT/GB91/01134), WO 93/06213 (PCT/GB92/01755), WO 90/14443, WO 90/14424, i
 45 WO 90/14430; публікаціях Європи № EP 0592106, EP 0519596 i EP 0239400; патентах США №
 5565332; 5723323; 5976862; 5824514; 5817483; 5814476; 5763192; 5723323; 5766886; 5714352;
 6204023; 6180370; 5693762; 5530101; 5585089; 5225539 i 4816567.

5. Одержання антитіл і продукуючих антитіла клітинних ліній

В одному варіанті антитіла проти TNF- α виявляють високу здатність знижувати або
 50 нейтралізувати активність TNF- α , наприклад, при оцінці кожним з декількох аналізів in vitro i in
 vivo, відомих у даній галузі. В іншому варіанті здійснення антитіла проти TNF- α виявляють
 високу здатність знижувати або нейтралізувати активність TNF- α .

У конкретних варіантах здійснення виділене антитіло або його антиген-зв'язувальна частина
 зв'язують TNF- α людини, де антитіло або його антиген-зв'язувальна частина дисоціюють від
 55 TNF- α людини з константою швидкості k_{off} приблизно $0,1 \text{ s}^{-1}$ або менше, при визначенні за
 допомогою поверхневого плазмонного резонансу, або вони інгібують активність TNF- α людини з
 IC_{50} приблизно $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ або менше. Альтернативно, антитіло або його антиген-зв'язувальна
 частина можуть дисоціювати від TNF- α людини з константою швидкості k_{off} приблизно $1 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$
 або менше, при визначенні за допомогою поверхневого плазмонного резонансу, або можуть
 60 інгібувати активність TNF- α людини з IC_{50} приблизно $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ або менше. Альтернативно,

антитіло або його антиген-зв'язувальна частина можуть дисоціювати від TNF- α людини з константою швидкості k_{off} приблизно $1 \times 10^{-3} \text{ c}^{-1}$ або менше, при визначенні за допомогою поверхневого плазмонного резонансу, або можуть інгібувати TNF- α людини з IC_{50} приблизно $1 \times 10^{-8} \text{ M}$ або менше. Альтернативно, антитіло або його антиген-зв'язувальна частина можуть дисоціювати від TNF- α людини з константою швидкості k_{off} приблизно $1 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$ або менше, при визначенні за допомогою поверхневого плазмонного резонансу, або можуть інгібувати активність TNF- α людини з IC_{50} приблизно $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ або менше. Альтернативно, антитіло або його антиген-зв'язувальна частина можуть дисоціювати від TNF- α людини з константою швидкості k_{off} приблизно $1 \times 10^{-5} \text{ c}^{-1}$ або менше, при визначенні за допомогою поверхневого плазмонного резонансу, або можуть інгібувати активність TNF- α людини з IC_{50} приблизно $1 \times 10^{-10} \text{ M}$ або менше. Альтернативно, антитіло або його антиген-зв'язувальна частина можуть дисоціювати від TNF- α людини з константою швидкості k_{off} приблизно $1 \times 10^{-5} \text{ c}^{-1}$ або менше при визначенні за допомогою поверхневого плазмонного резонансу, або можуть інгібувати активність TNF- α людини з IC_{50} приблизно $1 \times 10^{-11} \text{ M}$ або менше.

У визначених варіантах здійснення антитіло містить константну область важкого ланцюга, таку як константна область IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM або IgD. В одному варіанті здійснення константна область важкого ланцюга являє собою константну область важкого ланцюга Ig1 або константну область важкого ланцюга Ig4. Більше того, антитіло може містити константну область легкого ланцюга, або константну область легкого ланцюга каппа, або константну область легкого ланцюга лямбда. В іншому варіанті здійснення антитіло містить константну область легкого ланцюга каппа. Альтернативно, частина антитіла може являти собою, наприклад, Fab-фрагмент або одноклановий Fv-фрагмент.

Заміни амінокислотних залишків у Fc-ділянці для зміни ефекторної функції антитіла відомі в даній галузі (патенти США № 5648260 і 5624821). Fc-ділянка антитіла опосередковує декілька важливих ефекторних функцій, наприклад, індукцію цитокінів, антитілозалежну клітинно-опосередковану цитотоксичність (ADCC), фагоцитоз, комплементзалежну цитотоксичність (CDC) і час напівжиття/швидкість виведення антитіла і комплексів антиген-антитіло. У деяких випадках ці ефекторні функції є бажаними для терапевтичного антитіла, але в інших випадках вони можуть бути не обов'язковими або небажаними, залежно від терапевтичних цілей. Визначені ізотипи IgG людини, зокрема IgG1 і IgG3, опосередковують ADCC і CDC через зв'язування з Fc γ R і компонентом комплементу C1q, відповідно. Неонатальні Fc-рецептори (FcRn) є основними компонентами, що визначають час напівжиття антитіл у кровотоці. В іншому варіанті здійснення в константній області антитіла, наприклад, Fc-області антитіла, замінений щонайменше один амінокислотний залишок, для зміни ефекторних функцій.

Один з варіантів здійснення стосується міченого зв'язувального білка, де антитіло або його антиген-зв'язувальна частина перетворені в похідне або зв'язані з іншою функціональною молекулою (наприклад, іншим пептидом або білком). Наприклад, мічений зв'язувальний білок може бути отриманий функціональним зв'язуванням антитіла або його антиген-зв'язувальної частини (шляхом хімічного зв'язування, генетичного злиття, нековалентної асоціації або іншим способом) з однією або декількома іншими молекулярними групами, такими як інше антитіло (наприклад, біспецифічне антитіло або діантитіло), агент, що піддається виявленню, цитотоксичний агент, фармацевтичний засіб і/або білок або пептид, що може опосередковувати зв'язування антитіла або його антиген-зв'язувальної частини з іншою молекулою (такий як центральна область стрептавідину або полігістидинова мітка).

Придатні агенти, що піддаються виявленню, за допомогою яких може бути перетворене антитіло або його антиген-зв'язувальна частина, включають флуоресцентні сполуки. Ілюстративні флуоресцентні агенти, що піддаються виявленню, включають флуоресцеїн, флуоресцеїнізотіоціанат, родамін, 5-диметиламін-1-нафталінсульфонілхлорид, фікоеритрин і т. п. Також антитіло може бути перетворене в похідне з ферментами, що піддаються виявленню, такими як лужна фосфатаза, пероксидаза хрому, глюкозооксидаза і т. п. Коли антитіло перетворене в похідне з ферментом, що піддається виявленню, його виявлення проводять додаванням додаткових реагентів, які фермент використовує для утворення продукту реакції, що піддається виявленню. Наприклад, коли є агент, що піддається виявленню, пероксидаза хрому, додавання перекиси водню і діамінобензидину приводить до зафарбованого продукту реакції, який є таким, що піддається виявленню. Також антитіло може бути перетворене в похідне з біотином і виявлено шляхом опосередкованого вимірювання зв'язування авідину або стрептавідину.

Інший варіант здійснення стосується кристалізованого зв'язувального білка. Інший варіант здійснення стосується кристалів цілих антитіл проти TNF- α і їхніх фрагментів, як описано в даному описі, і складів і композицій, що містять такі кристали. В одному з варіантів здійснення

кристалізований зв'язувальний білок має час напівжиття *in vivo*, що перевищує час напівжиття *in vivo* розчинного аналога зв'язувального білка. В іншому варіанті здійснення зв'язувальний білок зберігає біологічну активність після кристалізації.

Кристалізований зв'язувальний білок можна одержувати способами, відомими в даній галузі, і як описано в публікації РСТ № WO 02/072636.

Інший варіант здійснення стосується глікозилизованого зв'язувального білка, де антитіло або його антиген-зв'язувальна частина містить один або декілька вуглеводних залишків. Білковий продукт, що утворюється *in vivo*, може піддаватися подальшому процесингу, відомому як посттрансляційна модифікація. Зокрема, можуть бути ферментативно додані залишки цукру (глікозильні залишки) шляхом процесу, відомого як глікозилювання. Утворені білки, що мають ковалентно зв'язані з ними олігосахаридні бічні ланцюги, відомі як глікозизовані білки або глікопротеїни. Глікозилювання білків залежить від амінокислотної послідовності білка, що представляє інтерес, а також від клітини-хазяїна, у якій експресується білок. Різні організми можуть продукувати різні ферменти глікозилювання (наприклад, глікозилтрансферази і глікозидази), і мають різні доступні субстрати (цукру нуклеотидів). Внаслідок таких факторів, паттерн глікозилювання білка і склад глікозильних залишків можуть відрізнятися, залежно від системи хазяїна, у якій експресується конкретний білок. Придатні глікозильні залишки включають, але не обмежуються ними, глюкозу, галактозу, манозу, фукозу, н-ацетилглюкозамін і сіалову кислоту. В одному з варіантів здійснення глікозилюваний зв'язувальний білок містить глікозильні залишки, так що паттерн глікозилювання є людським.

Фахівцям у даній галузі відомо, що різне глікозилювання білка може приводити до різних характеристик білка. Наприклад, ефективність терапевтичного білка, продукowanego в мікроорганізмі-хазяїні, такому як дріжджі, і глікозилюваного з використанням ендogenous каскаду дріжджів, може бути знижена в порівнянні з глікозилюванням того ж білка, експресованого в клітині ссавця, такий як клітинна лінія CHO. Такі глікопротеїни також можуть бути імуногенними в людини і можуть демонструвати знижений час напівжиття *in vivo* після введення. Визначені рецептори в людини й інших тварин можуть розпізнавати визначені глікозильні залишки і забезпечувати швидке виведення білка з кровотоку. Інші несприятливі ефекти можуть включати зміну згортання білка, його розчинності, чутливості до протеазам, кругообігу, транспорту, компартменталізації, секреції, розпізнавання іншими білками або факторами, антигенності або алергенності. Таким чином, практикуючий фахівець може віддати перевагу терапевтичному білку з визначеним складом і паттерном глікозилювання, наприклад, складом і паттерном глікозилювання, ідентичними або щонайменше подібними, зі складом і паттерном глікозилювання в клітинах людини або у видоспецифічних клітинах передбачуваної тварини.

Експресії глікозилованих білків, відмінних від білків клітини-хазяїна, можна досягати генетичною модифікацією клітини-хазяїна для експресії гетерологічних ферментів глікозилювання. З використанням способів, відомих у даній галузі, що практикує фахівець може одержати антитіла або їх антиген-зв'язувальні частини, що виявляють глікозилювання білків людини. Наприклад, штами дріжджів генетично модифікували для експресії ферментів глікозилювання, що не зустрічаються в природі, так щоб глікозизовані білки (глікопротеїни), продукування в цих штаммах дріжджів, виявляли глікозилювання білка, ідентичне глікозилюванню клітин тварин, особливо клітин людини (патенти США № 7449308 і 7029872).

Крім того, фахівцю в даній галузі буде зрозуміло, що білок, який представляє інтерес, може бути експресованим з використанням бібліотеки клітин-хазяїнів, створених способами генетичної інженерії для експресії різних ферментів глікозилювання, так що клітини-хазяїни, що є членами бібліотеки, продукують білок, що представляє інтерес, з варіантами паттернів глікозилювання. Потім практикуючий фахівець може проводити селекцію і виділення білка, що представляє інтерес, з конкретними новими паттернами глікозилювання. В одному з варіантів здійснення білок, що має конкретний вибраний новий паттерн глікозилювання, виявляє поліпшені або змінені біологічні властивості.

D. Застосування антитіл проти TNF- α

З огляду на здатність зв'язуватися з TNF- α людини, зв'язувальні білки, наприклад, антитіла проти TNF- α людини або їх антиген-зв'язувальні частини можна використовувати для виявлення TNF- α (наприклад, у біологічному зразку, такому як зразок цільної крові, сироватки, плазми, сечі, слини або тканини), з використанням кожної із широкої множини систем імунодетекції на основі антитіл, доступних у даній галузі. Такі системи імунодетекції включають, але не обмежуються ними, імунопреципітацію, імуноблотинг (вестерн-блотинг), твердофазний імуоферментний аналіз (ELISA), радіоімунний аналіз (RIA), імуногістохімію тканин, поверхневий плазмонний резонанс (SPR), сендвіч-імуноаналіз, афінні способи на основі антитіл (наприклад, афінні

гранули, афінні стовпчика), конкурентний імуноаналіз, імуноаналіз на чіпах (зв'язувальний білок, зв'язаний із силіконовим чіпом) і активовану флуоресценцією сортування клітин (FACS). Для деяких систем імунодетекції білок, що зв'язує TNF- α , (або його зв'язувальну частину) (або його частину) зв'язують із твердим субстратом з використанням доступних у даній галузі способів приєднання молекули антитіл до тим самих твердих субстратів, так щоб зв'язаний білок зберігав свою здатність зв'язувати TNF- α людини в ході використання в конкретній системі імунодетекції. Такі тверді субстрати включають, але не обмежуються ними, фільтрувальний папір на основі целюлози (наприклад, целюлоза, нітроцелюлоза, ацетат целюлози), нейлоновий фільтр, пластмасову поверхню (наприклад, мікропланшет для титрування, вимірювальний стрижень з антитілом), скляний субстрат (наприклад, фільтри, гранули, предметні стекла, скляна вата), полімерні частинки (наприклад, агароза, поліакриламід) і кремнієвий чіп. Наприклад, систему імунодетекції можна використовувати в способі виявлення наявності TNF- α у зразку *in vitro* (наприклад, біологічний зразок, такий як цільна кров, сироватка, плазма, тканина, сеча, слина, біоптат тканини). Такий спосіб можна використовувати для діагностики або захворювання порушення, наприклад, асоційованого з імунними клітинами порушення. Спосіб включає: (i) контактування досліджуваного зразка або контрольного зразка з білком, що зв'язує TNF- α , або його частиною, що зв'язує TNF- α , як описано в даному описі; і (ii) визначення утворення комплексу між зв'язувальним білком проти TNF- α (або його зв'язувальною частиною) і TNF- α у досліджуваному зразку або в контрольному зразку, де статистично значима зміна утворення комплексу в досліджуваному зразку щодо контрольного зразка (або щодо утворення комплексу в іншому досліджуваному зразку, узятому в більш ранній момент часу) указує на присутність TNF- α у зразку.

Як інший приклад спосіб можна використовувати для виявлення наявності TNF- α людини *in vivo* (наприклад, візуалізації *in vivo* в індивідуума). Спосіб можна використовувати для діагностики захворювання або порушення, наприклад, асоційованого з TNF- α порушення. Спосіб включає: (i) введення зв'язувального TNF- α білка або його частини, що зв'язує TNF- α , як описано в даному описі, досліджуваному індивідууму або контрольному індивідууму в умовах, що забезпечують зв'язування зв'язувального білка або його частини, що зв'язує TNF- α , з TNF- α ; і (ii) виявлення утворення комплексу між зв'язувальним білком або його частиною і TNF- α , де статистично значима зміна утворення комплексу в досліджуваного індивідуума щодо контрольного індивідуума або щодо утворення комплексу в досліджуваного індивідуума в більш ранній момент часу вказує на присутність TNF- α .

Способи виявлення TNF- α у зразку (наприклад, біологічному зразку) включають контактування зразка з білком, що зв'язує TNF- α (або його частиною, що зв'язує TNF- α), описаним у даному описі, і виявлення або зв'язувального білка (або його зв'язувальної частини), зв'язаного з TNF- α , або незв'язаного зв'язувального білка (або його незв'язаної зв'язувальної частини), тим самим, виявляючи TNF- α у зразку. Зв'язувальний білок (або його частина) прямо або опосередковано мітять агентом, що піддається виявленню, для полегшення виявлення зв'язаного або незв'язаного зв'язувального білка (або його частини). Такі агенти, що піддаються виявленню, відомі в даній галузі і, як необмежуючий приклад, включають різні ферменти, простетичні групи, флуоресцентні матеріали, люмінесцентні матеріали і радіоактивні матеріали. Приклади придатних ферментів включають пероксидазу хрому, лужну фосфатазу, β -галактозидазу або ацетилхолінестеразу. Приклади придатних комплексів простетичних груп включають стрептавідин/біотин і авідин/біотин. Приклади придатних флуоресцентних матеріалів включають умбеліферон, флуоресцеїн, флуоресцеїн ізотіоціанат, родамін, дихлортриазиніламін флуоресцеїн, дансилхлорид або фікоеритрин. Приклад люмінесцентного матеріалу включає люмінол. Приклади прийнятного радіоактивного матеріалу включають ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho або ^{153}Sm .

Альтернативно міченню білка, що зв'язує TNF- α людини, можна аналізувати в зразку, наприклад, біологічної рідини, за допомогою конкурентного імуноаналізу з використанням стандартів рекомбінантного TNF- α людини (rh), мічених агентом, що піддається виявленню, і неміченого зв'язувального TNF- α . У цьому аналізі біологічний зразок, мічені стандарти rhTNF- α і білок, що зв'язує TNF- α , поєднують і визначають кількість міченого стандарту rhTNF- α , зв'язаного з неміченим зв'язувальним білком. Кількість TNF- α людини в зразку зворотно пропорційно кількості міченого стандарту rhTNF- α , зв'язаного зі зв'язувальним білком проти TNF- α . Аналогічно, TNF- α людини також можна аналізувати в зразку за допомогою конкурентного імуноаналізу з використанням стандартів rhTNF- α , мічених агентом, що піддається виявленню, і неміченого зв'язувального білка проти TNF- α людини.

В одному варіанті здійснення антитіла й антиген-зв'язувальні частини здатні нейтралізовувати активність TNF- α людини як *in vitro*, так і *in vivo*. Таким чином, такі зв'язувальні

білки можна використовувати для інгібування активності TNF- α , наприклад, у клітинній культурі, що містить hTNF- α , у людей або в інших ссавців, що мають TNF- α , з якими антитіло перехресно реагує. Один варіант здійснення стосується способу інгібування активності hTNF- α , що включає контактування hTNF- α з антитілом або його антиген-зв'язувальною частиною, так щоб

5 інгібувалась активність hTNF- α . Наприклад, у клітинній культурі, що містить або приблизно містить hTNF- α , антитіло або його антиген-зв'язувальну частину можна додавати в культуральне середовище для інгібування активності hTNF- α у культурі.

Інший варіант здійснення стосується способу зниження активності hTNF- α в індивідумі, переважно в індивідумі, що страждає на захворювання або порушення, при якому активність TNF- α є шкідливою. Передбачено способи зниження активності TNF- α в індивідумі, що страждає на таке захворювання або порушення, що включають введення індивідуму антитіла або його антиген-зв'язувальної частини, так щоб активність TNF- α в індивідумі знижувалася. В іншому варіанті здійснення TNF- α являє собою TNF- α людини й індивідумом є людина.

Альтернативно, індивідумом може бути ссавець, експресуючий TNF- α , з яким антитіло здатне зв'язуватися. Більше того, індивідумом може бути ссавець, якому введений TNF- α (наприклад, за допомогою введення TNF- α або за допомогою експресії трансгена TNF- α). Зв'язувальний білок можна вводити людині для терапевтичних цілей. Більше того, зв'язувальний білок можна вводити ссавцю, що не є людиною, у якого експресується TNF- α , з яким зв'язувальний білок здатний зв'язуватися, для ветеринарних цілей або як модель захворювань людини на тварин.

Відносно останнього, такі моделі на тваринах можуть бути придатні для оцінки терапевтичної ефективності антитіл (наприклад, тестування дозувань і часу введення).

Термін "порушення, при якому активність TNF- α є шкідливою", включає захворювання й інші порушення, при яких, як показано, наявність TNF- α в індивідумі, що страждає на порушення, що є або вважається відповідальним за патофізіологію або порушення являє собою фактор, що приводить до погіршення стану при порушенні. Таким чином, порушення, при якому активність TNF- α є шкідливою, являє собою порушення, при якому очікується, що зниження активності TNF- α пом'якшить деякі або всі симптоми прогресування і/або порушення. Про такі порушення може свідчити, наприклад, підвищення концентрації TNF- α у біологічній рідині індивідуму, що страждає на порушення (наприклад, підвищення концентрації TNF- α у сироватці, плазмі, синовіальній рідині і т. д. індивідуму), яких можна виявляти, наприклад, з використанням зв'язувального білка проти TNF- α , як описано в даному описі. Необмежуючі приклади порушень, які можна лікувати зв'язувальними білками, включають порушення, розглянуті в представленому нижче розділі, що стосується фармацевтичних композицій зв'язувальних білків.

D. Фармацевтичні композиції

Передбачаються фармацевтичні композиції, що містять зв'язувальний білок, наприклад, антитіло або його антиген-зв'язувальну частину, і фармацевтично прийнятний носій. Фармацевтичні композиції, що містять антитіла, призначені для застосування, але не обмежуючи цим, у діагностиці, виявленні або моніторингу, у профілактиці, інгібуванні, лікуванні, керуванні перебігом або зм'якшенні або порушенні одного або декількох його симптомів, і/або в дослідженнях. У конкретному варіанті здійснення композиція містить один або декілька зв'язувальних білків. В іншому варіанті здійснення фармацевтична композиція містить один або декілька зв'язувальних білків і один або декілька профілактичних або терапевтичних засобів, відмінних від антитіл, для лікування порушення, при якому активність TNF- α є шкідливою. В іншому варіанті здійснення профілактичні або терапевтичні засоби являють собою засоби, що відомі як прийнятні або які раніше використовували або в даний час використовують для профілактики, лікування, керування перебігом або пом'якшення або порушення одного або декількох його симптомів. Відповідно до цих варіантів здійснення композиція може додатково містити носій, розріджувач або ексципієнт.

