



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **110049** (13) **C2**
(51) МПК
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки: а 2013 10764	(72) Винахідник(и): Каматх Раджеш В. (US)
(22) Дата подання заявки: 08.02.2012	(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: 10.11.2015	(74) Представник: Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр. №115
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 61/440,853	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: US 2011/0008766 A1, 13.01.2011 US 2010/0303807 A1, 02.12.2010 Jooster et al.: "IL-1 alpha/beta blockade prevents cartilage and bone destruction in murine type II collagen-induced arthritis? whereas TNF-alpha blockade only ameliorates joint inflammation", J/ Immunol., 1999, 163(9):5049-5055 Chevalier et al.: "Desperately looking for the right target in osteoarthritis: the anti-IL-1 strategy", Arthritis Res. Ther., 26 August 2011, 13(4):124, abstract Malemud: "Anticytokine therapy for osteoarthritis: evidence to date", Drugs Aging., 2010, 27(2):95-115 Chevallier: "Upregulation of enzymatic activity by interleukin-1 in osteoarthritis", Biomed Pharmacother., 1997, 51(2):52-62 Niger et al.: "Interleukin-1beta increases Gap Junctional Communication among synovial fibroblasts via the extracellular signal regulated kinase pathway", Biol Cell., 2009, 102(1): 37-49 Jooster et al.: "Anticytokine treatment of established type II collagen-induced arthritis in DBA/1 mice/ A comparative study using anti- TNF alpha, anti-IL 1 alpha/beta and IL-1Ra", Arthritis Rheum., 1996, 39(5): 797-809
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 08.02.2011	
(33) Код держави-учасниці US Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	
(41) Публікація відомостей 10.12.2013, Бюл.№ 23 про заявку:	
(46) Публікація відомостей 10.11.2015, Бюл.№ 21 про видачу патенту:	
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ PCT/US2012/024356, 08.02.2012	

**(54) ЛІКУВАННЯ ОСТЕОАРТРИТУ ІМУНОГЛОБУЛІНОВИМ ЗВ'ЯЗУВАЛЬНИМ БІЛКОМ З ПОДВІЙНИМ
ВАРІАБЕЛЬНИМ ДОМЕНОМ, ЩО ЗВ'ЯЗУЄ IL-1 α І IL-1 β**

(57) Реферат:

Даний винахід стосується лікування остеоартриту з використанням імуноглобулінового зв'язувального білка з подвійним варіабельним доменом (DVD-Ig), що зв'язуються і з IL-1 α , і з IL-1 β .

UA 110049 C2

Перехресне посилання на споріднені заявки

По цій заявці вимагається пріоритет тимчасової заявки США № 61/440853, поданої 8 лютого 2011 року, повний зміст якої включений в даний опис як посилання.

Галузь винаходу

5 Даний винахід стосується лікування остеоартриту і болю і, більш конкретно, застосування білків, що зв'язуються з IL-1 α і/або IL-1 β , для лікування остеоартриту і болю.

Передумови винаходу

10 Суглобовий хрящ або "гіаліновий хрящ" здорових хребетних (включаючи людину і інших ссавців) являє собою напівпрозору опалесцюючу сполучну тканину, відмінну циліндричним характером росту хондроцитів у позаклітинному матриксі (ECM), що переважно складається з протеогліканів, колагену типу II і води. Суглобовий хрящ забезпечує ефективну опору для вагового навантаження для запобігання контакту між протилежними кістками в суглобі і, таким чином, є критичним для нормального функціонування суглоба. Суглобовий хрящ не тільки сприйнятливий до пошкодження при травмі суглоба, але також і до поступового процесу ерозії.