Зв'язувальні білки можна включати у фармацевтичні композиції, прийнятні для введення індивідуму. Як правило, фармацевтична композиція містить зв'язувальний білок, наприклад, антитіло або його антиген-зв'язувальну частину, і фармацевтично прийнятний носій. Термін "фармацевтично прийнятний носій" включає будь-які і всі розчинники, диспергуючі середовища, покриття, антибактеріальні і протигрибкові засоби, ізотонічні і уповільнюючі усмоктування засоби і т. п., що є фізіологічно сумісними. Приклади фармацевтично прийнятних носіїв включають одне або декілька з води, фізіологічного розчину, фосфатно-сольового буфера, декстрази, гліцерину, етанолу і т. п., а також їх комбінації. Може бути переважним додавання ізотонічних засобів, наприклад, цукрів, поліспиртів, таких як маніт, сорбіт або хлорид натрію. Крім того, фармацевтично прийнятні носії можуть містити невеликі кількості допоміжних речовин, таких як змочувальні засоби або емульгатори, консерванти або буфери, що

підвищують термін збереження або ефективність антитіла або його антиген-зв'язувальної частини.

Відомі різні системи для доставки і їх можна використовувати для доставки одного або декількох зв'язувальних білків або комбінації одного або декількох антитіл і профілактичного засобу або терапевтичного засобу, прийняттого для профілактики, керування перебігом, лікування або пом'якшення або порушення одного або декількох його симптомів, наприклад, інкапсулювання в ліпосоми, мікрочастинки, мікрокапсули, рекомбінантні клітини, здатні експресувати антитіло або фрагмент антитіла, опосередковуваний рецептором ендоцитоз (див., наприклад, Wu and Wu (1987) J. Biol. Chem. 262:4429-4432), конструювання нуклеїнової кислоти як частини ретровірусного або іншого вектора, і т. д. Способи введення профілактичного або терапевтичного засобу включають, але не обмежуються ними, парентеральне введення (наприклад, внутрішньошкірне, внутрішньом'язове, внутрішньоочеревинне, внутрішньовенне і підшкірне), епідуральне введення, внутрішньопухлинне введення і введення через слизову оболонку, патенти США № 6019968; 5985320; 5985309; 5934272; 5874064; 5855913; 5290540; і 4880078; і публікації PCT № WO 92/19244; WO 97/32572; WO 97/44013; WO 98/31346 і WO 99/66903. В одному з варіантів здійснення зв'язувальний білок, комбіновану терапію або композицію вводять з використанням технології для легеневої доставки лікарського засобу Alkermes AIR® (Alkermes, Inc., Cambridge, Massachusetts). Профілактичні або терапевтичні засоби можна вводити будь-яким зручним способом, наприклад, інфузією або болюсною ін'єкцією, за допомогою усмоктування через епітеліальні або шкірно-слизові вистилки (наприклад, слизові оболонки порожнини рота, прямої кишки, кишечника і т. д.) і їх можна вводити разом з іншими біологічно активними засобами. Уведення може бути системним або місцевим.

У конкретному варіанті здійснення може бути бажаним уведення профілактичних або терапевтичних засобів локально в область, що потребує лікування; наприклад, шляхом локальної інфузії, або ін'єкції за допомогою імплантату. Імплантат може являти собою пористий або непористий матеріал, що включає мембрани і матриці, такі як силастикові мембрани, полімери, фіброзні матриці (наприклад, Tissuel®) або колагенові матриці. В одному з варіантів здійснення ефективну кількість одного або декількох антитіл-антагоністів вводять локально в уражену область індивідууму для профілактики, лікування, керування перебігом і/або пом'якшення або порушення його симптому. В іншому варіанті здійснення ефективна кількість одного або декількох антитіл вводять локально в уражену область індивідуума в комбінації з ефективною кількістю одного або декількох лікарських засобів (наприклад, одного або декількох профілактичних або терапевтичних засобів), відмінних від зв'язувального білка для профілактики, лікування, керування перебігом і/або зм'якшення або порушення одного або декількох його симптомів.

В іншому варіанті здійснення профілактичний або терапевтичний засіб можна доставляти в системі для контрольованого вивільнення або уповільненого вивільнення. В одному з варіантів здійснення для досягнення контрольованого або уповільненого вивільнення можна використовувати насос (див. Langer (1990) Science 249:1527-1533; Sefton (1987) CRC Crit. Rev. Biomed. Eng. 14:201-240; Buchwald et al. (1980) Surgery 88:507-516; Saudek et al. (1989) N. Engl. J. Med. 321:574-579). В іншому варіанті здійснення для досягнення контрольованого або уповільненого вивільнення лікарських засобів можна використовувати полімерні матеріали (див., наприклад, Medical Applications of Controlled Release, (Langer and Wise, eds.) (CRC Press, Inc., Boca Raton, 1984); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, (Smolen and Ball, eds.) (Wiley, New York, 1984); Langer and Peppas (1983) J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. Phys. C23:61-126; також див. Levy et al. (1985) Science 228:190-192; During et al. (1989) Ann. Neurol. 25:351-356; Howard et al. (1989) J. Neurosurg. 71:105-112); патенти США № 5679377; 5916597; 5912015; 5989463 і 5128326; і публікації PCT № WO 99/15154 і WO 99/20253. Приклади полімерів, використовуваних для складів з уповільненим вивільненням, включають, але не обмежуються ними, полі(2-гідроксіетилметакрилат), поліметилметакрилат, поліакрилову кислоту, співполімер етилену і вінілацетату, поліметакрилову кислоту, полігліколіди (PLG), поліангідриди, полі(N-вінілпіролдон), полівініловий спирт, поліакриламід, поліетиленгліколь, полілактиди (PLA), співполімер лактидів і гліколідів (PLGA) і складні поліортоєфіри. В одному варіанті здійснення полімер, використовуваний у складі з уповільненим вивільненням, є інертним, що не містить домішок, які вимиваються, стабільним при збереженні, стерильним і біодеградованим. В іншому варіанті здійснення поблизу профілактичної або терапевтичної мішені можна поміщати систему з контрольованим або уповільненим вивільненням, що, таким чином, робить необхідною тільки частину системної дози (див., наприклад, Goodson, J.M.,

Chapter 6, In Medical Applications of Controlled Release, Vol. II, Applications i Evaluation, (Langer and Wise, eds.)(CRC Press, Inc., Boca Raton, 1984), pp. 115-138).

Системи з контрольованим вивільненням розглянуті в огляді Langer (1990) Science 249:

1527-1533. Для одержання складів з уповільненим вивільненням, що включають один або декілька лікарських засобів, можна використовувати будь-який спосіб, відомий фахівцю в даній галузі. Див., наприклад, патент США № 4526938; і публікації PCT № WO 91/05548 і WO 96/20698; і Ning et al. (1996) Radiother. Oncol. 39: 179-189; Song et al. (1996) PDA J. Pharm. Sci. Technol. 50:372-377; Cleek et al. (1997) Proceed Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854; і Lam et al. (1997) Proceed. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760.

У конкретному варіанті здійснення, де композиція являє собою нуклеїнову кислоту, що кодує профілактичний або терапевтичний засіб, нуклеїнову кислоту можна вводити *in vivo* для забезпечення експресії кодованого їй профілактичного або терапевтичного засобу, за допомогою конструювання її як частини відповідного експресуючого нуклеїнову кислоту вектора і введення його так, щоб він став внутрішньоклітинним, наприклад, з використанням ретровірусного вектора (див. патент США № 4980286), або за допомогою прямої ін'єкції, або з використанням бомбардування мікрочастинками (наприклад, генна гармата; Biolistic®, Dupont), або покриття ліпідами або рецепторами клітинної поверхні або трансфікуючими агентами, або введення його у формі, зв'язаної з гомеобоксподібним пептидом, що, як відомо, проникає в ядро (див., наприклад, Joliot et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 1864-1868). Альтернативно, нуклеїнову кислоту для експресії можна вводити усередину клітини і вбудовувати за допомогою гомологічної рекомбінації в ДНК клітини-хазяїна.

Фармацевтичну композицію виготовляють так, щоб вона була сумісна з передбачуваним шляхом уведення. Приклади способів уведення включають, але не обмежуються ними, парентеральне, наприклад, внутрішньовенне, внутрішньошкірне, підшкірне, пероральне, інтраназальне (наприклад, інгаляційне), трансдермальне (наприклад, місцеве), трансмукозальне і ректальне введення. У конкретному варіанті здійснення композицію виготовляють відповідно до загальноприйнятих способів як фармацевтичну композицію, адаптовану для внутрішньовенного, підшкірного, внутрішньом'язового, перорального, інтраназального або місцевого введення людині. Як правило, композиції для внутрішньовенного введення являють собою розчини в стерильному ізотонічному водному буфері. Коли необхідно, композиція може включати солюбілізує речовину і місцевий анестетик, такий як лідокаїн, для зм'якшення болю в області ін'єкції.

Якщо композиції призначені для місцевого введення, композиції можна виготовляти у формі мазі, крему, черезшкірного пластиру, лосьйону, гелю, шампуню, спрею, аерозолі, розчину, емульсії або іншої форми, добре відомої фахівцю в даній галузі. Див., наприклад, Remington's Pharmaceutical Sciences and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 19th ed., (Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania, 1995). Для не розпилювальних місцевих дозованих форм, як правило, використовують форми від в'язких до напівтвердих або твердих, що містять носій або один або декілька ексципієнтів, сумісних з місцевим застосуванням і мають динамічну в'язкість, що переважно перевищує в'язкість води. Інші прийнятні склади включають, але не обмежуються ними, суспензії, порошки, лініменти, бальзами і т. п. В одному варіанті здійснення такі склади є стерилізованими або змішаними з допоміжними засобами (наприклад, консервантами, стабілізаторами, змочувальними засобами, буферами або солями) для впливу на різні властивості, наприклад, такі як осмотичний тиск. Інші прийнятні місцеві дозовані форми включають розпилювальні аерозольні препарати, де активний інгредієнт, наприклад, у комбінації з твердим або рідким інертним носієм, упакований у суміші з легкою речовиною, що знаходиться під тиском, (наприклад, газоподібним пропелентом, таким як FREON®) або в здавлюваному бутілі. Також, якщо бажано, у фармацевтичні композиції і дозовані форми можна додавати зволожувачі або змочувальні речовини. Приклади таких додаткових інгредієнтів добре відомі в даній галузі.

Якщо спосіб включає інтраназальне введення композиції, композицію можна виготовляти у формі аерозолі, спрею, рідини для розпилення або у формі крапель. Зокрема, профілактичні або терапевтичні засоби можна зручним чином доставляти у формі аерозольного спрею з пакетів, що знаходяться під тиском, або пристрою для розпилення, з використанням придатного пропеленту (наприклад, дихлордифторметану, трихлорфторметану, дихлортетрафторетану, діоксиду або вуглецю іншого придатного газу). У випадку аерозолі, що знаходиться під тиском, дозовану одиницю можна визначати за допомогою надання клапана для доставки дозованої кількості. Можна виготовляти капсули і касети (що складаються, наприклад, з желатину) для застосування в інгаляторі або інсуфляторі, що містять порошкову суміш сполуки і придатної порошкової основи, такої як лактоза або крохмаль.

Якщо спосіб включає пероральне введення, пероральні композиції можна виготовляти у формі таблеток, капсул, крохмальних капсул, желатинових капсул, розчинів, суспензій і т. п. або Таблетки капсули можна одержувати загальноприйнятими способами з використанням фармацевтично прийнятних ексципієнтів, таких як зв'язувальні речовини (наприклад, переджелатинізований кукурудзяний крохмаль, полівінілпіролідон або гідроксипропілметилцелюлоза); наповнювачі (наприклад, лактоза, мікрокристалічна целюлоза або гідрофосфат кальцію); змашувальні речовини (наприклад, стеарат магнію, тальк або діоксид кремнію); дезінтегруючі речовини (наприклад, картопляний крохмаль або натрію крахмалгліколят); або змочувальні речовини (наприклад, лаурилсульфат натрію). Таблетки можна покривати способами, добре відомими в даній галузі. Рідкі препарати для перорального введення можуть мати форму, але не обмежуючи ними, розчинів, сиропів або суспензій, або вони можуть бути представлені як сухий продукт для розчинення водою або іншим придатним носієм перед застосуванням. Такі рідкі препарати можна одержувати загальноприйнятими способами з використанням фармацевтично прийнятних добавок, таких як суспендуючі речовини (наприклад, сироп сорбіту, похідні целюлози, гідрогенізовані або харчові жири); емульгатори (наприклад, лецитин або гуміарабік); неводні носії (наприклад, мигдальна олія, масляні складні ефіри, етиловий спирт або фракціоновані рослинні олії); і консерванти (наприклад, метил- або пропіл-п-гідроксибензоат або сорбінова кислота). Також препарати можуть містити буферні солі, смакові добавки, барвники і підсолоджувачі, у відповідних випадках. Препарати для перорального введення можуть бути придатним чином виготовлені для повільного вивільнення, контрольованого вивільнення або безперервного вивільнення профілактичного або терапевтичного засобу(засобів).

Спосіб може включати легеневе введення, наприклад, з використанням інгалятора або пристрою для розпилення, композиції, виготовленої із засобом, що утворює аерозоль. Див., наприклад, патенти США № 6019968; 5985320; 5985309; 5934272; 5874064; 5855913; 5290540; і 4880078; і публікації РСТ № WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346 і WO 99/66903. У конкретному варіанті здійснення антитіло, комбіноване лікарський засіб і/або композицію вводять з використанням технології легеневої доставки лікарського засобу Alkermes AIR® (Alkermes, Inc., Cambridge, Massachusetts).

Спосіб може включати введення композиції, виготовленої для парентерального введення, за допомогою ін'єкції (наприклад, за допомогою болюсної ін'єкції або безперервної інфузії). Склади для ін'єкції можуть бути надані в одиничній дозованій формі (наприклад, у ампулах або контейнерах для багаторазового дозування) з додаванням консерванту. Композиції можуть мати такі форми, як форми суспензій, розчинів або емульсій у масляних або водних носіях, і вони можуть містити засоби для виготовлення складу, такі як суспендуючі, стабілізуючі і/або диспергуючі засоби. Альтернативно, активний інгредієнт може знаходитися у формі порошку для розчинення придатним носієм (наприклад, стерильною водою, що не містить пірогенів) перед застосуванням.

Крім того, способи можуть включати введення композицій, виготовлених як депо-препарати. Такі склади тривалої дії можна вводити за допомогою імплантації (наприклад, підшкірної або внутрішньом'язової) або за допомогою внутрішньом'язової ін'єкції. Таким чином, наприклад, композиції можна виготовляти з використанням придатних полімерних або гідрофобних матеріалів (наприклад, таких як емульсія в прийнятній олії) або іонообмінних смол, або як малорозчинних похідних (наприклад, малорозчинної солі).

Способи включають введення композицій, виготовлених як нейтральна форма або форма солі. Фармацевтично прийнятні солі включають солі, утворені з аніонами, такими як аніони хлористоводневої, фосфорної, оцтової, щавлевої, виннокам'яної кислот і т. д., і солі, утворені з катіонами, такими як катіони натрію, калію, амонію, кальцію, гідроксидів заліза, ізопропіламіну, триетиламіну, 2-етиламіноетанолу, гістидину, прокаїну і т. д.

Як правило, інгредієнти композицій надають або окремо, або в суміші один з одним в одиничній дозованій формі, наприклад, як сухий ліофілізований порошок або концентрат, що не містить води, в герметично закритому контейнері, такому як ампула або саше, із вказуванням кількості активної речовини. Коли способом введення є інфузія, композицію можна дозувати за допомогою сулії для інфузії, що містить стерильну воду для фармацевтичного застосування або фізіологічний розчин. Коли способом введення є ін'єкція, може бути надана ампула зі стерильною водою для ін'єкції або фізіологічним розчином, так щоб інгредієнти можна було змішати перед введенням.

В одному варіанті здійснення один або декілька профілактичних або терапевтичних засобів, або фармацевтичних композицій за винаходом упаковані в герметично закритий контейнер, такий як ампула або саше, із вказуванням кількості активної речовини. В одному з варіантів

здійснення один або декілька з профілактичних або терапевтичних засобів або фармацевтичних композицій надають як сухий стерилізований ліофілізований порошок або концентрат, що не містить води, в герметично закритому контейнері, і їх можна відновлювати (наприклад, водою або фізіологічним розчином) до концентрації, придатної для введення індивідууму. В одному варіанті здійснення один або декілька з профілактичних або терапевтичних засобів або фармацевтичних композицій надають як сухий стерильний ліофілізований порошок в герметично закритому контейнері в одиничному дозуванні, що складає щонайменше приблизно 5 мг, щонайменше приблизно 10 мг, щонайменше приблизно 15 мг, щонайменше приблизно 25 мг, щонайменше приблизно 35 мг, щонайменше приблизно 45 мг, щонайменше приблизно 50 мг, щонайменше приблизно 75 мг або щонайменше приблизно 100 мг. Ліофілізовані профілактичні або терапевтичні засоби або фармацевтичні композиції варто зберігати при температурі від 2 °C до 8 °C у їхньому вихідному контейнері, і профілактичні або терапевтичні засоби, або фармацевтичні композиції повинні бути введені в межах приблизно 1 тижня, переважно в межах приблизно 5 діб, у межах приблизно 72 годин, у межах приблизно 48 годин, у межах приблизно 24 годин, у межах приблизно 12 годин, у межах приблизно 6 годин, у межах приблизно 5 годин, у межах приблизно 3 годин або у межах приблизно 1 години після відновлення. В альтернативному варіанті здійснення один або декілька з профілактичних або терапевтичних засобів або фармацевтичних композицій надають у рідкій формі в герметично закритому контейнері, на якому вказана кількість і концентрація речовини. В одному варіанті здійснення рідку форму композиції, що вводиться, надають у герметично закритому контейнері в концентрації щонайменше приблизно 0,25 мг/мл, щонайменше приблизно 0,5 мг/мл, щонайменше приблизно 1 мг/мл, щонайменше приблизно 2,5 мг/мл, щонайменше приблизно 5 мг/мл, щонайменше приблизно 8 мг/мл, щонайменше приблизно 10 мг/мл, щонайменше приблизно 15 мг/кг, щонайменше приблизно 25 мг/мл, щонайменше приблизно 50 мг/мл, щонайменше приблизно 75 мг/мл або щонайменше приблизно 100 мг/мл. Рідку форму варто зберігати при температурі від 2 °C до 8 °C у її вихідному контейнері.

Зв'язувальні білки можуть бути включені у фармацевтичну композицію, придатну для парентерального введення. В одному аспекті зв'язувальні білки одержують як ін'єктований розчин, що містить від приблизно 0,1 до приблизно 250 мг/мл антитіла. Ін'єктований розчин може складатися з рідкої, або з ліофілізованої або дозованої форми в безбарвному або бурштиновому флаконі, ампулі або попередньо заповненому шприці. Буфер може являти собою L-гістидин (від приблизно 1 до приблизно 50 мм), оптимально від приблизно 5 до приблизно 10 мм, при рН від 5,0 до 7,0 (оптимально при приблизно рН 6,0). Інші придатні буфери включають, але не обмежуються ними, сукцинат натрію, цитрат натрію, фосфат натрію або фосфат калію. Для модифікації токсичності розчину можна використовувати хлорид натрію в концентрації від приблизно 0 до приблизно 300 мм (наприклад, приблизно 150 мм для рідкої дозованої форми). Для ліофілізованої дозованої форми можна додавати кріопротектор, головним чином, від приблизно 0 до приблизно 10 % сахарозу (наприклад, від приблизно 0,5 до приблизно 1,0 %). Інші придатні кріопротектори включають трегалозу і лактозу. Для ліофілізованої дозованої форми можна додавати наповнювачі, головним чином, від приблизно 1 до приблизно 10 % маніт (наприклад, від приблизно 2 до приблизно 4 %). Як у рідких, так і в ліофілізованих дозованих формах можна використовувати стабілізатори, головним чином, від приблизно 1 до приблизно 50 мм L-метіонін (оптимально від приблизно 5 до приблизно 10 мм). Інші придатні наповнювачі включають гліцин, аргінін, і можна додавати від приблизно 0 до приблизно 0,05 % полісорбат-80 (оптимально від приблизно 0,005 до приблизно 0,01 %). Додаткові поверхнево-активні речовини включають, але не обмежуються ними, полісорбат 20 і поверхнево-активні речовини BRIJ.

Композиції можуть мати різні форми. Вони включають, наприклад, рідкі, напівтверді і тверді дозовані форми, такі як рідкі розчини (наприклад, ін'єктовані і інфузовані розчини), дисперсії або суспензії, таблетки, пігулки, порошки, ліпосоми і супозиторії. Форма залежить від передбачуваного шляху введення і терапевтичного застосування. Типові композиції мають форму ін'єктованих або інфузованих розчинів, таких як композиції, подібні до композицій, використовуваних для пасивної імунізації людини іншими антитілами. Переважним способом введення є парентеральний (наприклад, внутрішньовенний, підшкірний, внутрішньоочеревинний, внутрішньом'язовий). В одному варіанті здійснення антитіло вводять за допомогою внутрішньовенної інфузії або ін'єкції. В іншому варіанті здійснення антитіло вводять за допомогою внутрішньом'язової або підшкірної ін'єкції.

Терапевтичні композиції, як правило, повинні бути стерильними і стабільними в умовах виготовлення і збереження. Композицію можна виготовляти як розчин, мікроемульсії, дисперсії,

ліпосом або іншої упорядкованої структури, придатної для високої концентрації лікарського засобу. Стерильні ін'єктовані розчини можна одержувати включенням активної сполуки (наприклад, антитіла або його антиген-зв'язувальної частини) у необхідній кількості у відповідний розчинник з одним або з комбінацією інгредієнтів, перерахованих вище, при
 5 необхідності, з наступною стерилізацією фільтрацією. Як правило, дисперсії одержують додаванням активної сполуки в стерильний носій, що містить основне дисперсійне середовище й інші необхідні інгредієнти з тих, що перераховано вище. У випадку стерильних ліофілізованих порошків для готування стерильних ін'єктованих розчинів, ілюстративними способами виготовлення є вакуумне сушіння і розпилювальне сушіння, що дають порошок активного
 10 інгредієнта з будь-якими додатковими бажаними інгредієнтами з їхнього попередньо стерилізованого фільтрацією розчину. Належну текучість розчину можна підтримувати, наприклад, з використанням покриття, такого як лецитин, підтриманням необхідного розміру частинок у випадку дисперсії, і з використанням поверхнево-активних речовин. Пролонгованого усмоктування ін'єктованих композицій можна досягати включенням у композицію засобу, що
 15 сповільнює усмоктування, наприклад, солей моностеарату і желатину.

Антитіла або їх антиген-зв'язувальні частини можна вводити множиною способів, відомих у даній галузі, хоча для багатьох терапевтичних застосувань ілюстративним шляхом/способом введення є підшкірна ін'єкція, внутрішньовенна ін'єкція або інфузія. Як буде зрозуміло фахівцю в даній галузі, шлях і/або спосіб введення може варіювати, залежно від бажаних результатів. У
 20 визначених варіантах здійснення активна сполука можна виготовляти з носієм, що запобігає швидке вивільнення сполуки, таким як склад з контрольованим вивільненням, що включає імпланти, черезшкірні пластири і мікроінкапсульовані системи для доставки. Можна використовувати біодеградовані біосумісні полімери, такі як етиленвінілацетат, поліангідриди, полігліколева кислота, колаген, складні поліортоефіри і полімолочна кислота. Для одержання таких сполук запатентовано або, головним чином, відома фахівцям у даній галузі множина способів. Див., наприклад, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R.
 25 Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

У визначених варіантах здійснення антитіло або його антиген-зв'язувальну частину можна вводити перорально, наприклад, з інертним розріджувачем або засвоюваним харчовим носієм.
 30 Сполуку (і інші інгредієнти, якщо бажано) також можна укладати в желатинову капсулу з твердою або м'якою оболонкою, пресувати в таблетки або включати безпосередньо в раціон індивідуума. Для перорального терапевтичного введення сполуки можна включати з ексципієнтами і використовувати у формі проковтуваних таблеток, таблеток для трансбукального введення, коржів, капсул, еліксирів, суспензій, сиропів, пластинок і т. п. Для
 35 введення сполуки способом, відмінним від парентерального введення, може бути необхідним покриття сполуки матеріалом для запобігання його інактивації, або введення сполуки разом з ним.

Також у композиції можна включати додаткові активні сполуки. У визначених варіантах здійснення зв'язувальний білок (наприклад, антитіло або його антиген-зв'язувальну частину)
 40 спільно складають і/або спільно вводять з одним або декількома додатковими терапевтичними засобами, що придатні для лікування порушень, при яких активність TNF- α є шкідливою. Наприклад, антитіло проти hTNF- α або його антиген-зв'язувальну частину можна спільно включати до складу і/або спільно вводити з одним або декількома додатковими антитілами, що зв'язують інші мішені (наприклад, антитіла, що зв'язують інші цитокіни або які зв'язують
 45 молекули клітинної поверхні). Більше того, одне або декілька антитіл можна використовувати в комбінації з двома або більше із вказаних вище лікарських засобів. Такі комбіновані лікарські засоби можна переважно використовувати з нижчими дозуваннями лікарських засобів, що вводяться, таким чином, уникаючи можливої токсичності або ускладнень, асоційованих з різними способами монотерапії.

У визначених варіантах здійснення антитіло проти TNF- α або його фрагмент зв'язані з носієм, що подовжує час напівжиття, відомих у даній галузі. Такі носії включають, але не обмежуються ними, Fc-домен, поліетиленгліколь і декстран. Такі носії описані, наприклад, у патенті США № 6660843 і опублікованій публікації PCT № WO 99/25044.

У конкретному варіанті здійснення молекули нуклеїнових кислот, що містять нуклеотидні послідовності, що кодують один або декілька поліпептидів зв'язувального білка або інший профілактичний або терапевтичний засіб, вводять для лікування, профілактики, керування перебігом або зм'якшення або порушення одного або декількох його симптомів за допомогою
 55 генної терапії. Генна терапія стосується терапії, проведеної шляхом введення індивідууму експресованої або нуклеїнової кислоти, що експресується. У цьому варіанті здійснення нуклеїнові кислоти продукують кодований ними зв'язувальний поліпептид(-и) зв'язувального
 60

білка або профілактичний або терапевтичний засіб, що опосередковує профілактичний або терапевтичний ефект.

Можна використовувати будь-які способи генної терапії, доступні в даній галузі. Для основних оглядів способів генної терапії, див. Goldspiel et al. (1993) Clin. Pharm. 12:488-505; Wu and Wu (1991) Biotherapy 3:87-95; Tolstoshev (1993) Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596; Mulligan (1993) Science 260:926-932; i Morgan and Anderson (1993) Ann. Rev. Biochem. 62: 191-217; Robinson, C. (1993) Trends Biotechnol. 11(5): 155. Широко відомі в даній галузі способи технології рекомбінантних ДНК, які можна використовувати, описані в Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, New York, 1993); i Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, (Stockton Press, New York, 1990). Докладний опис різних способів генної терапії представлено в публікації US 2005/0042664.

TNF- α відіграє роль у патології, асоційованій з різними захворюваннями, що утягують імунні і запальні елементи, такими як аутоімунні захворювання, зокрема, захворювання, асоційовані з запаленням, включаючи хворобу Крона, псоріаз (включаючи бляшкоподібний псоріаз), артрит (включаючи ревматоїдний артрит, псоріатичний артрит, остеоартрит або ювенільний ідіопатичний артрит), розсіяний склероз, системний червоний вовчак, анкілозуючий спондиліт, діабет (включаючи інсулінозалежний цукровий діабет або аутоімунний діабет), алергію і аутоімунний увеїт. Таким чином, зв'язувальні білки в рамках даного винаходу можна використовувати для лікування цих порушень. В іншому варіанті здійснення порушення являє собою респіраторне порушення; астму; алергічну і неалергічну астму; астму внаслідок інфекції; астму внаслідок інфекції респіраторно-синцитіальним вірусом (RSV); хронічне обструктивне захворювання легенів (COPD); стан, що залучає запалення дихальних шляхів; еозинофілію; фіброз і надлишкове продукування слизу; кістозний фіброз; легеневий фіброз; atopічне порушення; atopічний дерматит; кропивницю; екзему; алергійний риніт; алергійний ентерогастрит; запальне і/або аутоімунний стан шкіри; запальний і/або аутоімунний стан органів шлунково-кишкового тракту; запальні захворювання кишечника (IBD); виразковий коліт; запальний і/або аутоімунний стан печінки; цироз печінки; фіброз печінки; фіброз печінки, викликаний вірусом гепатиту В і/або С; склеродермію; пухлини або злоякісні пухлини; печінково-клітинну карциному; гліобластому; лімфому; лімфому Ходжкіна; вірусну інфекцію; бактеріальну інфекцію; паразитарну інфекцію; інфекцію HTLV-1; пригнічення прояву захисних імунних відповідей 1 типу, пригнічення прояву захисної імунної відповіді 1 типу в ході вакцинації, нейродегенеративні захворювання, нейрональну регенерацію й ушкодження спинного мозку.

TNF- α також може відігравати роль у патології, асоційованій з різними захворюваннями, що залучають імунні і запальні елементи. Ці захворювання включають, але не обмежуються ними, синдром набутого імунodefіциту; обумовлені набутим імунodefіцитом захворювання; набуту перніціозну анемію; гострі коронарні синдроми; гострий і хронічний біль (різні форми болю); гострий ідіопатичний поліневрит; гостре імунне захворювання, асоційоване з трансплантацією органів; гостре або хронічне імунне захворювання, асоційоване з трансплантацією органів; гостру запальну демієлінізуючу полірадикулоневропатію; гостру ішемію; гостре захворювання печінки; гостру ревматичну атаку; гострий поперечний мієліт; хворобу Аддісона; дорослий (гострий) респіраторний дистрес-синдром; дорослу хворобу Стілла; алкогольний цироз; індуковане алкоголем ушкодження печінки; алергійні захворювання; алергію; алопецію; осередкову алопецію; хворобу Альцгеймера; анафілаксію; анкілозуючий спондиліт; обумовлене анкілозуючим спондилітом захворювання легенів; синдром антифосфоліпідних антитіл; апластичну анемію; артеріосклероз; артропатію; астму; атероматозне захворювання/артеріосклероз; атеросклероз; atopічну алергію; atopічну екзему; atopічний дерматит; атрофічний аутоімунний гіпотиреоз; аутоімунне бульозне захворювання; аутоімунний дерматит; аутоімунний діабет; аутоімунне порушення, асоційоване зі стрептококовою інфекцією; аутоімунну ентеропатію; аутоімунну гемолітичну анемію; аутоімунний гепатит; аутоімунну втрату слуху; аутоімунний лімфопроліферативний синдром (ALPS); обумовлену аутоімунним порушенням гіпоглікемію; аутоімунний міокардит; аутоімунну нейтропенію; аутоімунне передчасне угасання функції яєчників; аутоімунну тромбоцитопенію (AITP); аутоімунне захворювання щитовидної залози; аутоімунний увеїт; облітеруючий бронхіоліт; хворобу Бехчета; блефарит; бронхоектаз; бульозний пемфігоїд; кахексію; серцево-судинне захворювання; катастрофічний антифосфоліпідний синдром; целіакію; шийний спондиліоз; хламідіоз; холестаза; хронічний активний гепатит; хронічну еозинофілну пневмонію; синдром хронічної втоми; хронічне імунне захворювання, обумовлене трансплантацією органа; хронічну ішемію; хронічні захворювання печінки; хронічний шкірно-слизовий кандидоз; рубцевий пемфігоїд; клінічно ізольований синдром (CIS) з ризиком розсіяного склерозу; варіабельний некласифікований імунodefіцит (варіабельну некласифіковану гіпогаммаглобулінемію);

асоційоване із захворюванням сполучної тканини інтерстиціальне захворювання легенів; кон'юнктивіт; Кумбс-позитивну гемолітичну анемію; психічний розлад з початком у дитячому віці; хронічне обструктивне захворювання легенів (COPD); хворобу Крона; криптогенний аутоімунний гепатит; криптогенний фіброзуючий альвеоліт; дакриоцистит; депресію; склеродермію при

5 дерматиті; дерматоміозит; обумовлене дерматоміозитом/поліміозитом захворювання легенів; діабетичну ретинопатію; цукровий діабет; дилатаційну кардіоміопатію; дискоїдний вовчаковий еритематоз; грижу міжхребтового диска; пролапс міжхребтового диска; дисеміноване внутрішньосудинне згортання; індукований лікарськими засобами гепатит; індуковане

10 лікарськими засобами інтерстиціальне захворювання легенів; індуковану лікарським засобом імунну гемолітичну анемію; ендокардит; ендометриоз; ендокринопатії; ентодермаліт; ентодерматит; епісклерит; поліформну еритему; велику поліформну еритему; жіночу безплідність; фіброз; фіброзне захворювання легенів; гестаційний пемфігоїд; гігантоклітинний артеріт (GCA); гломерулонефрит; зобний аутоімунний гіпотиреоз (хворобу Хашимото); синдром Гудпасчера; подагричний артрит; реакцію трансплантату проти хазяїна (GVHD); хворобу Грейвса; інфекцію

15 стрептококами групи В (BGS); синдром Гієна-Барре (BGS); обумовлене гемосидерозом захворювання легенів; сінну лихоманку; серцеву недостатність; гемолітичну анемію; пурпуру Шенлейн-Геноха; гепатит В; гепатит С; синдром Х'юза; хорею Гентінгтона; гіпертиреозидизм; гіпопаратиреоз; ідіопатичну лейкопенію; ідіопатичну тромбоцитопенію; ідіопатичну хворобу Паркінсона; ідіопатичну інтерстиціальну пневмонію; ідіосинкразичне захворювання печінки; IgE-

20 опосередковану алергію; імунну гемолітичну анемію; міозит з тільцями включення; інфекційні захворювання; інфекційне запальне захворювання ока; запальне захворювання кишечника; запальне демієлінізуюче захворювання; запальне захворювання серця; запальне захворювання нирки; інсулінозалежний цукровий діабет; інтерстиціальний пневмоніт; IPF/UIP; ірит; ювенільний хронічний артрит; ювенільну перніціозну анемію; ювенільний ревматоїдний артрит (JRA);

25 хворобу Кавасакі; кератит; сухий кератокон'юнктивіт; хворобу Куссмауля або хворобу Куссмауля-Мейєра; параліч Ландрі; гістіоцитоз клітин Лангерганса; хворобу лінійних IgA; гроноподібну шкіру; артрит Лайма; лімфоцитарне інфільтруюче захворювання легенів; дегенерацію жовтої плями; ідіопатичне NOS або чоловічу безплідність; злоякісні пухлини; мікроскопічний васкуліт нирок; мікроскопічний поліангіт; змішане захворювання сполучної тканини, обумовлене

30 захворюванням легенів; хворобу Бехтерева; порушення рухових нейронів; пемфігоїд слизових оболонок; розсіяний склероз (усі підтипи: первинний прогресуючий, вторинний прогресуючий, ремітуючий, і т. д.); поліорганну недостатність; міалгічний енцефаліт/хворобу "royal free"; міастенію; мієлодиспластичний синдром; інфаркт міокарда; міокардит; нефротичний синдром; розлад корінців нервів; невропатію; неалкогольний стеатогепатит; не-А не-В гепатит; оптичний неврит; відторгнення трансплантата органа; остеоартрит; остеоліз; рак яєчника; недостатність

35 яєчників; панкреатит; паразитарні захворювання; хворобу Паркінсона; пауціартикулярний JRA; пемфігоїд; пемфігус листоподібний; пемфігус звичайний; оклюзійне захворювання периферичних артерій (PAOD); хворобу периферичних судин (PVD); хворобу периферичних артерій (PAD); факогенний увеїт; флебіт; вузликовий поліартеріт (або вузликовий періартеріт);

40 поліхондрит; ревматичну поліміалгію; поліоз; поліартикулярний JRA; синдром поліендокринної недостатності; поліміозит; полігландулярний дефіцит типу I і полігландулярний дефіцит типу II; ревматичну поліміалгію (PMR); постінфекційне інтерстиціальне захворювання легенів; постзапальне інтерстиціальне захворювання легенів; постперфузійний синдром; передчасне угасання функції яєчників; первинний біліарний цироз; первинну мікседему; первинний

45 паркінсонізм; первинний склерозуючий холангіт; первинний склерозуючий гепатит; первинний васкуліт; рак передміхурової залози і рак прямої кишки і гемопоетичні злоякісні пухлини (лейкоз і лімфому); простатит; псоріаз; псоріаз 1 типу; псоріаз 2 типу; псоріатичний артрит; псоріатичну артропатію; легеневу гіпертензію, вторинну для захворювання сполучних тканин; легеневий прояв вузликового поліартеріїту; справжню еритроцитарну аплазію; первинну недостатність

50 надниркових залоз; променевий фіброз; реактивний артрит; хворобу Рейтера; рецидивуючий оптичний нейромієліт; захворювання нирок NOS; рестеноз; ревматоїдний артрит; обумовлене ревматоїдним артритом інтерстиціальне захворювання легенів; ревматичне захворювання серця; SAPHO (синовіт, вугровий висип, пустулез, гіперостоз і остеїт); саркоїдоз; шизофренію; синдром Шмітта; склеродермію; вторинний амілоїдоз; шокова легеня; склерит; ішіас; вторинну

55 недостатність надниркових залоз; септичний синдром; септичний артрит; септичний шок; серонегативну артропатію; асоційовану із силіконом хворобу сполучних тканин; асоційоване з хворобою Шегрена захворювання легенів; синдром Шегрена; дерматоз Снеддона-Уілкінсона; аутоімунітет до сперми; спондилоартропатію; анкілозуючий спондиліт; синдром Стівенса-Джонсона (SJS); хворобу Стілла; інсульт; симпатичну офтальмію; синдром системної запальної

60 відповіді; системний червоний вовчак; обумовлене системним червоним вовчаком

захворювання легенів; системну склеродермію; обумовлене системною склеродермією інтерстиціальне захворювання легенів; хворобу/артеріїт Такаясу; скроневий артеріїт; опосередковуваний Th2-типом і Th1-типом захворювання; тиреоїдит; синдром токсичного шоку; токсоплазмозний ретиніт; токсичний епідермальний некроліз; поперечний мієліт; (періодичний синдром, асоційований з рецептором 1 фактора некрозу пухлини (TNFR)); резистентність до інсуліну типу В з чорним акантозом; алергічну реакцію 1 типу; аутоімунний гепатит 1 типу (класичний аутоімунний або вовчаковий гепатит); аутоімунний гепатит 2 типу (гепатит з антитілами проти LKM); діабет типу II; артропатію при виразковому коліті; виразковий коліт; кропивницю; звичайну інтерстиціальну пневмонію (UIP); увеїт; зв'язане з васкулітом дифузійне захворювання легенів; васкуліт; весняний кон'юнктивіт; вірусний ретиніт; вітіліго; синдром Фогта-Коянагі-Харада (синдром VKH); гранулематоз Вегенера; вологу дегенерацію жовтої плями; загоєння ран; асоційовану з *Yersinia* і *Salmonella* артропатію.

Білки, що зв'язують TNF- α , їх антиген-зв'язувальні частини можна використовувати окремо або в комбінації для лікування таких захворювань, у тому числі в комбінації з додатковими лікарськими засобами, придатними для лікування аутоімунних і запальних захворювань. Варто розуміти, що зв'язувальні білки або їх антиген-зв'язувальні частини можна використовувати окремо або в комбінації з додатковим засобом, наприклад, лікарським засобом, причому додатковий засіб вибирає кваліфікований фахівець для передбачуваної мети. Наприклад, додатковий засіб може являти собою лікарський засіб, визнаний у даній галузі як корисний для лікування захворювання або стану, що лікують за допомогою антитіла. Додатковий засіб також може являти собою засіб, що надає сприятливої ознаки терапевтичній композиції, наприклад, засіб, що впливає на в'язкість композиції.

Комбінації включають білки, що зв'язують TNF- α , або їх антиген-зв'язувальні фрагменти, описані в даному описі, і щонайменше один додатковий засіб, приведений нижче. Також комбінація може включати більше одного додаткового засобу, наприклад, два або три додаткові засоби, якщо комбінація є такою, що утворена композиція може виконувати передбачувану для неї функцію.

В одному варіанті здійснення комбінації включають білки, що зв'язують TNF- α , їх антиген-зв'язувальні фрагменти, і антитіло або його фрагмент, здатні зв'язувати IL-12 людини; PGE₂; LPA; NGF; CGRP; SubP; RAGE; гістамін; блокатор рецептори гістаміну; брадикінін; IL-1-альфа; IL-1-бета; VEGF; PLGF; метотрексат; кортикостероїд, модулятор рецептора глюкокортикоїдів; циклоспорин, рапаміцин, FK506 або нестероїдний протизапальний засіб.

В іншому варіанті здійснення ілюстративні комбінації включають білки, що зв'язують TNF- α , їх антиген-зв'язувальні фрагменти, описані в даному описі, і нестероїдний протизапальний засіб(-и) (NSAID), наприклад, такий як ібупрофен. Інші ілюстративні комбінації включають антитіла або їх антиген-зв'язувальні фрагменти, описані в даному описі, і кортикостероїди, включаючи преднізолон. Побічні ефекти застосування стероїдів можуть бути зменшені або усунуті шляхом зменшення необхідної дози стероїдів при лікуванні пацієнтів у комбінації із зв'язувальними TNF- α білками. Необмежуючі приклади лікарських засобів від ревматоїдного артрити, з якими можна комбінувати антитіло або частину антитіла, включають наступні: цитокін-супресивний протизапальний лікарський засіб(-а) (CSAID); антитіла, або антагоністи, до інших цитокінів або факторів росту людини, наприклад, до TNF, LT, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-15, IL-16, IL-18, IL-21, інтерферонів, EMAP-II, GM-CSF, FGF і PDGF, представників сімейства TNF, наприклад, таких як TRAIL, FASL, APRIL, і т. д., і антитіл до ліпідних медіаторів захворювання, таких як простагландини, наприклад, PGE₂, SIP, LPA і т. д. Інші медіатори захворювання включають склеростин, NGF, речовина P, CGRP і інші медіатори болю. Антитіла або їх антиген-зв'язувальні частини можна комбінувати з антитілами до молекул клітинної поверхні, таких як CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), CD90, CTLA або їх ліганди, включаючи CD154 (gp39 або CD40L).

Ілюстративні лікарські засоби для комбінування з білками, що зв'язують TNF- α , або їх антиген-зв'язувальними фрагментами, перешкоджають аутоімунному і наступному запальному каскаду на різних етапах, наприклад, антагоністи TNF, такі як химерні, гуманізовані антитіла проти TNF або антитіла проти TNF людини D2E7 (публікація PCT № WO 97/29131), CA2 (REMICADE®), CDP 571 і розчинні рецептори TNF p55 або p75, їх похідні, (p75TNFR IgG (ENBRELE®) або p55TNFR IgG (Lenercept) і також інгібітори TNF α -перетворювального ферменту (TACE) і інші інгібітори IL-1 (інгібітори інтерлейкін-1-перетворювального ферменту, IL-1RA і т. д.). Інші засоби для комбінування з антитілами і їх антиген-зв'язувальними фрагментами включають інтерлейкін 11, засоби, що діють паралельно, залежно або узгоджено з функцією TNF- α , наприклад, такі як антагоністи IL-18 (наприклад, білки, що зв'язують IL-18, наприклад, такі як антитіла або розчинні рецептори IL-18 або їх антиген-зв'язувальні фрагменти. Додаткові

засоби для комбінування з антитілами і їх антиген-зв'язувальними фрагментами включають інгібітори CD4, антагоністи костимуляторного шляху CD80 (B7.1) або CD86 (B7.2), включаючи антитіла, розчинні рецептори, антагоністичні ліганди або їх антиген-зв'язувальні фрагменти.

Зв'язувальні білки або їх антиген-зв'язувальні частини також можна комбінувати з засобами для лікування ревматоїдного артриту, такими як метотрексат, 6-MP, азатіоприн, сульфасалазин, месалазин, олсалазин, хлорхінін/гідроксихлороквін, реніциламін, ауротіомалат (внутрішньом'язовий і пероральний), азатіоприн, колхіцин, кортикостероїди (пероральні, інгальована і локальна ін'єкція), агоністи бета-2-адренорецепторів (салбутамол, тербуталін, салметерал), ксантини (теофілін, амінофілін), кромоглікат, недокроміл, кетотифен, іпратропіум і окситроопіум, циклоспорин, FK506, рапаміцин, мікофенолату мофетил, лефлуномід, NSAID, наприклад, ібупрофен, кортикостероїди, такі як преднізолон, інгібітори фосфодіестерази, агоністи аденозину, антитромботичні засоби, інгібітори комплементу, адренергічні засоби, засоби, що перешкоджають передачі сигналу прозапальними цитокінами, такими як TNF α або IL-1 (наприклад, інгібітори IRAK, NIK, IKK, p38 або MAP-кінази), інгібітори IL-1 β -перетворювального ферменту, інгібітори TNF α -перетворювального ферменту (TACE), інгібітори T-клітинної передачі сигналу, такі як інгібітори кіназ, інгібітори металопротеїнази, сульфасалазин, азатіоприн, 6-меркаптопурини, інгібітори ангіотензинперетворювального ферменту, розчинні рецептори цитокінів і їх похідні (наприклад, розчинні рецептори p55 або p75 TNF і похідні p75TNFRlgG (ENBREL™) і p55TNFRlgG (Lenercept), sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R), протизапальні цитокіни (наприклад, IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 і TGF β), цеlexоксид, фолієва кислота, гідроксихлороквін сульфат, рофекоксид, етанерцепт, інфліксимаб, напроксен, вальдекоксид, сульфасалазин, метилпреднізолон, мелоксикам, метилпреднізолон ацетат, золота натрію тіомалат, аспірин, триамцінолону ацетонід, пропоксифену напсилат/арар, фолат, набуметон, диклофенак, піроксикам, етодолак, диклофенак натрію, оксапрозин, оксикодон hcl, гідрокодону бітарtrat/арар, диклофенак натрію/мізопростол, фентаніл, анакінра, людський рекомбінантний, трамадол hcl, салсалат, суліндак, ціанкобаламін/фа/піридоксин, ацетамінофен, алендронат натрій, преднізолон, морфіну сульфат, лідокаїну гідрохлорид, індометацин, глюкозамін сульфат/хондроїтин, амітриптилін hcl, сульфадіазин, оксикодон hcl/ацетамінофен, олопатадин hcl, мізопростол, напроксен натрію, омепразол, циклофосфамід, ритуксимаб, IL-1 TRAP, MRA, CTLA4-IG, IL-18 BP, антитіло проти IL-18, антитіло проти IL15, BIRB-796, SCIO-469, VX-702, AMG-548, VX-740, рофлуміласт, IC-485, CDC-801 і мезопрам.

Необмежуючі приклади лікарських засобів від запального захворювання кишечника, з якими можна комбінувати білок, що зв'язує TNF- α (наприклад, антитіло), або його антиген-зв'язувальну частину, включають наступні лікарські засоби: буденозид; епідермальний фактор росту; кортикостероїди; циклоспорин, сульфасалазин; аміносаліцилати; 6-меркаптопури; азатіоприн; метронідазол; інгібітори ліооксигенази; месаламін; олсалазин; балсалазид; антиоксиданти; інгібітори тромбосану; антагоністи рецептора IL-1; моноклональні антитіла проти IL-1 β ; моноклональні антитіла проти IL-6; фактори росту; інгібітори еластази; піридиніл-імідазольні сполуки; антитіла до, або антагоністи, інших цитокінів людини або факторів росту, наприклад, до TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-15, IL-16, IL-18, EMAP-II, GM-CSF, FGF і PDGF. Антитіла або їх антиген-зв'язувальні частини, можна комбінувати з антитілами до молекул клітинної поверхні, таким як CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD90 і їх лігандів. Зв'язувальні білки або їх антиген-зв'язувальні частини також можна комбінувати із засобами, такими як метотрексат, циклоспорин, FK506, рапаміцин, мікофенолат мофетил, лефлуномід, NSAID, наприклад, ібупрофен, кортикостероїди, такі як преднізолон, інгібітори фосфодіестерази, агоністи аденозину, антитромботичні засоби, інгібітори комплементу, адренергічні засоби, засоби, що перешкоджають передачі сигналу прозапальними цитокінами, такими як TNF α або IL-1 (наприклад, інгібітори IRAK, NIK, IKK, p38 або MAP-кіназ), інгібітори IL-1 α -перетворювального ферменту, інгібітори TNF α -перетворювального ферменту, інгібітори T-клітинної передачі сигналу, такі як інгібітори кіназ, інгібітори металопротеїнази, сульфасалазин, азатіоприн, 6-меркаптопурини, інгібітори ангіотензинперетворювального ферменту, розчинні рецептори цитокінів і їх похідні (наприклад, розчинні рецептори p55 або p75 TNF, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R) і протизапальні цитокіни (наприклад, IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 і TGF β).

Ілюстративні приклади лікарських засобів від хвороби Крона, з якими можна комбінувати білок, що зв'язує TNF- α , або його антиген-зв'язувальну частину, включають наступні засоби: антагоністи TNF, наприклад, антитіла проти TNF, D2E7 (публікація PCT № WO 97/29131; HUMIRA®), CA2 (REMICADE®), CDP 571, конструкції TNFR-Ig (p75TNFRlg (ENBREL®) і p55TNFRlg (Lenercept™)), інші антагоністи TNF, наприклад, такі як голімуаб (Simponi) і інгібітори PDE4. Зв'язувальні білки або їх антиген-зв'язувальні частини, можна комбінувати з кортикостероїдами, наприклад, буденозидом і дексаметазоном. Також зв'язувальні білки або їх

антиген-зв'язувальні частини можна комбінувати з засобами, такими як сульфасалазин, 5-аміносаліцилова кислота й олсалазин, і засобами, що перешкоджають синтезу або дії прозапальних цитокінів, таких як IL-1, наприклад, інгібіторами IL-1 α -перетворювального ферменту і IL-1RA. Зв'язувальні білки або їх антиген-зв'язувальні частини також можна

5 використовувати з інгібіторами Т-клітинної передачі сигналу, наприклад, інгібіторами тирозинкінази 6-меркаптопуринами. Зв'язувальні білки можна комбінувати з IL-11. Зв'язувальні білки або їх антиген-зв'язувальні частини можна комбінувати з мезаламіном, преднізоном, азатіоприном, меркаптопурином, інфліксимабом, метилпреднізолону натрію сукцинатом, дифеноксилатом/атропіну сульфатом, лопераміду гідрохлоридом, метотрексатом,

10 омепразолом, фолатом, ципрофлоксацином/водним розчином декстрази, гідроксодону бітартрата/арар, тетрацикліну гідрохлоридом, флуоцинонідом, метронідазолом, тимеросалом/борною кислотою, холестераміном/сахарозою, ципрофлоксацину гідрохлоридом, хісціаміну сульфатом, меперидину гідрохлоридом, мідазоламу гідрохлоридом, оксикодоном hcl/ацетамінофеном, прометазину гідрохлоридом, фосфатом натрію,

15 сульфаметоксазолом/триметопримом, цефексимом, полікарбофілом, пропоксифену напсилатом, гідрокортизоном, мультивітамінами, балсалазидом динатрію, кодеїну фосфатом/арар, колесевеламом hcl, ціанкобаламіном, фолієвою кислотою, левофлоксацином, метилпреднізолоном, наталізумабом і інтерферон-гамма.

Необмежуючі приклади лікарських засобів від розсіяного склерозу, з якими можна

20 комбінувати білок, що зв'язує TNF- α , або його антиген-зв'язувальну частину, включають наступні лікарські засоби: кортикостероїди; преднізолон; метилпреднізолон; азатіоприн; циклофосфамід; циклоспорин; метотрексат; 4-амінопіридин; тізанідин; інтерферон- β 1a (AVONEX®; Biogen); інтерферон- β 1b (BETASERON®; Chiron/Berlex); інтерферон α -n3 (Interferon Sciences/Fujimoto), інтерферон- α (Alfa Wassermann/J&J), інтерферон- β 1A-IF (Serono/Inhale Therapeutics), пегінтерферон- α 2b (Enzon/Schering-Plough), співполімер 1 (Cop-1; COPAXONE®; Teva Pharmaceutical Industries, Inc.); гіпербаричний кисень; внутрішньовенний імунглобулін; кладрибін; антитіла, або антагоністи, або інгібітори, до інших цитокінів людини або факторів

25 росту, наприклад, до TNF, LT, IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-1A, IL-15, IL-16, IL-18, EMAP-II, GM-CSF, FGF і PDGF. Антитіла або їх антиген-зв'язувальні частини можна комбінувати з антитілами до молекул клітинної поверхні, таких як CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80, CD86, CD90 або їх лігандів. Антитіла або їх зв'язувальні частини також можна комбінувати з засобами, такими як FK506, рапаміцин, мікофенолату мофетил, лефлуномід, NSAID, наприклад, ібупрофен, інгібітори фосфодіестерази, агоністи аденозину, антитромботичні засоби, інгібітори комплементу, адренергічні засоби, засоби, що перешкоджають передачі

35 сигналу прозапальними цитокінами, такими як TNF α або IL-1 (наприклад, інгібітори IRAK, NIK, IKK, p38 або MAP-кінази), інгібітори IL-1 β -перетворювального ферменту, інгібітори TACE, інгібітори Т-клітинної передачі сигналу, такі як інгібітори кінази, інгібітори металопротеїнази, сульфасалазин, азатіоприн, 6-меркаптопуринами, інгібітори ангіотензинперетворювального ферменту, розчинні рецептори цитокінів і їх похідні (наприклад, розчинні рецептори p55 або p75 TNF, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R), протизапальні цитокіни (наприклад, IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 і TGF β), COPAXONE® і інгібітори каспази, наприклад, інгібітори каспази-1.

40

Білки, що зв'язують TNF- α , або їх антиген-зв'язувальні частини також можна комбінувати з такими засобами, як алемтузумаб, дронабінол, Unimed, даклізумаб, мітоксантрон, ксаліпродену гідрохлорид, фампрідин, глатирамеру ацетат, наталізумаб, синабідол, а-імунокін NNSO3, ABR-215062, Anergis.MS, антагоністи рецепторів хемокінів, BBR-2778, калагуалін, CPI-1189, LEM (інкапсульований у ліпосомі мітоксантрон), THC.CBD (канабіноїдний агоніст) MBP-8298, мезапрам (інгібітор PDE4), MNA-715, антитіло проти рецептора IL-6, нейровакс, пірфенідон allotrap 1258 (RDP-1258), sTNF-R1, талампанел, терифлуномід, TGF- β 2, типлімотид, антагоністи VLA-4 (наприклад, TR-14035, VLA4 Ultrahaler, Antegran-ELAN/Biogen), антагоністи інтерферон-

50 гамма, агоністи IL-4.

Необмежуючі приклади лікарських засобів для лікування або профілактики стенокардії, з якими можна комбінувати білки, що зв'язують TNF- α , їх антиген-зв'язувальні частини, включають наступні: аспірин, нітрогліцерин, ізосорбіту мононітрат, метопрололу сукцинат, атенолол, метопрололу тартрат, амлодипіну безилат, дилтіазему гідрохлорид, ізосорбіту

55 динітрат, клопідогрелу бісульфат, ніфедипін, аторвастатин кальцію, хлорид калію, фуросемід, симвастатин, верапаміл hcl, дигоксин, пропранололу гідрохлорид, карведілол, лізиноприл, спіронолактон, гідрохлортиазид, еналаприлу малеат, надолол, раміприл, еноксапарин натрію, гепаринів натрію, валсартан, соталолу гідрохлорид, фенофібрат, езетиміб, буметанід, лозартан калію, лізиноприл/гідрохлортиазид, фелодипін, каптоприл і бізопрололу фумарат.

Необмежуючі приклади лікарських засобів для лікування або профілактики анкілозуючого спондиліту, з яким можна комбінувати зв'язувальний білок або його антиген-зв'язувальну частину, включають наступні: ібупрофен, диклофенак і мізопростол, напроксен, мелоксикам, індометацин, диклофенак, цефекоксиб, рофекоксиб, сульфасалазин, метотрексат, азатіоприн, міноциклін, преднізон, етанерцепт і інфліксимаб.

Необмежуючі приклади лікарських засобів для лікування або профілактики астми, з якими можна комбінувати білок, що зв'язує TNF- α , або його антиген-зв'язувальну частину, включають наступні: альбутерол, сальметерол/флутиказон, монтелукаст натрію, флутиказону пропіонат, будезонід, преднізон, сальметеролу ксинафоат, левальбутерол hcl, альбутеролу сульфат/іпратропіум, преднізолону натрію фосфат, триамцинолону ацетонід, беклометазону дипропіонат, іпратропіуму бромід, азитроміцин, піребутеролу ацетат, преднізон, безводний теофілін, метилпреднізолону натрію сукцинат, кларитроміцин, зафірлукаст, формотеролу фумарат, вакцина проти вірусу грипу, метилпреднізон, амоксициліну тригідрат, флунізолід, протиалергійна ін'єкція, кромолін натрію, фексофенадину гідрохлорид, флунізолід/ментол, амоксицилін/клавуланат, левофлоксацин, допоміжний пристрій для інгалятора, гуайфенезин, дексаметазону натрію фосфат, моксифлоксацин hcl, доксициліну гіклат, гуайфенезин/d-меторфан, п-ефедрин/cod/хлорфенір, гатифлоксацин, цетиразину гідрохлорид, мометазону фуруат, сальметеролу ксинафоат, бензонатат, цефалексин, ре/гідроксодон/хлорфенір, цетиразин hcl/псевдоефед, фенілефрин/cod/прометазин, кодеїн/прометазин, цефпрозил, дексаметазон, гуайфенезин/псевдоефедрин, хлорфеніраміні/гідроксодон, недокроміл натрію, тербуталіну сульфат, епінефрин, метилпреднізон і метапротеренолу сульфат.

Необмежуючі приклади лікарських засобів для лікування або профілактики COPD, з якими можна комбінувати білок, що зв'язує TNF- α , або його антиген-зв'язувальну частину, включають наступні: альбутеролу сульфат/іпратропіум, іпратропіуму бромід, сальметерол/флутиказон, альбутерол, сальметеролу ксинафоат, флутиказону пропіонат, преднізон, безводний теофілін, метилпреднізолону натрію сукцинат, монтелукаст натрію, будезонід, формотеролу фумарат, триамцинолону ацетонід, левофлоксацин, гуайфенезин, азитроміцин, беклометазону дипропіонат, левальбутерол hcl, флунізолід, цефтриаксон натрію, амоксициліну тригідрат, гатифлоксацин, зафірлукаст, амоксицилін/клавуланат, флунізолід/ментол, хлорфеніраміні/гідроксодон, метапротеренолу сульфат, метилпреднізон, мометазону фуруат, п-ефедрин/cod/хлорфенір, піребутеролу ацетат, п-ефедрин/лоратидин, тербуталіну сульфат, тіотропіум бромід, (R, R)-формотерол, TgAAT, ціломіласт і рофлуміласт.

Необмежуючі приклади лікарських засобів для лікування або профілактики HCV, з якими можна комбінувати білок, що зв'язує TNF- α , або його антиген-зв'язувальну частину, включають наступні: інтерферон-альфа-2a, інтерферон-альфа-2b, інтерферон-альфа con1, інтерферон-альфа-n1, пегільований інтерферон-альфа-2a, пегільований інтерферон-альфа-2b, рибавірин, пегінтерферон-альфа 2b + рибавірин, урсодезоксихолева кислота, гліциризина кислота, тималфазин, максамін, VX-497 і будь-які сполуки, що використовують для лікування HCV шляхом впливу на наступні мішені: полімераза HCV, протеаза HCV, хелікази, HCV IRES (внутрішній сайт зв'язування рибосоми).

Необмежуючі приклади лікарських засобів для лікування або профілактики ідіопатичного легеневого фіброзу, з якими можна комбінувати зв'язувальний білок або його антиген-зв'язувальну частину, включають наступні: преднізон, азатіоприн, альбутерол, колхіцин, альбутеролу сульфат, дигоксин, гамма-інтерферон, метилпреднізолону натрію сукцинат, лоразепам, фуросемід, лізиноприл, нітрогліцерин, спіронолактон, циклофосфамід, іпратропіуму бромід, актиноміцин d, альтеплазу, флутиказон пропіонат, левофлоксацин, метапротеренолу сульфат, морфіну сульфат, оксикодон HCl, хлорид калію, триамцинолону ацетонід, безводний такролімус, кальцій, інтерферон-альфа, метотрексат, мікофенолату мофетил, інтерферон-гамма-1 β .

Необмежуючі приклади лікарських засобів для лікування або профілактики інфаркту міокарда, з якими можна комбінувати білок, що зв'язує TNF- α , або його антиген-зв'язувальну частину, включають наступні: аспірин, нітрогліцерин, метопрололу тартрат, еноксапарин натрію, гепаринів натрію, клопідогрелу бісульфат, карведилол, атенолол, морфіну сульфат, метопрололу сукцинат, варфарин натрію, лізиноприл, ізосорбіту мононітрат, дигоксин, фуросемід, симвастатин, раміприл, тенектеплазу, еналаприлу малеат, торсемід, ретавазу, лозартан калію, квінаприл hcl/карбонат магнію, буметанід, альтеплазу, еналаприлат, аміодарону гідрохлорид, тирофібан hcl м-гідрат, дилтіазему гідрохлорид, каптоприл, ірбесартан, валсартан, пропранололу гідрохлорид, фосиноприл натрію, лідокаїну гідрохлорид, ептіфібатид, цефазолін натрію, атропіну сульфат, амінокапронову кислоту, спіронолактон, інтерферон, соталолу гідрохлорид, хлорид калію, докузат натрію, добутамін hcl, альпразолам, правастатин

натрію, аторвастатин кальцію, мідазоламу гідрохлорид, меперидину гідрохлорид, ізосорбіту динітрат, епінефрин, дофаміну гідрохлорид, бівалірудин, розувастатин, езетиміб/симвастатин, авасиміб і карипорид.

Необмежуючі приклади лікарських засобів для лікування або профілактики псоріазу, з якими можна комбінувати білок, що зв'язує TNF- α , або його антиген-зв'язувальну частину, включають наступні: кальципотриєн, клобетазолу пропіонат, триамцинолону ацетонід, галобетазолу пропіонат, тазаротен, метотрексат, флуоцинонід, бетаметазону дипропіонат посиленний, флуоцинолону ацетонід, ацитретин, шампунь з дьогтем, бетаметазону валерат, мометазону фуруат, кетоконазол, прамоксин/флуоцинолон, гідрокортизону валерат, флурандренолід, сечовину, бетаметазон, клобетазолу пропіонат/emoll, флутиказону пропаноат, азитроміцин, гідрокортизон, зволожувальний склад, фолієва кислота, дезонід, пімекролімус, кам'яновугільний дьоготь, дифлоразону діацетат, етанерцепту фолат, молочна кислота, метоксален, *hc/bismuth subgal/znox/resor*, метилпреднізолону ацетат, преднізон, сонцезахисний крем, галцинонід, саліцилова кислота, антралін, клокортолону півалат, вугільний екстракт, кам'яновугільний дьоготь/саліцилова кислота/сірк, дезоксиметазон, діазепам, пом'ягшувач, флуоцинонід/пом'ягшувач, мінеральне масло/рицинова олія/na lact, мінеральне масло/арахісова олія, вазелін/ізопропілміристат, псорален, саліцилова кислота, мило/трибромсалан, тимеросал/борна кислота, целекоксиб, інфліксимаб, циклоспорин, алефацепт, ефалізумаб, такролімус, пімекролімус, PUVA, UVB і сульфасалазин.

Необмежуючі приклади лікарських засобів для лікування або профілактики псоріатичного артриту, з якими можна комбінувати білок, що зв'язує TNF- α , або його антиген-зв'язувальну частину, включають наступні: метотрексат, етанерцепт, рофекоксиб, целекоксиб, фолієва кислота, сульфасалазин, напроксен, лефлуномід, метилпреднізолону ацетат, індометацин, гідроксихлороквіну сульфат, преднізон, суліндак, бетаметазону дипропіонат посиленний, інфліксимаб, метотрексат, фолат, триамцинолону ацетонід, диклофенак, диметилсульфоксид, піроксикам, диклофенак натрію, кетопрофен, мелоксикам, метилпреднізолон, набуметон, толметин натрію, кальципотриєн, циклоспорин, диклофенак натрію/мізопростол, флуоцинонід, глюкозаміну сульфат, золота натрію тіомалат, гідрокодону бітарtrat/арар, ібупрофен, ризедронат натрію, сульфадіазин, тіогуанін, вальдекоксиб, алефацепт і ефалізумаб.

Необмежуючі приклади лікарських засобів для лікування або профілактики рестеноза, з якими можна комбінувати білок, що зв'язує TNF- α , або його антиген-зв'язувальну частину, включають наступні: сиролімус, паклітаксел, еверолімус, такролімус, АВТ-578 і ацетамінофен.

Необмежуючі приклади лікарських засобів для лікування або профілактики ішіасу, з якими можна комбінувати білок, що зв'язує TNF- α , або його антиген-зв'язувальну частину, включають наступні: гідрокодону бітарtrat/арар, рофекоксиб, циклобензаприн *hcl*, метилпреднізолон, напроксен, ібупрофен, оксикодон *hcl*/ацетамінофен, целекоксиб, вальдекоксиб, метилпреднізолону ацетат, преднізон, кодеїну фосфат/арар, трамадол *hcl*/ацетамінофен, метаксалон, мелоксикам, метокарбамол, лідокаїну гідрохлорид, диклофенак натрію, габапентин, дексаметазон, кариспродол, каторолаку трометамін, індометацин, ацетамінофен, діазепам, набуметон, оксикодон *hcl*, тизанідин *hcl*, диклофенак натрію/мізопростол, пропоксифену напсилат/арар, *asa/oxycod/оксикодон ter*, ібупрофен/гідрокодону *bit*, трамадол *hcl*, етодолак, пропоксифен *hcl*, амітриптилін *hcl*, кариспродол/кодеїн *phos/asa*, морфіну сульфат, мультивітаміни, напроксен натрію, орфенадрину цитрат і темазепам.

Необмежуючі приклади лікарських засобів для лікування або профілактики системного червоного вовчка (SLE), з якими можна комбінувати білок, що зв'язує TNF- α , або його антиген-зв'язувальну частину, включають наступні: NSAID, наприклад, диклофенак, напроксен, ібупрофен, піроксикам, індометацин; інгібітори COX2, наприклад, целекоксиб, рофекоксиб, вальдекоксиб; протималярійні засоби, наприклад, гідроксихлороквін; стероїди, наприклад, преднізон, преднізолон, буденозид, дексаметазон; цитотоксичні засоби, наприклад, азатіоприн, циклофосфамід, мікофенолату мофетил, метотрексат; інгібітори PDE4 або інгібітор синтезу пуринів, наприклад, CELLCEPT®. Зв'язувальні білки або їх антиген-зв'язувальні частини також можна комбінувати з такими засобами, як сульфасалазин, 5-аміносаліцилова кислота, олсалазин, Imuran і засоби, що перешкоджають синтезу, продукції або дії прозапальних цитокінів, таких як IL-1, наприклад, інгібітори каспаз, такі як інгібітори IL-1 β -перетворювального ферменту і IL-1ra. Зв'язувальні білки або їх антиген-зв'язувальні частини також можна використовувати з інгібіторами Т-клітинної передачі сигналу, наприклад, інгібіторами тирозинкінази; або молекулами, що націлені на молекули активації Т-клітин, наприклад, CTLA-4-IgG або антитіла проти сімейства B7 і антитіла проти сімейства PD-1. Зв'язувальні білки або їх антиген-зв'язувальні частини можна комбінувати з IL-11 або антитілами проти цитокінів, наприклад, фонотолізумабом (антитіло проти IFN γ), або антитілами проти рецепторів,

наприклад, антитіла проти рецептора IL-6 і антитіла до молекули поверхні В-клітин. Зв'язувальні білки або їх антиген-зв'язувальні частини також можна використовувати з LJP 394 (абетимус), засобами, що виснажують або інактивують В-клітини, наприклад, ритуксимабом (антитіло проти CD20), лімфостатом-В (антитіло проти Bly), антагоністами TNF, наприклад, антитілами проти TNF, D2E7 (публікація РСТ № WO 97/29131; HUMIRA®), CA2 (REMICADE®), CDP 571, конструкціями TNFR-Ig, (p75TNFRlg (ENBRELE®) і p55TNFRlg.

Фармацевтичні композиції можуть включати "терапевтично ефективну кількість" або "профілактично ефективну кількість" білка, що зв'язує TNF α , або його антиген-зв'язувальної частини. "Терапевтично ефективна кількість" стосується кількості, ефективною, у дозуваннях і протягом періодів часу, необхідних для досягнення бажаного терапевтичного результату. Терапевтично ефективна кількість зв'язувального білка або його антиген-зв'язувальної частини, описаних у даному описі, може визначити фахівець у даній галузі, і вона може варіювати, залежно від таких факторів, як хворобливий стан, вік, стать і маса індивідуума, і здатність антитіла або його антиген-зв'язувальної частини викликати бажану відповідь в індивідуума. Також терапевтично ефективна кількість являє собою кількість, при якому терапевтично сприятливі ефекти переважають будь-які токсичні або шкідливі ефекти антитіла або його антиген-зв'язувальної частини. "Профілактично ефективна кількість" стосується кількості, ефективною, у дозуваннях і протягом періодів часу, необхідних для досягнення бажаного профілактичного результату. Як правило, оскільки профілактичну дозу використовують в індивідуумів до захворювання або на ранній стадії захворювання, профілактично ефективна кількість є меншою, ніж терапевтично ефективна кількість.

Режими дозування можна змінювати для забезпечення оптимальної бажаної відповіді (наприклад, терапевтичної або профілактичної відповіді). Наприклад, можна проводити однократне болюсне введення, можна вводити декілька розділених доз з часом або дозу можна пропорційно знижувати або збільшувати залежно від терапевтичної ситуації. Особливо переважним є виготовлення парентеральних композицій у вигляді одиничної дозованої форми для простоти введення й однаковості дозування. Одинична дозована форма стосується фізично дискретних одиниць, придатних для однократних дозувань у ссавців, що підлягають лікуванню; причому кожна одиниця містить задану кількість активної сполуки, обчислена для досягнення бажаного ефекту, разом з необхідним фармацевтичним носієм. Характеристики одиничних дозованих форм визначаються і прямо залежать від (а) унікальних характеристик активної сполуки і конкретного терапевтичного або профілактичного ефекту, що підлягає досягненню, і (b) обмежень, властивих галузі виготовлення такої активної сполуки, для лікування чутливості в індивідуумів.

Ілюстративний необмежувачий діапазон для терапевтично або профілактично ефективної кількості білка, що зв'язує TNF α , або його антиген-зв'язувальної частини складає від приблизно 0,1 до приблизно 20 мг/кг, від приблизно 1 до приблизно 10 мг/кг. Величини дозувань можуть варіювати, залежно від типу і тяжкості стану, що підлягає зм'якшенню. Для конкретного індивідуума конкретні режими дозування варто коректувати відповідно до потреб індивідуума і професійних рішень особи, що вводить або спостерігає за введенням композицій. Діапазони дозувань, вказаних у даному описі, є тільки ілюстративними і не призначені для обмеження об'єму або застосування на практиці заявленої композиції.

Фахівцям у даній галузі зрозуміло, що інші придатні модифікації й адаптації композицій і способів, описаних у даному описі, є очевидними і їх можна проводити з використанням придатних еквівалентів без відхилення від об'єму або винаходу варіантів здійснення, описаних у даному описі. Дані варіанти здійснення будуть більш зрозумілими за допомогою наступних прикладів, що включені тільки для ілюстрації і не призначені для обмеження.

Приклади

Приклад 1: Одержання моноклональних антитіл проти TNF- α людини

Моноклональні антитіла миші проти TNF- α людини одержують у такий спосіб:

Приклад 1.1: Імунізація мишей антигеном TNF- α людини

Двадцять мікрограм рекомбінантного очищеного TNF- α людини (R&D Systems, Minneapolis, MN, США), змішаного з повним ад'ювантом Фрейнда або ад'ювантом Immunoeasy (Qiagen, Valencia, CA), ін'єктують підшкірно п'ятьом мишам Balb/C, п'яти мишам C57B/6 і п'яти мишам AJ у віці 6-8 тижнів на 1 добу. На 24, 38 і 49 добу двадцять мікрограм рекомбінантного очищеного антигену TNF- α людини, змішаного з неповним ад'ювантом Фрейнда або ад'ювантом Immunoeasy, ін'єктують підшкірно тим же мишам. На 84 добу, або 112 добу, або 144 добу мишам ін'єктують внутрішньо 1 мкг рекомбінантного очищеного антигену TNF- α людини.

Приклад 1.2. Одержання гібридом

Спленоцити, отримані від імунізованих мишей, описаних у прикладі 1.1, піддають злиттю з клітинами SP2/O-Ag-14 у співвідношенні 5:1 відповідно до загальноприйнятого способу, описаного Kohler, G. and Milstein (1975) Nature, 256:495, для одержання гібридом. Продукти злиття висівають у селективне середовище, що містить азасерин і гіпоксантин, у 96-ямкових планшетах із щільністю $2,5 \times 10^6$ клітин селезінки на ямку. Через від семи до десяти діб після злиття спостерігають макроскопічні колонії гібридом. Супернатант із кожної ямки, що містить колонії гібридом, тестують за допомогою ELISA відносно присутності антитіла до TNF- α . Потім супернатанти, що виявляють специфічну активність відносно TNF- α , досліджують відносно здатності нейтралізовувати TNF- α у біологічному аналізі L929 (як описано в прикладі 2.7).

Приклад 1.3: Ідентифікація й охарактеризація моноклональних антитіл проти TNF- α людини
Гібридами, що продукують антитіла, що зв'язують TNF- α , і здатні зв'язувати TNF- α специфічно, зокрема, гібридами зі значеннями IC_{50} у біологічному аналізі L929 меншим 5 нМ або меншим 5 нМ відтворюють у збільшеному масштабі і клонують лімітуючим розведенням.

Клітини гібридом збільшують у кількості в середовищі, що містить 10 % ембріональну телячу сироватку з низьким вмістом IgG (Hyclone #SH30151, Logan, UT). У середньому 250 мл кожного супернатанта гібридами (отриманого з клональної популяції) збирають, концентрують і очищають афінною хроматографією з білком А стандартними способами. Здатність очищених mAb інгібувати активність TNF- α визначають з використанням біологічного аналізу L929, як описано в прикладі 2.7.

Приклад 1.4 Визначення амінокислотної послідовності варіабельної області для кожного моноклонального антитіла миші проти TNF- α людини

Для кожного визначення амінокислотної послідовності, приблизно 1×10^6 клітин гібридами виділяють центрифугуванням і обробляють за допомогою Trizol (Gibco BRL/Invitrogen, Carlsbad, CA.) для виділення тотальної РНК відповідно до інструкцій виготівника. З тотальної РНК синтезують перший ланцюг ДНК із використанням системи для синтезу першого ланцюга Superscript First-Strand Synthesis System (Invitrogen, Carlsbad, CA) відповідно до інструкцій виготовлювача. Для запуску синтезу першого ланцюга використовують оліго(d) з метою відбору полі(А)+РНК. Потім продукт кДНК першого ланцюга ампліфікують за допомогою ПЛР за допомогою праймерів, сконструйованих для ампліфікації варіабельних областей імуноглобуліну миші (Ig-Primer Sets, Novagen, Madison, WI). Продукти ПЛР розділяють на агарозному гелі, вирізують, очищають, а потім субклонують за допомогою набору TOPO Cloning kit у вектор pCR2.1-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA) і трансформують у хімічно компетентні E. coli TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Для ідентифікації клонів, що містять вставку, проводять ПЛР колоній трансформантів. З клонів, що містять вставку, виділяють плазмідну ДНК із використанням набору QIAprep Miniprep kit (Qiagen, Valencia, CA). Вставки в плазміді секвенують на обох ланцюгах для визначення послідовностей ДНК варіабельних доменів важкого ланцюга або варіабельних доменів легкого ланцюга з використанням прямого M13 і зворотного M13 праймерів (Fermentas Life Sciences, Hanover MD). Послідовності варіабельної області важкого і легкого ланцюгів моноклональних антитіл проти TNF- α представлені в таблиці 5.

Приклад 2: Рекомбінантні антитіла проти TNF- α людини

Приклад 2.1: Конструювання й експресія рекомбінантних химерних антитіл проти TNF- α людини

ДНК, що кодує константну область важкого ланцюга моноклональних антитіл миші проти TNF- α людини MAK199, заміняли фрагментом кДНК, що кодує константну область IgG1 людини, що містить 2 мутації амінокислот у шарнірній області, шляхом гомологічної рекомбінації в бактеріях. Ці мутації являють собою заміну лейцину на аланін у положенні 234 (нумерація EU) і заміну лейцину на аланін у положенні 235 (Lund et al. (1991) J. Immunol. 147:2657). Константну область легкого ланцюга кожного з цих антитіл заміняли константною областю каппа людини. Повнорозмірні химерні антитіла людини тимчасово експресували в клітинах HEK293-6E шляхом котрансфекції химерної кДНК важкого і легкого ланцюга, ліgowаного у експресуючу плазмідну рHybE (публікація патенту США № US 20090239259). Клітинні супернатанти, що містять рекомбінантне химерне антитіло, очищали хроматографією з білком A-Sepharose і зв'язане антитіло елюювали додаванням кислотного буфера. Антитіла нейтралізували і піддавали діалізу в PBS.

Потім очищені химерні моноклональні антитіла проти TNF- α людини досліджували відносно їхньої здатності зв'язувати білок hTNF- α за допомогою ELISA для підтвердження зв'язування антигену.

Приклад 2.2: Конструювання антитіл проти TNF- α людини з пересадженими CDR

З використанням стандартних способів, добре відомих у даній галузі, послідовності CDR ланцюгів VH і VL моноклонального антитіла MAK199 (див. таблицю 5, вище) пересаджували в різні акцепторні послідовності важкого і легкого ланцюгів людини.

На основі вирівнювання послідовностей VH і VL з послідовностями VH і VL моноклонального антитіла MAK199, були вибрані наступні відомі послідовності людини:

а) VH1-18 (IGHV1-18) і VH7-4.1 (IGHV7-4-1) і з'єднувальні послідовності hJH6 для конструювання акцепторних послідовностей важкого ланцюга;

б) 1-39/O12 і 6-D1/A14, а також hJK2, для конструювання акцепторних послідовностей легкого ланцюга. Шляхом пересадження відповідних CDR VH і VL MAK199 у вказані акцепторні послідовності, одержували послідовності з пересадженими CDR, гуманізовані і модифіковані послідовності VH і VL (також див. таблицю 6, вище).

Приклад 2.3: Конструювання зворотних мутацій каркасної області в антитілах з пересадженими CDR

Для здійснення зворотних мутацій каркасної області гуманізованого антитіла, мутації вносять у послідовності антитіла з пересадженими CDR, отриманими відповідно до приклада 2.2, за допомогою синтезу de novo варіабельного домена і/або з використанням мутагенних праймерів і ПЛР, і способів, добре відомих у даній галузі. Різні комбінації зворотних мутацій і інших мутацій конструюють для кожної з пересаджуваних CDR у такий спосіб. Номера залишків для цих мутацій ґрунтуються на системі нумерації Кабат.

Для важких ланцюгів hMAK199VH.1z, один або декілька з наступних залишків контакту Vernier і VH/VL піддають зворотній мутації в такий спосіб: V2→I, Y91→F.

Додаткові мутації включають наступні: Q1→E

Для важких ланцюгів hMAK199VH.2z, один або декілька з наступних залишків контакту Vernier і VH/VL піддають зворотній мутації в такий спосіб: V2→M, V67→F, M69→F, T71→L, Y91→F.

Додаткові мутації включають наступні: Q1→E, R82→S, D85→E.

Для легкого ланцюга hMAK199Vk.1 один або декілька з наступних залишків контакту Vernier і VH/VL піддають зворотній мутації в такий спосіб: A43→T, P44→V, F71→Y і Y87→F.

Для легкого ланцюга hMAK199Vk.2 один або декілька з наступних залишків контакту Vernier і VH/VL піддають зворотній мутації в такий спосіб: V2→I, A43→T, P44→V, K49→Y, F71→Y і Y87→F.

Приклад 2.4: Одержання гуманізованих антитіл проти hTNFα, що містять зворотні мутації каркасної області в антитілах з пересадженими CDR

Послідовності можна використовувати для синтезу нуклеїнових кислот з використанням стандартних технологій синтезу ДНК або ампліфікації і збирання бажаних фрагментів антитіл у експресуючих векторах, з використанням стандартної технології рекомбінантних ДНК для експресії в клітинах. Наприклад, виходячи з амінокислотних послідовностей, визначають кодони нуклеїнових кислот і синтезують олігонуклеотидну ДНК за допомогою Blue Heron Biotechnology, Inc. (www.blueheronbio.com) Bothell, WA USA. Олігонуклеотиди збирають у дволанцюжкові фрагменти ДНК розміром 300-2000 пар основ, клонують у плазмідний вектор і їх послідовність перевіряють. Клоновані фрагменти збирають з використанням ферментативного процесу з одержанням повного гена і субклонують у експресуючий вектор. (Див. 7306914; 7297541; 7279159; 7150969; 20080115243; 20080102475; 20080081379; 20080075690; 20080063780; 20080050506; 20080038777; 20080022422; 20070289033; 20070287170; 20070254338; 20070243194; 20070225227; 20070207171; 20070150976; 20070135620; 20070128190; 20070104722; 20070092484; 20070037196; 20070028321; 20060172404; 20060162026; 20060153791; 20030215458 і 20030157643).

Наприклад, сконструйовані in silico гуманізовані антитіла, описані вище, можна вбудовувати в ділянку множинного клонування у векторі pHybE (публікація патенту США № US 2009/0239259). Бактеріальні колонії виділяють і плазмідну ДНК екстрагують; вставки кДНК повністю секвенують. Правильні гуманізовані важкі і легкі ланцюги, що відповідають кожному антитілу, котрансфікують у клітини HEK 293-6E для тимчасового продукування повнорозмірних гуманізованих антитіл проти TNF-α людини. Вектори pHybE, що містять пересаджену кДНК важкого ланцюга і пересаджену кДНК легкого ланцюга, котрансфікують у клітини HEK 293-6E. Супернатанти клітин, що містять рекомбінантне химерне антитіло, очищають хроматографією з білком A-Sepharose, і антитіло, що зв'язалося, елюють додаванням кислотного буфера. Антитіла нейтралізують і піддають діалізу в PBS. Гуманізовані антитіла описані в таблиці 7.

Таблиця 7

Гуманізовані антитіла проти TNF α

SEQ ID NO:	Область білка	Послідовність
		123456789012345678901234567890
37	hMAK199VH.1	Evqlvqsgselkkpgasvkvscasgytftnygmnnwvrqapggglewmgwintytgeptyaddfkgrfv sldtsvstaylqisslkaedtavyyccarkflttvvtdyamdywgqggtvtvss
38	hMAK199VH.1a	Eiqlvqsgselkkpgasvkvscasgytftnygmnnwvrqapggglewmgwintytgeptyaddfkgrfv sldtsvstaylqisslkaedtavyyccarkflttvvtdyamdywgqggtvtvss
39	hMAK199VH.1b	Evqlvqsgselkkpgasvkvscasgytftnygmnnwvrqapggglewmgwintytgeptyaddfkgrfv fsldtsvstaylqisslkaedtavyyccarkflttvvtdyamdywgqggtvtvss
40	hMAK199VH.2	Evqlvqsgaevkkpgasvkvscasgytftnygmnnwvrqapggglewmgwintytgeptyaddfkgrvt mttdtststaymelsslrstedtavyyccarkflttvvtdyamdywgqggtvtvss
41	hMAK199VH.2a	Eiqlvqsgaevkkpgasvkvscasgytftnygmnnwvrqapggglewmgwintytgeptyaddfkgrft tldtststaymelsslrstedtavyyccarkflttvvtdyamdywgqggtvtvss
42	hMAK199VH.2b	Eiqlvqsgaevkkpgasvkvscasgytftnygmnnwvrqapggglewmgwintytgeptyaddfkgrvtf tdtststaymelsslrstedtavyyccarkflttvvtdyamdywgqggtvtvss
43	hMAK199VL.1a	Diqmtqspsslsasvqdrvtitcrasqdisnylnwyqqkpgktvkliyytsrlqsgvpsrfsqsgsgtdytlis slqpedfatyfcqqgntlpptfgqggtkleik
44	hMAK199VL.1b	Diqmtqspsslsasvqdrvtitcrasqdisnylnwyqqkpgkapkliyytsrlqsgvpsrfsqsgsgtdytlis sslqpedfatyfcqqgntlpptfgqggtkleik
45	hMAK199VL.2a	Divmtqspafsvtpgekvitcrasqdisnylnwyqqkpdqtkliyytsrlqsgvpsrfsqsgsgtdyfttis sleaedaatyfcqqgntlpptfgqggtkleik
46	hMAK199VL.2b	Divmtqspafsvtpgekvitcrasqdisnylnwyqqkpdqapkliyytsrlqsgvpsrfsqsgsgtdyfttis ssleaedaatyfcqqgntlpptfgqggtkleik

Приклад 2.5: Пари VH/VL гуманізованого антитіла проти hTNF α hMAK199

АВТ унікальний ID	VH	VL
AB351	hMAK199VH.1	hMAK199VL.1
AB352	hMAK199VH.1	hMAK199VL.1a
AB353	hMAK199VH.1	hMAK199VL.1b
AB354	hMAK199VH.1	hMAK199VL.2
AB355	hMAK199VH.1	hMAK199VL.2a
AB356	hMAK199VH.1	hMAK199VL.2b
AB357	hMAK199VH.1a	hMAK199VL.1
AB358	hMAK199VH.1a	hMAK199VL.1a
AB359	hMAK199VH.1a	hMAK199VL.1b
AB360	hMAK199VH.1a	hMAK199VL.2
AB361	hMAK199VH.1a	hMAK199VL.2a
AB362	hMAK199VH.1a	hMAK199VL.2b
AB363	hMAK199VH.1b	hMAK199VL.1
AB364	hMAK199VH.1b	hMAK199VL.1a
AB365	hMAK199VH.1b	hMAK199VL.1b
AB366	hMAK199VH.1b	hMAK199VL.2
AB367	hMAK199VH.1b	hMAK199VL.2a
AB368	hMAK199VH.1b	hMAK199VL.2b
AB369	hMAK199VH.2	hMAK199VL.1
AB370	hMAK199VH.2	hMAK199VL.1a
AB371	hMAK199VH.2	hMAK199VL.1b
AB372	hMAK199VH.2	hMAK199VL.2
AB373	hMAK199VH.2	hMAK199VL.2a
AB374	hMAK199VH.2	hMAK199VL.2b
AB375	hMAK199VH.2a	hMAK199VL.1

ABT унікальний ID	VH	VL
AB376	hMAK199VH.2a	hMAK199VL.1a
AB377	hMAK199VH.2a	hMAK199VL.1b
AB378	hMAK199VH.2a	hMAK199VL.2
AB379	hMAK199VH.2a	hMAK199VL.2a
AB380	hMAK199VH.2a	hMAK199VL.2b
AB381	hMAK199VH.2b	hMAK199VL.1
AB382	hMAK199VH.2b	hMAK199VL.1a
AB383	hMAK199VH.2b	hMAK199VL.1b
AB384	hMAK199VH.2b	hMAK199VL.2
AB385	hMAK199VH.2b	hMAK199VL.2a
AB386	hMAK199VH.2b	hMAK199VL.2b

Приклад 2.6: Визначення афінності з використанням технології BIACORE

Таблиця 8

Реагент, використовуваний в аналізах Biacore

Антиген	Торгова назва	Постачальник	Каталожний #
TNF α	Recombinant Human TNF- α /TNFSF1A	R&D systems	210-TA

5 Способи BIACORE:

Аналіз BIACORE (Biacore, Inc, Piscataway, NJ) визначає афінність антитіл шляхом кінетичних вимірювань констант швидкості асоціації і швидкості дисоціації. Зв'язування антитіл з антигеном-мішенню (наприклад, очищеним рекомбінантним антигеном-мішенню) визначають за допомогою вимірювань на основі поверхневого плазмонного резонансу з використанням пристрою Biacore® 1000 або 3000 (Biacore® AB, Uppsala, Швеція) з використанням рухомого HBS-EP (10 мМ HEPES [pH 7,4], 150 мМ NaCl, 3 мМ EDTA і 0,005 % поверхнево-активна речовина P20) при 25 °C. Усі хімічні реагенти одержують від Biacore® AB (Uppsala, Швеція) або в іншому випадку від іншого джерела, як описано. Наприклад, приблизно 5000 RU специфічного до фрагмента (Fc γ) IgG миші поліклонального антитіла кози (Pierce Biotechnology Inc, Rockford, IL), розведеного в 10 мМ ацетаті натрію (pH 4,5) прямо іммобілізують на біосенсорному чіпі CM5 для цілей дослідження з використанням стандартного набору приєднання амінів відповідно до інструкцій і методикам виготовлювача, у концентрації 25 мкг/мл. Групи не вступили в реакцію, на поверхні біосенсора блокують етаноламіном. Модифіковану карбоксиметилдекстраном поверхню в проточній комірці 2 і 4 використовують як реакційну поверхню. Немодифікований карбоксиметилдекстран без антитіла кози проти IgG миші в проточній комірці 1 і 3 використовують як еталонну поверхню. Для аналізу кінетики рівняння швидкості реакції, отримані в моделі Ленгмюра для зв'язування 1:1, апроксимують одночасно до фаз асоціації і дисоціації для усіх восьми реакцій (з використанням аналізу глобальної відповідності) з використанням програмного забезпечення Biaevaluation 4.0.1. Очищені антитіла розбавляють у забуференому HEPES сольовому розчині для уловлювання на реакційних поверхнях зі специфічними антитілами кози проти IgG миші. Антитіла, що підлягають уловлюванню як ліганд (25 мкг/мл), ін'єктують над реакційними матрицями зі швидкістю потоку 5 мкл/хв. Константи швидкості асоціації і дисоціації, k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$) і k_{off} (s^{-1}) визначають при постійній швидкості потоку 25 мкл/хв. Константи швидкостей визначають шляхом проведення вимірювань кінетики зв'язування при різних концентраціях антигену в діапазоні 10-200 нМ. Потім з кінетичних констант швидкості обчислюють рівноважну константу дисоціації (M) реакції між антитілами й антигеном-мішенню за наступною формулою: $K_D = k_{off}/k_{on}$. Зв'язування реєструють як функцію часу й обчислюють кінетичні константи швидкості. У цьому аналізі можуть бути вимірювані константи швидкості асоціації до $10^6 M^{-1}s^{-1}$ і константи швидкості дисоціації до $10^{-6} s^{-1}$.

Таблиця 9

Аналіз BIAcore антитіл проти hTNF α

ID антитіла	VH	VL	$k_{on} (M^{-1} s^{-1})$	$k_{off} (s^{-1})$	$k_D (M)$
AB351	hMAK199VH.1	hMAK199VL.1	2,00E+06	6,80E-04	3,50E-10
AB352	hMAK199VH.1	hMAK199VL.1a	2,10E+06	9,40E-04	4,50E-10
AB353	hMAK199VH.1	hMAK199VL.1b	2,00E+06	9,20E-04	4,60E-10
AB354	hMAK199VH.1	hMAK199VL.2	2,00E+06	1,00E-03	5,20E-10
AB355	hMAK199VH.1	hMAK199VL.2a	2,40E+06	1,40E-03	5,90E-10
AB356	hMAK199VH.1	hMAK199VL.2b	1,30E+06	8,90E-04	6,70E-10
AB357	hMAK199VH.1a	hMAK199VL.1	1,90E+06	1,30E-03	6,70E-10
AB358	hMAK199VH.1a	hMAK199VL.1a	1,40E+06	9,70E-04	7,00E-10
AB359	hMAK199VH.1a	hMAK199VL.1b	1,30E+06	9,30E-04	7,30E-10
AB360	hMAK199VH.1a	hMAK199VL.2	1,20E+06	9,70E-04	7,80E-10
AB361	hMAK199VH.1a	hMAK199VL.2a	1,20E+06	9,80E-04	7,90E-10
AB362	hMAK199VH.1a	hMAK199VL.2b	1,30E+06	1,10E-03	8,30E-10
AB363	hMAK199VH.1b	hMAK199VL.1	1,40E+06	1,20E-03	8,60E-10
AB364	hMAK199VH.1b	hMAK199VL.1a	1,20E+06	1,10E-03	8,90E-10
AB365	hMAK199VH.1b	hMAK199VL.1b	1,10E+06	1,00E-03	9,10E-10
AB366	hMAK199VH.1b	hMAK199VL.2	1,60E+06	1,50E-03	9,30E-10
AB367	hMAK199VH.1b	hMAK199VL.2a	1,00E+06	1,00E-03	1,00E-09
AB368	hMAK199VH.1b	hMAK199VL.2b	1,10E+06	1,10E-03	1,00E-09
AB369	hMAK199VH.2	hMAK199VL.1	9,40E+05	1,00E-03	1,10E-09
AB370	hMAK199VH.2	hMAK199VL.1a	1,00E+06	1,20E-03	1,10E-09
AB371	hMAK199VH.2	hMAK199VL.1b	1,50E+06	1,70E-03	1,20E-09
AB372	hMAK199VH.2	hMAK199VL.2	9,50E+05	1,10E-03	1,20E-09
AB373	hMAK199VH.2	hMAK199VL.2a	9,40E+05	1,20E-03	1,20E-09
AB374	hMAK199VH.2	hMAK199VL.2b	1,20E+06	1,50E-03	1,30E-09
AB375	hMAK199VH.2a	hMAK199VL.1	9,00E+05	1,10E-03	1,30E-09
AB376	hMAK199VH.2a	hMAK199VL.1a	1,10E+06	1,40E-03	1,30E-09
AB377	hMAK199VH.2a	hMAK199VL.1b	1,10E+06	1,50E-03	1,40E-09
AB378	hMAK199VH.2a	hMAK199VL.2	8,80E+05	1,30E-03	1,40E-09
AB379	hMAK199VH.2a	hMAK199VL.2a	8,90E+05	1,60E-03	1,80E-09
AB380	hMAK199VH.2a	hMAK199VL.2b	8,20E+05	1,50E-03	1,80E-09
AB381	hMAK199VH.2b	hMAK199VL.1	8,60E+05	1,70E-03	1,90E-09
AB382	hMAK199VH.2b	hMAK199VL.1a	7,40E+05	1,50E-03	2,00E-09
AB383	hMAK199VH.2b	hMAK199VL.1b	8,30E+05	1,80E-03	2,10E-09
AB384	hMAK199VH.2b	hMAK199VL.2	6,60E+05	1,40E-03	2,10E-09
AB385	hMAK199VH.2b	hMAK199VL.2a	8,80E+05	1,90E-03	2,20E-09
AB386	hMAK199VH.2b	hMAK199VL.2b	6,60E+05	1,50E-03	2,30E-09

Зв'язування всіх гуманізованих конструкцій, охарактеризованих за допомогою технології BIAcore, зберігалось і було порівняним зі зв'язуванням вихідного антитіла миші.

5 Приклад 2.7: Нейтралізація TNF α людини

Клітини L929 вирощували до щільності половинного змикання моношару і збирали з використанням 0,25 % трипсину (Gibco#25300). Клітини промивали PBS, підраховували і ресуспендували до кількості 1×10^6 клітин/мл у середовищі для аналізу, що містило 4 мкг/мл актиноміцину D. Клітини висівали в 96-ямковий планшет (Costar#3599) в об'ємі 100 мкл, і в кількості 5×10^4 клітин/ямку. Антитіла і контрольний IgG розбавляли до 4х концентрації в середовищі для аналізу і проводили серійні розведення 1:4. huTNF α розбавляли до 400 пг/мл у середовищі для аналізу. Зразок антитіла (200 мкл) додавали до huTNF α (200 мкл) за схемою розведення 1:2 дозволяли їм інкубуватися протягом 0,5 години при кімнатній температурі.

15 До посіяних клітин додавали розчин антитіло/TNF α людини в об'ємі 100 мкл до кінцевої концентрації 100 пг/мл huTNF α і 150 нМ - 0,0001 нМ антитіла. Планшети інкубували протягом 20 годин при 37 °C, 5 % CO₂. Для кількісного визначення життєздатності 100 мкл витягали з ямок і додавали 10 мкл реагенту WST-1 (Roche, каталожний № 11644807001). Планшети інкубували в умовах аналізу протягом 3,5 годин. Зчитування планшетів проводили при OD 420-600 нм на

пристрої для зчитування планшетів Spectromax 190 ELISA. Середня EC_{50} для декількох аналізів включена в таблицю 10.

Таблиця 10

Аналіз нейтралізації TNF α людини з гуманізованими антитілами проти hTNF α

ID антитіла	VH	VL	IC ₅₀ , нМ, в аналізі нейтралізації hTNF α
AB351	hMAK199VH.1	hMAK199VL.1	1,06
AB352	hMAK199VH.1	hMAK199VL.1a	0,35
AB353	hMAK199VH.1	hMAK199VL.1b	0,66
AB354	hMAK199VH.1	hMAK199VL.2	ND
AB355	hMAK199VH.1	hMAK199VL.2a	1,90
AB356	hMAK199VH.1	hMAK199VL.2b	0,87
AB357	hMAK199VH.1a	hMAK199VL.1	1,94
AB358	hMAK199VH.1a	hMAK199VL.1a	0,21
AB359	hMAK199VH.1a	hMAK199VL.1b	3,78
AB360	hMAK199VH.1a	hMAK199VL.2	ND
AB361	hMAK199VH.1a	hMAK199VL.2a	0,82
AB362	hMAK199VH.1a	hMAK199VL.2b	2,11
AB363	hMAK199VH.1b	hMAK199VL.1	0,32
AB364	hMAK199VH.1b	hMAK199VL.1a	0,35
AB365	hMAK199VH.1b	hMAK199VL.1b	1,52
AB366	hMAK199VH.1b	hMAK199VL.2	ND
AB367	hMAK199VH.1b	hMAK199VL.2a	0,53
AB368	hMAK199VH.1b	hMAK199VL.2b	1,09
AB369	hMAK199VH.2	hMAK199VL.1	>20
AB370	hMAK199VH.2	hMAK199VL.1a	3,78
AB371	hMAK199VH.2	hMAK199VL.1b	>20
AB372	hMAK199VH.2	hMAK199VL.2	ND
AB373	hMAK199VH.2	hMAK199VL.2a	>20
AB374	hMAK199VH.2	hMAK199VL.2b	>20
AB375	hMAK199VH.2a	hMAK199VL.1	11,45
AB376	hMAK199VH.2a	hMAK199VL.1a	3,65
AB377	hMAK199VH.2a	hMAK199VL.1b	>20
AB378	hMAK199VH.2a	hMAK199VL.2	ND
AB379	hMAK199VH.2a	hMAK199VL.2a	>20
AB380	hMAK199VH.2a	hMAK199VL.2b	>20
AB381	hMAK199VH.2b	hMAK199VL.1	5,90
AB382	hMAK199VH.2b	hMAK199VL.1a	1,19
AB383	hMAK199VH.2b	hMAK199VL.1b	>20
AB384	hMAK199VH.2b	hMAK199VL.2	ND
AB385	hMAK199VH.2b	hMAK199VL.2a	9,76
AB386	hMAK199VH.2b	hMAK199VL.2b	>20

- 5 Всі антитіла проти hTNF α продемонстрували нейтралізацію в аналізі нейтралізації TNF α .
 Приклад 2.8: Фізико-хімічний аналіз стабільності й аналіз стабільності in vitro гуманізованих моноклональних антитіл
 Ексклюзійна хроматографія
 Антитіла розбавляли до 2,5 мг/мл водою і 20 мл аналізували на системі для ВЕРХ Shimadzu з використанням стовпчика TSK gel G3000 SWXL (Tosoh Bioscience, каталожний # k5539-05k).
 10 Зразки елюювали зі стовпчика 211 мМ сульфатом натрію, 92 мМ фосфатом натрію, pH 7,0, при швидкості потоку 0,3 мл/хвилину. Робочі умови системи ВЕРХ є наступними:
 Рухома фаза: 211 мМ Na₂SO₄, 92 мМ Na₂HPO₄*7H₂O, pH 7,0
 Градієнт: ізократичний
 15 Швидкість потоку: 0,3 мл/хвилину
 Довжина хвилі детектора: 280 нм
 Температура охолоджувача автоматичного пробозабірника: 4 °C

Температура камери стовпчика: навколишня

Час аналізу: 50 хвилин

Таблиця 11 містить дані про чистоту експресованих конструкцій антитіл як відсоток мономера (неагрегованого білка з очікуваною молекулярною масою) при визначенні за допомогою описаного вище протоколу.

Таблиця 11

Чистота антитіл проти hTNF α при визначенні ексклюзійною хроматографією

ID антитіла	VH	VL	% мономера (чистота)
AB351	hMAK199VH.1	hMAK199VL.1	97
AB352	hMAK199VH.1	hMAK199VL.1a	97
AB353	hMAK199VH.1	hMAK199VL.1b	96
AB354	hMAK199VH.1	hMAK199VL.2	97
AB355	hMAK199VH.1	hMAK199VL.2a	98
AB356	hMAK199VH.1	hMAK199VL.2b	96
AB357	hMAK199VH.1a	hMAK199VL.1	96
AB358	hMAK199VH.1a	hMAK199VL.1a	97
AB359	hMAK199VH.1a	hMAK199VL.1b	95
AB360	hMAK199VH.1a	hMAK199VL.2	96
AB361	hMAK199VH.1a	hMAK199VL.2a	96
AB362	hMAK199VH.1a	hMAK199VL.2b	97
AB363	hMAK199VH.1b	hMAK199VL.1	98
AB364	hMAK199VH.1b	hMAK199VL.1a	100
AB365	hMAK199VH.1b	hMAK199VL.1b	100
AB366	hMAK199VH.1b	hMAK199VL.2	99
AB367	hMAK199VH.1b	hMAK199VL.2a	100
AB368	hMAK199VH.1b	hMAK199VL.2b	98
AB369	hMAK199VH.2	hMAK199VL.1	95
AB370	hMAK199VH.2	hMAK199VL.1a	94
AB371	hMAK199VH.2	hMAK199VL.1b	95
AB372	hMAK199VH.2	hMAK199VL.2	88
AB373	hMAK199VH.2	hMAK199VL.2a	88
AB374	hMAK199VH.2	hMAK199VL.2b	91
AB375	hMAK199VH.2a	hMAK199VL.1	97
AB376	hMAK199VH.2a	hMAK199VL.1a	98
AB377	hMAK199VH.2a	hMAK199VL.1b	97
AB378	hMAK199VH.2a	hMAK199VL.2	92
AB379	hMAK199VH.2a	hMAK199VL.2a	98
AB380	hMAK199VH.2a	hMAK199VL.2b	99
AB381	hMAK199VH.2b	hMAK199VL.1	85
AB382	hMAK199VH.2b	hMAK199VL.1a	81
AB383	hMAK199VH.2b	hMAK199VL.1b	83
AB384	hMAK199VH.2b	hMAK199VL.2	87
AB385	hMAK199VH.2b	hMAK199VL.2a	83
AB386	hMAK199VH.2b	hMAK199VL.2b	84

Антитіла проти hTNF α продемонстрували чудовий профіль SEC, причому більшість з них продемонструвала >95 % мономера.

10 SDS-PAGE

Антитіла аналізують за допомогою поліакриламідного гелю-електрофорезу з додецилсульфатом натрію (SDS-PAGE) як у відновлюваних, так і в невідновлюваних умовах. Адалімумаб партії AFP04C використовують як контроль. Для відновлюваних умов зразки змішують 1:1 з 2 \times tris-гліциновим буфером для зразка SDS-PAGE (Invitrogen, каталожний # LC2676, партія # 1323208) з 100 мМ DTT, і нагрівають при 60 °C протягом 30 хвилин. Для невідновлюваних умов зразки змішують 1:1 з буфером для зразка і нагрівають при 100 °C протягом 5 хвилин. Відновлені зразки (10 мг на доріжку) наносять на 12 % попередньо приготовлений tris-гліциновий гель (Invitrogen, каталожний # EC6005box, партія # 6111021) і

невідновлені зразки (10 мг на доріжку) наносять на 8 %-16 % попередньо приготовлений tris-гліциновий гель (Invitrogen, каталожний # EC6045box, партія # 6111021). SeeBlue Plus 2 (Invitrogen, каталожний # #LC5925, партія # 1351542) використовують як маркер молекулярної маси. Гелі аналізують у боксах для гелю з міні-комірками XCell SureLock (Invitrogen, каталожний # EI0001), і білки розділяють, спочатку застосовуючи напругу, що дорівнює 75, для ущільнення зразків у гелі, з наступною напругою, що дорівнює 125, до досягнення фронтом барвника нижньої частини гелю. Використовуваний рухомий буфер являє собою 1× буфер tris-гліцин SDS, приготовлений з 10× буфера tris-гліцин SDS (ABC, MPS-79-080106)). Гелі зафарбовують протягом ночі колоїдною синьою фарбою (Invitrogen, каталожний # 46-7015, 46-7016), і барвник видаляють за допомогою води Milli-Q доти, доки тло не стане чистим. Потім пофарбовані гелі сканують з використанням сканера Epson Expression (модель 1680, S/N DASX003641).

Аналіз швидкості осадження

Антитіла поміщають у камеру для зразка кожного з трьох стандартних двосекторних вуглецевих центральних елементів ероп. Ці центральні елементи мають оптичну довжину шляху 1,2 см і сконструйовані із сапфіровими вікнами. Як буфер для порівняння використовують PBS, і кожна камера містить 140 мкл. Усі зразки досліджують одночасно з використанням ротора з 4 отворами (AN-60Ti) в аналітичній ультрацентрифузі Beckman ProteomeLab XL-I (серійний номер # PL106C01).

Умови аналізу програмують і контроль центрифуги проводять з використанням ProteomeLab (v5.6). Зразкам і ротору дозволяють термічно зрівноважитися протягом однієї години перед аналізом (20,0±0,1 °C). Підтвердження належного навантаження комірок проводять при 3000 об/хв, і для кожної комірки проводять одне сканування. Умови аналізу швидкості осадження є наступними:

Об'єм комірки для зразка: 420 мл

Об'єм комірки для порівняння: 420 мл

Температура: 20 °C

Швидкість ротора: 35000 об/хв

Час: 8:00 годин

Довжина УФ-хвилі: 280 нм

Радіальний розмір кроку: 0,003 см

Збирання даних: Один результат на крок без усереднення сигналу.

Загальне число сканувань: 100

Вимірювання молекулярної маси інтактних антитіл за допомогою LC-MS

Молекулярну масу інтактних антитіл аналізують за допомогою LC-MS. Кожне антитіло розбавляють водою до приблизно 1 мг/мл. Для знесолення і внесення 5 мг зразка в мас-спектрометр API Qstar pulsar i (Applied Biosystems) використовують систему 1100 HPLC (Agilent) з мікропасткою для білка (Michrom Bioresources, Inc, каталожний # 004/25109/03). Для елювання зразків використовують короткий градієнт. Аналіз у градієнті проводять за допомогою рухомої фази А (0,08 % FA, 0,02 % TFA у воді для ВЕРХ) і рухомої фази В (0,08 % FA і 0,02 % TFA в ацетонітрилі) зі швидкістю потоку 50 мл/хвилину. Мас-спектрометр працює при напрузі розпилення 4,5 кВ із діапазоном відношення маси до заряду при скануванні від 2000 до 3500.

Вимір молекулярної маси легкого і важкого ланцюгів антитіла за допомогою LC-MS

Вимірювання молекулярної маси легкого ланцюга (LC), важкого ланцюга (HC) і деглікозилюваної HC антитіла проводять за допомогою LC-MS. Антитіло розбавляють до 1 мг/мл водою і зразок відновлюють до LC і HC за допомогою 10 mM DTT у кінцевій концентрації протягом 30 хвилин при 37 °C. Для деглікозилювання антитіла, 100 мг антитіла інкубують з 2 мл PNGase F, 5 мл 10 % N-октилглюкозиду в загальному об'ємі 100 мл протягом ночі при 37 °C. Після деглікозилювання зразок відновлюють DTT у кінцевій концентрації 10 mM протягом 30 хвилин при 37 °C. Для знесолення і внесення 5 мг зразка в мас-спектрометр API Qstar pulsar i (Applied Biosystems) використовують систему для ВЕРХ Agilent 1100 зі стовпчиком C4 (Vydac, каталожний # 214TP5115, S/N 060206537204069). Для елювання зразків використовують короткий градієнт. Аналіз у градієнті проводять за допомогою рухомої фази А (0,08 % FA, 0,02 % TFA у воді для ВЕРХ) і рухомої фази В (0,08 % FA і 0,02 % TFA в ацетонітрилі) зі швидкістю потоку 50 мл/хвилину. Мас-спектрометр працює при напрузі розпилення 4,5 кВ із діапазоном відношення маси до заряду при скануванні від 800 до 3500.

Пептидне картування

Антитіло денатурують протягом 15 хвилин при кімнатній температурі гідрохлоридом гуанідину в кінцевій концентрації 6 М у 75 mM бікарбонаті амонію. Денатуровані зразки відновлюють 10 mM DTT у кінцевій концентрації при 37 °C протягом 60 хвилин, з наступним

алкілюванням 50 мМ йодоцтовою кислотою (IAA) у темряві при 37 °C протягом 30 хвилин. Після алкілювання зразок піддають діалізу протягом ночі проти чотирьох літрів 10 мМ бікарбонату амонію при 4 °C. Після діалізу зразок розбавляють до 1 мг/мл 10 мМ бікарбонатом амонію, pH 7,8, і 100 мг антитіла розщеплюють або трипсином (Promega, каталожний # V5111), або Lys-C (Roche, каталожний # 11 047 825 001) при співвідношенні трипсин/Lys-C:антитіло 1:20 (мас/мас) при 37 °C протягом 4 год. Розщеплені продукти гасять 1 мл 1 н. HCl. Для пептидного картування з детекцією на мас-спектрометрі, 40 мл розщеплених продуктів розділяють зворотно-фазовою високоефективною рідинною хроматографією (ЗФВЕРХ) на колонку C18 (Vydac, каталожний # 218TP51, S/N NE9606 10.3.5) за допомогою системи для ВЕРХ Agilent 1100. Поділ пептидів проводять на градієнті з використанням рухомої фази А (0,02 % TFA і 0,08 % FA у воді для ВЕРХ) і рухомої фази В (0,02 % TFA і 0,08 % FA в ацетонітрилі) при швидкості потоку 50 мл/хвилину. Мас-спектрометр API QSTAR Pulsar і працює в позитивному режимі при напрузі розпилення 4,5 кВ із діапазоном відношення маси до заряду при скануванні від 800 до 2500.

Картування дисульфідних зв'язків

Для денатурації антитіла 100 мл антитіла змішують з 300 мл 8 М гуанідину HCl у 100 мМ бікарбонаті амонію. Величину pH перевіряють, щоб переконавшись, що вона знаходиться між 7 і 8, і зразки денатурують протягом 15 хвилин при кімнатній температурі в гуанідині HCl у кінцевій концентрації 6 М. Частину денатурованого зразка (100 мл) розбавляють 600 мл води Milli-Q з одержанням кінцевої концентрації гуанідин-HCl 1 М. Зразок (220 мг) розщеплюють або трипсином (Promega, каталожний # V5111, партія # 22265901), або Lys-C (Roche, каталожний # 11047825001, партія # 12808000) при відношеннях трипсин:антитіло 1:50 або Lys-C:антитіло 1:50 (мас/мас) (4,4 мг ферменту: 220 мг зразка) при 37 °C протягом приблизно 16 годин. До зразків додають додаткові 5 мг або трипсину Lys-C, і розщепленню дозволяють протікати протягом додаткових 2 годин при 37 °C. Розщеплення зупиняють додаванням до кожного зразка 1 мл TFA. Розщеплені зразки розділяють за допомогою ЗФВЕРХ із використанням стовпчика C18 (Vydac, каталожний # 218TP51 S/N NE020630-4-1A) на системі для ВЕРХ Agilent. Поділ проводять на градієнті, використаному для пептидного картування, з використанням рухомої фази А (0,02 % TFA і 0,08 % FA у воді для ВЕРХ) і рухомої фази В (0,02 % TFA і 0,08 % FA в ацетонітрилі) при швидкості потоку 50 мл/хвилину. Робочі умови для ВЕРХ є такими ж, як і умови, використані для пептидного картування. Мас-спектрометр API QSTAR Pulsar і працює в позитивному режимі при напрузі розпилення 4,5 кВ із діапазоном відношення маси до заряду при скануванні від 800 до 2500. Дисульфідні зв'язки визначають шляхом зіставлення ММ пептидів, що спостерігаються, з передвіщеними ММ пептидів після обробки або трипсином Lys-C пептидів, зв'язаних дисульфідними зв'язками.

Визначення вільного сульфгідрилу

Спосіб, використовуваний для кількісного визначення вільних цистеїнів в антитілі, оснований на реакції реагенту Еллмана, 5,5'-дитіо-біс(2-нітробензойної кислоти) (DTNB), із сульфгідрильними групами (SH), що дає характерний хромофорний продукт, 5-тіо-(2-нітробензойну кислоту) (TNB). Ця реакція ілюструється формулою:

DTNB+RSH → RS-TNB+TNB- + H+.

Поглинання TNB- вимірюють при 412 нм із використанням спектрофотометра Cary 50. Криву поглинання будують з використанням розведень 2 меркаптоетанолу (b-ME) як стандарт вільних SH, і концентрації вільних сульфгідрильних груп у білка визначають з поглинання зразка при 412 нм.

Стандартний маточний розчин b-ME одержують серійним розведенням 14,2 М b-ME водою для ВЕРХ до кінцевої концентрації 0,142 мМ. Потім одержують по трьох стандартах для кожної концентрації. Антитіло концентрують до 10 мг/мл з використанням центрифужного фільтра amicon ultra 10000 MWCO (Millipore, каталожний # UFC801096, партія # L3KN5251), і буфер заміняють на буфер для готування, використовуваний для адалімумабу (5,57 мМ одноосновний фосфат натрію, 8,69 мМ двоосновний фосфат натрію, 106,69 мМ NaCl, 1,07 мМ цитрат натрію, 6,45 мМ лимонна кислота, 66,68 мМ маніт, pH 5,2, 0,1 % (мас/об) Tween). Зразки змішують на пристрої для струшування при кімнатній температурі протягом 20 хвилин. Потім у кожен зразок додають 180 мл 100 мМ Tris-буфера, pH 8,1, і стандарт, а потім додають 300 мл 2 мМ DTNB у 10 мМ фосфатному буфері, pH 8,1. Після ретельного перемішування визначають поглинання зразків і стандартів при 412 нм на спектрофотометрі Cary 50. Стандартну криву одержують нанесенням на графік кількості вільних SH і OD₄₁₂ нм для стандартів b-ME. Вміст вільних SH у зразках обчислюють виходячи з цієї кривої, після вирахування значення для порожнього зразка.

Слабка катіонообмінна хроматографія

Антитіло розбавляють до 1 мг/мл 10 мМ фосфатом натрію, pH 6,0. Гетерогенність заряду аналізують з використанням системи для ВЕРХ Shimadzu з аналітичним стовпчиком WCX-10

ProPac (Dyonx, каталожний # 054993, S/N 02722). Зразки наносять на стовпчик у 80 % рухомої фази А (10 мМ фосфат натрію, рН 6,0) і 20 % рухомої фази В (10 мМ фосфат натрію, 500 мМ NaCl, рН 6,0) і елюють при швидкості потоку 1,0 мл/хвилину.

Визначення профілю олігосахаридів

5 Олігосахариди, що вивільняються після обробки антитіла PNGase F, перетворюють у похідні з реагентом для мічення, 2-амінобензамідом (2-AB). Флуоресцентно мічені олігосахариди розділяють нормально-фазовою високоефективною рідинною хроматографією (НФВЕРХ) і різні форми олігосахаридів охарактеризовують виходячи з порівняння часу утримання з відомими стандартами.

10 Спочатку антитіло розщеплюють PNGase F для відщиплення N-зв'язаних олігосахаридів від Fc-частини важкого ланцюга. Антитіло (200 мг) поміщають у пробірку Eppendorf об'ємом 500 мл разом з 2 мл PNGase F і 3 мл 10 % N-октилглюкозиду. Додають фосфатно-сольовий буфер для доведення кінцевого об'єму до 60 мл. Зразок інкубують протягом ночі при 37 °C у термічному змішувачі Eppendorf при 700 об/хв. Як контроль також за допомогою PNGase F розщеплюють адалімумаб партії AFP04C.

15 Після обробки PNGase F зразки інкубують при 95 °C протягом 5 хвилин у термічному змішувачі Eppendorf, установленому на 750 об/хв для преципітації білків, потім зразки поміщають у центрифугу Eppendorf на 2 хвилини при 10000 об/хв для осадження преципітованих білків. Супернатант, що містить олігосахариди, переносять у пробірку Eppendorf об'ємом 500 мл і сушать у speed-vac при 65 °C.

20 Олігосахариди мітять за допомогою 2AB з використанням набору для мічення за допомогою 2AB, придбаного від Prozyme (каталожний # GKK-404, партія # 132026). Реагент для мічення наготавлиють відповідно до інструкцій виготівника. У флакон з DMSO (надається в наборі) додають оцтову кислоту (150 мл, надається в наборі) і перемішують піпетуванням розчину вгору і вниз декілька разів. Суміш оцтова кислота/DMSO (100 мл) переносять у флакон з барвником 2-AB (безпосередньо перед застосуванням) і перемішують до повного розчинення. Потім розчин барвника додають у флакон з відновником (надається в наборі) і добре перемішують (реагент для мічення). У кожен висушений флакон зі зразком олігосахариду додають реагент для мічення (5 мл) і ретельно перемішують. Реакційні флакони поміщають у термічний змішувач Eppendorf, установлений на 65 °C і 700-800 об/хв для реакції протягом 2 годин.

30 Після реакції мічення надлишок флуоресцентного барвника видаляють з використанням касет GlycoClean S Cartridges від Prozyme (каталожний # GKI-4726). Перед додаванням зразків, касети промивають 1 мл води milli-Q, а потім 5 об'ємами по 1 мл 30 % розчину оцтової кислоти. Безпосередньо перед додаванням зразків, у касети додають 1 мл ацетонітрилу (Burdick and Jackson, каталожний # AH015-4).

35 Після проходження усього ацетонітрилу через касету, зразок наносять на центр недавно промитого диска і дозволяють йому абсорбуватися на диск протягом 10 хвилин. Диск промивають 1 мл ацетонітрилу, а потім п'ятьма об'ємами по 1-мл 96 % ацетонітрилу. Касети поміщають на пробірку Eppendorf об'ємом 1,5 мл, і мічені за допомогою 2-AB олігосахариди елюють за допомогою 3 об'ємів (кожен об'єм по 400 мл) води milli Q.

40 Олігосахариди розділяють з використанням стовпчика для ВЕРХ Glycosep N (каталожний # GKI-4728), з'єднаної із системою для ВЕРХ Shimadzu. Система для ВЕРХ Shimadzu складається з контролера системи, дегазатора, подвійних насосів, автоматичного пробозабірника з охолоджувачем зразка і детектора флуоресценції.

45 Стабільність при підвищених температурах

Кінцеву концентрацію антитіл доводять до 2 мг/мл за допомогою відповідних буферів, поверхнево-активних речовин, стабілізаторів і/або цукрів. Потім розчини антитіл піддають стерилізації фільтрацією і наготавлиють аліквоти по 0,25 мл у стерильних умовах. Аліквоти залишають при -80 °C, 5 °C, 25 °C або 40 °C протягом 1, 2 або 3 тижнів. Наприкінці періоду інкубації зразки аналізують ексклюзійною хроматографією і SDS-PAGE.

50 Стабільність зразків аналізують за допомогою SDS-PAGE як у відновлюваних, так і в невідновлюваних умовах. Використовувана методика є такою ж, як описано в даному описі. Гелі фарбують протягом ночі колоїдною синьою фарбою (Invitrogen, каталожний # 46-7015, 46-7016), і барвник видаляють за допомогою води Milli-Q доти, доки тло не стане чистим. Потім пофарбовані гелі сканують з використанням сканера Epson Expression (модель 1680, S/N DASX003641). Для одержання більшої чутливості, ті ж гелі зафарбовують сріблом з використанням набору для фарбування сріблом (Owl Scientific), і використовують процедури, рекомендовані виготівником.

Приклад 2.9: Трансфекція й експресія в клітинах HEK 293-6E

Конструкції векторів антитіл проти hTNF α трансфікували в клітини 293 для продукування білка. Використана методика тимчасової трансфекції 293 являє собою модифікацію способів, опублікованих у Durocher et al. (2002) Nucleic Acids Res. 30(2):E9 і Pham et al. (2005) Biotech. Bioengineering 90(3):332-44. Реагенти, які використовували в трансфекції, включали:

5 - Клітини HEK 293-6E (лінія клітин нирки ембріона людини, стабільно експресуюча EBNA1; отримана від National Research Council Canada), культивовані в одноразових флаконах Erlenmeyer в інкубаторі зі зволоженням при 130 об/хв, 37 °C і 5 % CO₂.

10 - Культуральне середовище: Середовище FreeStyle 293 Expression Medium (Invitrogen 12338-018) разом з 25 мкг/мл генетицину (G418) (Invitrogen 10131-027) і 0,1 % Pluronic F-68 (Invitrogen 24040-032).

- Середовище для трансфекції: Середовище FreeStyle 293 Expression Medium разом з 10 мм HEPES (Invitrogen 15630-080).

15 - Маточний розчин поліетиленіміну (PEI): 1 мг/мл стерильного маточного розчину, pH 7,0, що отриманий з лінійним PEI масою 25 кДа (Polysciences) і зберігається при температурі нижчій - 15 °C.

- Триптонне живильне середовище: 5 % мас/об стерильний маточний розчин триптонну N1 (Organotechnie, 19554) у середовищі FreeStyle 293 Expression Medium.

20 Готування клітин для трансфекції: Приблизно за 2-4 години до трансфекції клітини HEK 293-6E збирали центрифугуванням і ресуспендували в культуральному середовищі при щільності клітин приблизно 1 мільйон життєздатних клітин на мл. Для кожної трансфекції 40 мл суспензії клітин переносили в одноразовий 250 мл флакон Erlenmeyer і інкубували протягом 2-4 годин.

25 Трансфекція: Середовище для трансфекції і маточний розчин PEI попередньо нагрівали до кімнатної температури (RT). Для кожної трансфекції, 25 мкг плазмідної ДНК і 50 мкг поліетиленіміну (PEI) поєднували в 5 мл середовища для трансфекції і інкубували протягом 15-20 хвилин при RT для забезпечення утворення комплексів ДНК:PEI. Для трансфекції BR3-Ig, використовували 25 мкг плазмиди BR3-Ig на трансфекцію. 5 мл кожної суміші комплексу ДНК:PEI додавали до 40 мл культури, отриманої раніше, і її повертали в інкубатор зі зволоженням, установлений на 130 об/хв, 37 °C і 5 % CO₂. Через 20-28 годин у кожену суміш для трансфекції додавали 5 мл триптонного живильного середовища і культивування продовжували протягом 30 шести діб.

Таблиця 12 містить дані про вихід для вихідних антитіл, виражені в міліграмах на літр, у клітинах HEK 293-6E.

Таблиця 12

Виходи антитіл проти hTNF α при тимчасовій експресії в клітинах HEK 293-6E

ID антитіла	VH	VL	Вихід експресії (мг/л)
AB351	hMAK199VH.1	hMAK199VL.1	67
AB352	hMAK199VH.1	hMAK199VL.1a	56
AB353	hMAK199VH.1	hMAK199VL.1b	87
AB354	hMAK199VH.1	hMAK199VL.2	81
AB355	hMAK199VH.1	hMAK199VL.2a	54
AB356	hMAK199VH.1	hMAK199VL.2b	22
AB357	hMAK199VH.1a	hMAK199VL.1	78
AB358	hMAK199VH.1a	hMAK199VL.1a	63
AB359	hMAK199VH.1a	hMAK199VL.1b	92
AB360	hMAK199VH.1a	hMAK199VL.2	92
AB361	hMAK199VH.1a	hMAK199VL.2a	52
AB362	hMAK199VH.1a	hMAK199VL.2b	30
AB363	hMAK199VH.1b	hMAK199VL.1	27
AB364	hMAK199VH.1b	hMAK199VL.1a	2
AB365	hMAK199VH.1b	hMAK199VL.1b	4
AB366	hMAK199VH.1b	hMAK199VL.2	4
AB367	hMAK199VH.1b	hMAK199VL.2a	3
AB368	hMAK199VH.1b	hMAK199VL.2b	3
AB369	hMAK199VH.2	hMAK199VL.1	28
AB370	hMAK199VH.2	hMAK199VL.1a	20

AB371	hMAK199VH.2	hMAK199VL.1b	31
AB372	hMAK199VH.2	hMAK199VL.2	107
AB373	hMAK199VH.2	hMAK199VL.2a	73
AB374	hMAK199VH.2	hMAK199VL.2b	59
AB375	hMAK199VH.2a	hMAK199VL.1	105
AB376	hMAK199VH.2a	hMAK199VL.1a	83
AB377	hMAK199VH.2a	hMAK199VL.1b	106
AB378	hMAK199VH.2a	hMAK199VL.2	120
AB379	hMAK199VH.2a	hMAK199VL.2a	75
AB380	hMAK199VH.2a	hMAK199VL.2b	10
AB381	hMAK199VH.2b	hMAK199VL.1	48
AB382	hMAK199VH.2b	hMAK199VL.1a	55
AB383	hMAK199VH.2b	hMAK199VL.1b	70
AB384	hMAK199VH.2b	hMAK199VL.2	74
AB385	hMAK199VH.2b	hMAK199VL.2a	75
AB386	hMAK199VH.2b	hMAK199VL.2b	42

Всі антитіла добре експресувалися у клітинах HEK 293-6E. У більшості випадків із супернатантів клітин HEK 293-6E можна було легко одержати >50 мг/л очищеного антитіла.

5 Даний опис включає як посилання в повному обсязі способи, добре відомі в галузі молекулярної біології. Ці способи включають, але не обмежуються ними, способи, описані в наступних публікаціях:

Ausubel et al. eds., Short Protocols In Molecular Biology (4th Ed. 1999) John Wiley & Sons, NY (ISBN 0-471-32938-X).

10 Lu and Weiner eds., Cloning and Expression Vectors for Gene Function Analysis (2001) BioTechniques Press, Westborough, MA, 298 pp. (ISBN 1-881299-21-X).

Kontermann and Dübel eds., Antibody Engineering (2001) Springer-Verlag, NY, 790 pp. (ISBN 3-540-41354-5).

15 Old and Primrose, Principles of Gene Manipulation: An Introduction To Genetic Engineering (3d Ed. 1985) Blackwell Scientific Publications, Boston, MA. Studies in Microbiology; V.2:409 pp. (ISBN 0-632-01318-4).

Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2d ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY), Vols. 1-3 (ISBN 0-87969-309-6).

20 Winnacker, From Genes To Clones: Introduction To Gene Technology (1987) VCH Publishers, NY (translated by Horst Ibelgauf), 634 pp. (ISBN 0-89573-614-4).

Включення як посилання

25 Зміст усіх цитованих посилань (включаючи літературні посилання, патенти, патентні заявки і web-сайти), що можуть бути цитовані в даній заявці, включені в даний опис як посилання у повному обсязі, також як і посилання, цитовані в них. При здійсненні на практиці даного винаходу будуть використовуватися, якщо немає інших указівок, загальноприйняті способи імунології, молекулярної біології і клітинної біології, що добре відомі в даній галузі.

Еквіваленти

30 Винахід може бути здійснений в інших конкретних формах без відхилення від його суті або невід'ємних характеристик. Представлені вище варіанти здійснення, таким чином, варто вважати у всіх відношеннях ілюстративними, а не обмежувачими. Таким чином, об'єм винаходу визначається прикладеною формулою винаходу, а не представленим вище описом, і, таким чином, мається на увазі, що всі зміни, які потрапляють у значення і діапазон еквівалентності формули винаходу, охоплюються даним описом.

СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> ABBOTT LABORATORIES
ABBOTT GMBH & CO KG

<120> БІЛКИ, ЯКІ ЗВ'ЯЗУЮТЬ TNF- α

<130> 10795W001

<140> PCT/US2011/063955

<141> 2011-12-08

<150> 61/420,999

<151> 2010-12-08

<160> 46

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 157

<212> Білок

<213> Homo sapiens

<400> 1

Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val
1 5 10 15

Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Asp Arg
20 25 30

Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu
35 40 45

Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe
50 55 60

Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile
65 70 75 80

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

Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys
100 105 110

Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys
115 120 125

Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe
130 135 140

Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
145 150 155

<210> 2
 <211> 330
 <212> Білок
 <213> Homo sapiens

<400> 2

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

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu

225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 3
<211> 330
<212> Блок
<213> Homo sapiens

<400> 3
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 4
<211> 106
<212> Блок
<213> Homo sapiens

<400> 4
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
1 5 10 15

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr

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

<210> 5
 <211> 105
 <212> Білок
 <213> Homo sapiens

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

<210> 6
 <211> 4
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності:

Синтетичний консенсусний пептид

```

<220>
<221> МОДИФІКОВАНИЙ ЗАЛИШОК
<222> (3)..(3)
<223> Будь-яка амінокислота

<400> 6
Phe Gly Xaa Gly
1

<210> 7
<211> 9
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності:
        Синтетичний консенсусний пептид

<220>
<221> МОДИФІКОВАНИЙ ЗАЛИШОК
<222> (2)..(9)
<223> Будь-яка амінокислота

<400> 7
Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1                               5

<210> 8
<211> 5
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності:
        Синтетичний консенсусний пептид

<400> 8
Leu Glu Trp Ile Gly
1                               5

<210> 9
<211> 4
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності:
        Синтетичний консенсусний пептид

<220>
<221> МОДИФІКОВАНИЙ ЗАЛИШОК
<222> (3)..(3)
<223> Будь-яка амінокислота

<400> 9
Trp Gly Xaa Gly

```


1

<210> 10
 <211> 30
 <212> Блок
 <213> Homo sapiens

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

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

<210> 11
 <211> 14
 <212> Блок
 <213> Homo sapiens

<400> 11
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
 1 5 10

<210> 12
 <211> 32
 <212> Блок
 <213> Homo sapiens

<400> 12
 Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
 1 5 10 15

Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 13
 <211> 30
 <212> Блок
 <213> Homo sapiens

<400> 13
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

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

<210> 14
 <211> 14
 <212> Блок
 <213> Homo sapiens

<400> 14
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
 1 5 10

<210> 15
 <211> 32
 <212> Білок
 <213> Homo sapiens

<400> 15
 Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 16
 <211> 11
 <212> Білок
 <213> Homo sapiens

<400> 16
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 17
 <211> 11
 <212> Білок
 <213> Homo sapiens

<400> 17
 Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 18
 <211> 11
 <212> Білок
 <213> Homo sapiens

<400> 18
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 19
 <211> 11
 <212> Білок
 <213> Homo sapiens

<400> 19
 Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 20
 <211> 23
 <212> Білок
 <213> Homo sapiens

<400> 20
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 21
<211> 15
<212> Білок
<213> Homo sapiens

<400> 21
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 22
<211> 32
<212> Білок
<213> Homo sapiens

<400> 22
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 23
<211> 23
<212> Білок
<213> Homo sapiens

<400> 23
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Phe Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 24
<211> 15
<212> Білок
<213> Homo sapiens

<400> 24
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile Lys
1 5 10 15

<210> 25
<211> 32
<212> Білок
<213> Homo sapiens

<400> 25
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys

20

25

30

<210> 26
<211> 11
<212> Білок
<213> Homo sapiens

<400> 26
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 27
<211> 11
<212> Білок
<213> Homo sapiens

<400> 27
Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 28
<211> 11
<212> Білок
<213> Homo sapiens

<400> 28
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 29
<211> 11
<212> Білок
<213> Homo sapiens

<400> 29
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 30
<211> 11
<212> Білок
<213> Homo sapiens

<400> 30
Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 31
<211> 124
<212> Білок
<213> Mus sp.

<400> 31
Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Thr Val Met Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr

20										25										30										
Gly	Met	Asn	Trp	Val	Lys	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Lys	Trp	Met															
		35					40						45																	
Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Tyr	Thr	Gly	Glu	Pro	Thr	Tyr	Ala	Asp	Asp	Phe															
	50					55						60																		
Lys	Gly	Arg	Phe	Ala	Phe	Ser	Leu	Glu	Thr	Ser	Ala	Ser	Thr	Ala	Tyr															
65					70					75					80															
Leu	Gln	Ile	Asn	Asn	Leu	Lys	Asn	Glu	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys															
			85						90					95																
Ala	Arg	Lys	Phe	Leu	Thr	Thr	Val	Val	Val	Thr	Asp	Tyr	Ala	Met	Asp															
		100						105						110																
Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser																			
	115						120																							
<210> 32																														
<211> 107																														
<212> Билнок																														
<213> Mus sp.																														
<400> 32																														
Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Thr	Thr	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Leu	Gly															
1				5					10					15																
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Ser	Asn	Tyr															
		20						25					30																	
Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Asp	Gly	Thr	Val	Lys	Leu	Leu	Ile															
	35						40					45																		
Tyr	Tyr	Thr	Ser	Arg	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly															
	50					55					60																			
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Asn	Leu	Glu	Gln															
65					70					75				80																
Glu	Asp	Ile	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Gly	Asn	Thr	Leu	Pro	Pro															
				85					90					95																
Thr	Phe	Gly	Val	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys																				
		100						105																						
<210> 33																														
<211> 124																														
<212> Билнок																														

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності:
Синтетичний поліпептид

<400> 33

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

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

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Lys Phe Leu Thr Thr Val Val Val Thr Asp Tyr Ala Met Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 34

<211> 124

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності:
Синтетичний поліпептид

<400> 34

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Lys Phe Leu Thr Thr Val Val Val Thr Asp Tyr Ala Met Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 35
<211> 107
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності:
Синтетичний поліпептид

<400> 35
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

Tyr Tyr Thr Ser Arg 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 Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

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

<210> 36
<211> 107
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності:
Синтетичний поліпептид

<400> 36

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

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

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Thr Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

<210> 37

<211> 124

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності:
Синтетичний поліпептид

<400> 37

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

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

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Lys Phe Leu Thr Thr Val Val Thr Asp Tyr Ala Met Asp

100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 38
<211> 124
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності:
Синтетичний поліпептид

<400> 38
Glu Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Lys Phe Leu Thr Thr Val Val Val Thr Asp Tyr Ala Met Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 39
<211> 124
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності:
Синтетичний поліпептид

<400> 39
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr

20										25					30				
Gly	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met				
	35						40						45						
Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Tyr	Thr	Gly	Glu	Pro	Thr	Tyr	Ala	Asp	Asp	Phe				
	50					55					60								
Lys	Gly	Arg	Phe	Val	Phe	Ser	Leu	Asp	Thr	Ser	Val	Ser	Thr	Ala	Tyr				
	65				70					75					80				
Leu	Gln	Ile	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys				
				85					90					95					
Ala	Arg	Lys	Phe	Leu	Thr	Thr	Val	Val	Val	Thr	Asp	Tyr	Ala	Met	Asp				
			100					105						110					
Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
		115					120												
<210> 40																			
<211> 124																			
<212> Білок																			
<213> Штучна послідовність																			
<220>																			
<223> Опис штучної послідовності:																			
Синтетичний поліпептид																			
<400> 40																			
Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala				
1			5						10					15					
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asn	Tyr				
			20					25					30						
Gly	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met				
	35						40						45						
Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Tyr	Thr	Gly	Glu	Pro	Thr	Tyr	Ala	Asp	Asp	Phe				
	50					55					60								
Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Thr	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr				
	65				70					75					80				
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys				
				85					90					95					
Ala	Arg	Lys	Phe	Leu	Thr	Thr	Val	Val	Val	Thr	Asp	Tyr	Ala	Met	Asp				
			100					105						110					

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 41
<211> 124
<212> Блок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності:
Синтетичний поліпептид

<400> 41
Glu Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Lys Phe Leu Thr Thr Val Val Val Thr Asp Tyr Ala Met Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 42
<211> 124
<212> Блок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності:
Синтетичний поліпептид

<400> 42
Glu Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

48/5

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Lys Phe Leu Thr Thr Val Val Val Thr Asp Tyr Ala Met Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 43

<211> 107

<212> Вілок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності:
Синтетичний поліпептид

<400> 43

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

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

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

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

<210> 44

<211> 107
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності:
 Синтетичний поліпептид

<400> 44
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Pro
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 45
 <211> 107
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності:
 Синтетичний поліпептид

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

```

65              70              75              80

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

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

<210> 46
<211> 107
<212> Блок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності:
      Синтетичний поліпептид

<400> 46
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Phe Leu Ser Val Thr Pro Gly
1      5      10      15

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

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile
      35      40      45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
      50      55      60

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

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

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

```

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Зв'язувальний білок, який зв'язується з фактором некрозу пухлини альфа (TNF- α) людини, або його антиген-зв'язувальна частина, де зв'язувальний білок містить послідовність варіабельної області важкого ланцюга (VH) і послідовність варіабельної області легкого ланцюга (VL), де послідовність області VH вибрана з групи, яка складається з SEQ ID NO: 37, 38, 39, 40, 41 і 42; і де послідовність області VL вибрана з групи, яка складається з SEQ ID NO: 43, 44, 45 і 46.
- 10 2. Зв'язувальний білок за п. 1, що містить:
 - (a) поліпептид варіабельної області важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 або SEQ ID NO: 42, і
 - (b) поліпептид варіабельної області легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45 або SEQ ID NO: 46.
- 15 3. Зв'язувальний білок за п. 2, де вказаний зв'язувальний білок містить поліпептид варіабельної області важкого ланцюга і поліпептид варіабельної області легкого ланцюга, що містить відповідні амінокислотні послідовності:
 - SEQ ID NO: 37 і SEQ ID NO: 43;
 - 20 SEQ ID NO: 37 і SEQ ID NO: 44;
 - SEQ ID NO: 37 і SEQ ID NO: 45;
 - SEQ ID NO: 37 і SEQ ID NO: 46;
 - SEQ ID NO: 38 і SEQ ID NO: 43;
 - SEQ ID NO: 38 і SEQ ID NO: 44;
 - 25 SEQ ID NO: 38 і SEQ ID NO: 45;

- SEQ ID NO: 38 і SEQ ID NO: 46;
 SEQ ID NO: 39 і SEQ ID NO: 43;
 SEQ ID NO: 39 і SEQ ID NO: 44;
 SEQ ID NO: 39 і SEQ ID NO: 45;
 5 SEQ ID NO: 39 і SEQ ID NO: 46;
 SEQ ID NO: 40 і SEQ ID NO: 43;
 SEQ ID NO: 40 і SEQ ID NO: 44;
 SEQ ID NO: 40 і SEQ ID NO: 45;
 SEQ ID NO: 40 і SEQ ID NO: 46;
 10 SEQ ID NO: 41 і SEQ ID NO: 43;
 SEQ ID NO: 41 і SEQ ID NO: 44;
 SEQ ID NO: 41 і SEQ ID NO: 45;
 SEQ ID NO: 41 і SEQ ID NO: 46;
 SEQ ID NO: 42 і SEQ ID NO: 43;
 15 SEQ ID NO: 42 і SEQ ID NO: 44;
 SEQ ID NO: 42 і SEQ ID NO: 45 або
 SEQ ID NO: 42 і SEQ ID NO: 46.
4. Зв'язувальний білок за п. 1, де вказаний зв'язувальний білок являє собою молекулу імуноглобуліну, зв'язаний дисульфідними зв'язками Fv, моноклональне антитіло, scFv,
 20 химерний імуноглобулін, антитіло з пересадженими CDR, діатіло (diabody), поліспецифічний імуноглобулін, Fab, імуноглобулін з подвійною специфічністю, імуноглобулін з подвійним варіабельним доменом, Fab', біспецифічний імуноглобулін, F(ab')₂ або Fv.
5. Зв'язувальний білок за п. 1, де вказаний зв'язувальний білок містить константний домен IgM людини, константний домен IgG4 людини, константний домен IgG1 людини, константний домен
 25 IgE людини, константний домен IgG2 людини, константний домен IgG3 людини або константний домен IgA людини.
6. Зв'язувальний білок за п. 1, що додатково містить константну область важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2 або SEQ ID NO: 3.
7. Зв'язувальний білок за п. 1, що додатково містить константну область легкого ланцюга, що
 30 має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 4 або SEQ ID NO: 5.
8. Зв'язувальний білок за п. 1, де вказаний зв'язувальний білок здатний нейтралізувати TNF-α людини.
9. Зв'язувальний білок за п. 1, де вказаний зв'язувальний білок має константу швидкості асоціації (K_{on}) для мішені щонайменше приблизно $10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; щонайменше приблизно $10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$;
 35 щонайменше приблизно $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; щонайменше приблизно $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ або щонайменше приблизно $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, при вимірюванні способом поверхневого плазмонного резонансу.
10. Зв'язувальний білок за п. 1, де вказаний зв'язувальний білок має константу швидкості дисоціації (K_{off}) для мішені не більше ніж приблизно 10^{-3} s^{-1} ; не більше ніж приблизно 10^{-4} s^{-1} ; не
 40 більше ніж приблизно 10^{-5} s^{-1} або не більше ніж приблизно 10^{-6} s^{-1} , при вимірюванні за допомогою поверхневого плазмонного резонансу.
11. Зв'язувальний білок за п. 1, де вказаний зв'язувальний білок має константу дисоціації (KD) для мішені не більше ніж приблизно 10^{-7} M ; не більше ніж приблизно 10^{-8} M ; не більше ніж
 45 приблизно 10^{-9} M ; не більше ніж приблизно 10^{-10} M ; не більше ніж приблизно 10^{-11} M ; не більше ніж приблизно 10^{-12} M або не більше ніж 10^{-13} M , при визначенні за допомогою поверхневого плазмонного резонансу.
12. Зв'язувальний білок за п. 1, де вказаний зв'язувальний білок додатково містить молекулу імуноадгезії, візуалізуючий засіб, терапевтичний засіб або цитотоксичний засіб.
13. Зв'язувальний білок за п. 12, де вказаний візуалізуючий засіб являє собою радіоактивну мітку, фермент, флуоресцентну мітку, люмінесцентну мітку, біолюмінесцентну мітку, магнітну
 50 мітку або біотин.
14. Зв'язувальний білок за п. 13, де вказана радіоактивна мітка являє собою ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho або ^{153}Sm .
15. Зв'язувальний білок за п. 12, де вказаний терапевтичний засіб або цитотоксичний засіб являє собою антиметаболіт, алкілюючий засіб, антибіотик, фактор росту, цитокін,
 55 антианіогенний засіб, антимітотичний засіб, антрациклін, токсин або апоптотичний засіб.
16. Зв'язувальний білок за п. 1, де вказаний зв'язувальний білок має характер глікозилювання людини.
17. Зв'язувальний білок за п. 1, де вказаний зв'язувальний білок являє собою кристалізований зв'язувальний білок.
- 60 18. Виділена нуклеїнова кислота, що кодує зв'язувальний білок за п. 1.

19. Вектор, що містить виділену нуклеїнову кислоту, що кодує зв'язувальний білок за п. 1.
20. Вектор за п. 19, де вказаний вектор являє собою pcDNA, pTT, pTT3, pEFBOS, pBV, pJV, pHybE або pBJ.
21. Клітина-хазяїн, що містить вектор за п. 19.
- 5 22. Клітина-хазяїн за п. 21, де вказана клітина-хазяїн являє собою прокаріотичну клітину.
23. Клітина-хазяїн за п. 21, де вказана клітина-хазяїн являє собою еукаріотичну клітину.
24. Клітина-хазяїн за п. 23, де вказана еукаріотична клітина являє собою клітину найпростішого, клітину тварини, клітину рослини, клітину гриба, клітину ссавця, клітину птаха або клітину комах.
- 10 25. Клітина-хазяїн за п. 24, де вказана еукаріотична клітина являє собою *S. cerevisiae*, клітину CHO, клітину COS або клітину SF9.
26. Спосіб одержання білка, здатного зв'язувати TNF- α , причому спосіб включає стадії культивування клітини-хазяїна за п. 21 у культуральному середовищі в умовах, достатніх для продукування зв'язувального білка, здатного зв'язувати TNF- α .
- 15 27. Фармацевтична композиція, що містить зв'язувальний білок за п. 1 і фармацевтично прийнятний носій.
28. Фармацевтична композиція за п. 27, що додатково містить щонайменше один додатковий засіб для лікування порушення, при якому активність TNF- α є шкідливою.
29. Фармацевтична композиція за п. 28, де вказаний додатковий засіб являє собою:
- 20 терапевтичний засіб; візуалізуючий засіб; цитотоксичний засіб; інгібітор ангиогенезу; інгібітор кіназ; блокатор костимуляторної молекули; блокатор молекули адгезії; антитіло проти цитокіну або його функціональний фрагмент; метотрексат; циклоспорин; рапаміцин; FK506; мітку, що піддається виявленню, або репортер; антагоніст TNF; протиревматичний засіб; м'язовий релаксант; наркотичний засіб; нестероїдний протизапальний засіб (NSAID); анальгетик;
- 25 анестетик; седативний засіб; місцевий анестетик; нервово-м'язовий блокатор; протимікробний засіб; засіб проти псоріазу; кортикостероїд; анаболічний стероїд; еритропоєтин; засіб для імунізації; імуноглобулін; імунодепресивний засіб; гормон росту; гормонзамісний лікарський засіб; радіофармацевтичний засіб; антидепресант; антипсихотичний засіб; стимулятор; лікарський засіб проти астми; бета-агоніст; інгальований стероїд; пероральний стероїд;
- 30 епінефрин або його аналог; цитокін або антагоніст цитокіну.
30. Спосіб лікування ссавця, що включає стадію введення ссавцю ефективної кількості композиції за п. 27.
31. Спосіб зниження активності TNF- α людини, що включає приведення TNF- α людини в контакт із зв'язувальним білком за п. 1 так, щоб активність TNF- α людини знижувалася.
- 35 32. Спосіб зниження активності TNF- α людини в людини, що страждає на порушення, при якому активність TNF- α є шкідливою, що включає введення людині зв'язувального білка за п. 1 так, щоб активність TNF- α людини в людини знижувалася.
33. Спосіб лікування індивідуума від захворювання або порушення, при якому активність TNF- α є шкідливою, шляхом введення індивідууму зв'язувального білка за п. 1 так, щоб
- 40 забезпечувалося лікування.
34. Спосіб за п. 33, де порушення являє собою аутоімунне і/або запальне порушення, де аутоімунне і/або запальне порушення необов'язково вибрано з групи, яка складається з хвороби Крона, бляшкоподібного псоріазу, ревматоїдного артриту, псоріатичного артриту, остеоартриту, ювенільного ідіопатичного артриту, розсіяного склерозу, системного червоного вовчака,
- 45 анкілозуючого спондиліту, інсулінозалежного цукрового діабету, аутоімунного діабету, алергії і аутоімунного увеїту.
35. Спосіб за п. 34, де порушення являє собою респіраторне порушення; астму; алергічну і неалергічну астму; астму внаслідок інфекції; астму внаслідок інфекції респіраторно-синцитіальним вірусом (RSV); хронічне обструктивне захворювання легенів (COPD); стан, що
- 50 залучає запалення дихальних шляхів; еозинофілію; фіброз і надлишкову продукцію слизу; кістозний фіброз; фіброз легенів; атопічне порушення; атопічний дерматит; кропивницю; екзему; алергічний риніт; алергічний ентерогастрит; запальний і/або аутоімунний стан шкіри; запальний і/або аутоімунний стан органів шлунково-кишкового тракту; запальні захворювання кишечника (IBD); виразковий коліт; хворобу Крона; запальний і/або аутоімунний стан печінки; цироз
- 55 печінки; фіброз печінки; фіброз печінки, викликаний вірусом гепатиту В і/або С; склеродермію; пухлини або злоякісні пухлини; печінковоклітинну карциному; гліобластому; лімфому; лімфому Ходжкіна; вірусну інфекцію; бактеріальну інфекцію; паразитарну інфекцію; інфекцію HTLV-1; пригнічення прояву захисної імунної відповіді 1 типу або пригнічення прояву захисної імунної відповіді 1 типу в ході вакцинації.

36. Спосіб лікування пацієнта, що страждає на порушення, при якому TNF- α є шкідливим, що включає введення зв'язувального білка за п. 1 до, одночасно або після введення другого засобу, де другий засіб являє собою антитіло або його фрагмент, здатні зв'язувати IL-12 людини; PGE2; LPA; NGF; CGRP; SubP; RAGE; гістамін; блокатор рецептора гістаміну; брадикінін; IL-1-альфа; IL-1-бета; VEGF; PLGF; метотрексат; кортикостероїд, модулятор рецептора глюкокортикоїдів; циклоспорин, рапаміцин, FK506 або нестероїдний протизапальний засіб.

37. Спосіб лікування пацієнта, що страждає на порушення, при якому TNF- α є шкідливим, причому спосіб включає стадію введення зв'язувального білка за п. 1 до, одночасно або після введення другого засобу, де другий засіб вибраний з антагоністів TNF; розчинного фрагмента рецептора TNF; ENBREL®; антагоністів ферменту TNF; інгібіторів TNF α -перетворювального ферменту (TACE); антагоністів мускаринових рецепторів; антагоністів TGF-бета; інтерферону гамма; перфенідону; хіміотерапевтичних засобів, метотрексату; лефлуноміду; сиролімусу (рапаміцину) або його аналога, CCI-779; інгібіторів COX2 або cPLA2; імуномодуляторів; інгібіторів p38; TPL-2, інгібіторів MK-2 і NFkB; буденозиду; епідермального фактора росту; кортикостероїдів; циклоспорину; сульфасалазину; аміносаліцилатів; азатиоприну; метронідазолу; інгібіторів ліпоксигенази; мезаламіну; олсалазину; балсалазиду; антиоксидантів; інгібіторів тромбоксану; антагоністів рецептора IL-1; антитіл проти IL-1b; антитіл проти IL-6; факторів росту; інгібіторів еластази; піридинілімідазольних сполук; антитіл проти або агоністів TNF, LT, IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, IL-30, IL-31, IL-32, IL-33, EMAP-II, GM-CSF, FGF або PDGF; антитіл проти CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD90 або їх лігандів; FK506; рапаміцину; мікофенолату мофетилу; ібупрофену; преднізолону; інгібіторів фосфодіестерази; агоністів аденозину; антитромботичних засобів; інгібіторів комплементу; адренергічних засобів; інгібіторів кіназ IRAK, NIK, IKK, p38 або MAP; інгібіторів IL-1 β -перетворювального ферменту; інгібіторів TNF α -перетворювального ферменту; інгібіторів T-клітинної передачі сигналу; інгібіторів металопротеїнази; 6-меркаптопуринів; інгібіторів ангіотензинперетворювального ферменту; розчинних рецепторів цитокінів; розчинного рецептора p55 TNF; розчинного рецептора p75 TNF; sIL-1RI; sIL-1RII; sIL-6R; протизапальних цитокінів або TGFb.

38. Спосіб за пп. 30-37, де вказане введення індивідууму проводять щонайменше за допомогою парентерального, підшкірного, внутрішньом'язового, внутрішньовенного, внутрішньосуглобового, внутрішньобронхіального, внутрішньочеревного, внутрішньокапсулярного, внутрішньохрящового, внутрішньопорожнинного, внутрішньочеревнопорожнинного, внутрішньомозочкового, інтрацеребровентрикулярного, внутрішньокишкового, внутрішньошийного, внутрішньошлункового, внутрішньопечінкового, внутрішньоміокардіального, внутрішньокісткового, внутрішньотазового, внутрішньоперикардіального, внутрішньочеревинного, внутрішньоплеврального, внутрішньопростатичного, внутрішньолегеневого, внутрішньоректального, внутрішньониркового, інtrarетинального, внутрішньохребетного, інтрасиновіального, внутрішньогрудного, внутрішньоматкового, внутрішньоміхурового, болюсного, вагінального, ректального, букального, сублінгвального, інтраназального або трансдермального способів.

39. Спосіб виявлення TNF- α людини в зразку, що включає:

(i) приведення зразка в контакт із білком, що зв'язує TNF- α , за п. 1 або його частиною, що зв'язує TNF- α ; і
(ii) виявлення утворення комплексу між білком, що зв'язує TNF- α , або його зв'язувальною частиною і TNF- α у зразку, де статистично значима зміна утворення комплексу в зразку відносно утворення комплексу в контрольному зразку або відносно TNF- α у зразку вказує на присутність TNF- α у зразку.

40. Спосіб за п. 39, де зразок являє собою цільну кров, плазму, сироватку, сечу, слину або біоптат тканини.

41. Спосіб виявлення TNF- α людини в людини, що включає:

(i) введення білка, що зв'язує TNF- α , за п. 1 або його частини, що зв'язує TNF- α , досліджуваному індивідууму або контрольному індивідууму в умовах, що забезпечують зв'язування білка, що зв'язує TNF- α , або його частини, що зв'язує TNF- α , з TNF- α людини; і (ii) виявлення утворення комплексу між зв'язувальним білком або його зв'язувальною частиною і TNF- α , де статистично значима зміна утворення комплексу в досліджуваного індивідуума відносно контрольного індивідуума або відносно утворення комплексу в досліджуваного індивідуума в більш ранній момент часу вказує на присутність TNF- α .

Комп'ютерна верстка І. Мироненко

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

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