15 Початково, така ерозія може бути просто безсимптомним "поверхневим пошкодженням", при якому область зменшеного гіалінового хряща не проникає повністю в субхондральну кістку. Такі поверхневі пошкодження, як правило, не є хворобливими, і, як правило, їх визначають тільки при артроскопічному обстеженні. Однак, якщо процес ерозії не піддавати лікуванню, основа поверхневого пошкодження може продовжувати стиратися і діаметр пошкодження може збільшуватися таким чином, що в кінцевому результаті пошкодження прогресує до "глибокого пошкодження", проникаючого в розташовану нижче кістку. Такі глибокі пошкодження можуть ставати досить великими, щоб поверхні протилежних кісток в суглобі могли контактувати і починати руйнувати одна одну, приводячи до запалення, болю і інших дегенеративних змін, тобто класичних симптомів остеоартриту (OA). Таким чином, остеоартрит є дегенеративним, прогресуючим захворюванням, що калічить, яке приводить до деформації суглоба, втрати стійкості, порушень і болю. У кінцевому результаті, хірургічне втручання по заміні суглоба може бути єдиним практичним виходом для відновлення, щонайменше частково, деякого рівня рухливості індивідуума.

20

25

30 Суперсімейство IL-1 складається з медіаторів запального процесу з широким діапазоном біологічних і фізіологічних ефектів, включаючи пропасницю, синтез простагландинів (наприклад, в фібробластах, м'язових клітинах і ендотеліальних клітинах), активацію Т-лімфоцитів і продукцію інтерлейкіну-2. Вихідними членами суперсімейства IL-1 є IL-1 α , IL-1 β і антагоніст рецептора IL-1 (IL-1Ra, IL-1RA, IL-1ra, IL-1R α). IL-1 α і IL-1 β є прозапальними цитокінами, що беруть участь в імунному захисті проти інфекцій. IL-1Ra конкурує за зв'язування рецептора з IL-1 α і IL-1 β , блокуючи їх дію в активації імунітету. Інші члени суперсімейства IL-1 включають IL-18 (див. Dinarello (1994) FASEB J. 8(15):1314-1325; Huisin et al. (2004) Dev. Comp. Immunol. 28(5):395-413)) і шість додаткових генів зі структурною гомологією з IL-1 α , IL-1 β або IL-1RA, названих IL1F5, IL1F6, IL1F7, IL1F8, IL1F9 і IL1F10. Відповідно, IL-1 α , IL-1 β і IL-1RA перейменовували в IL-1F1, IL-1F2 і IL-1F3, відповідно (див. Sims et al. (2001) Trends Immunol. 22(10):536-537; Dunn et al. (2001) Trends Immunol. 22(10):533-536). Додаткового описаного передбачуваного члена сімейства IL-1 назвали IL-33 або IL-1F11, хоч ця назва не прийнята офіційно в базі даних номенклатури назв сімейств генів HGNC.

35

40

45 IL-1 α , і IL-1 β продукують макрофаги, моноцити і дендритні клітини. Вони формують важливу частину запальної відповіді організму на інфекцію. Ці цитокіни підвищують експресію факторів адгезії на ендотеліальних клітинах, роблячи можливою трансміграцію лейкоцитів у осередки інфекції і повернення у вихідний стан терморегуляторного центра гіпоталамуса, що приводить до підвищення температури тіла, що виявляється в пропасниці. У зв'язку з цим, IL-1 називають ендогенним пірогеном. Підвищена температура тіла допомагає імунній системі організму боротися з інфекцією. IL-1 також важливий в регуляції гемопоезу. Продукція IL-1 β в периферичних тканинах також пов'язана з гіпералгезією (підвищеною чутливістю до болю), пов'язаною з пропасницею (Morgan et al. (2004) Brain Res. 1022(1-2):96-100). IL-1 регулює підвищену експресію циклооксигенази-2 (COX-2), пов'язану з болем. Переважно, IL-1 α і IL-1 β зв'язуються з одним і тим же клітинним рецептором. Цей рецептор складається з двох споріднених, але не ідентичних субодиниць, що передають внутрішньоклітинні сигнали через шлях, який є, здебільшого, загальним з конкретними іншими рецепторами. Вони включають сімейство Толл-подібних рецепторів і рецептор IL-18. IL-1 α і IL-1 β також мають схожі біологічні властивості, включаючи стимуляцію пропасниці, повільного сну і нейтрофілії, активацію Т- і В-лімфоцитів, проліферацію фібробластів, цитотоксичність для конкретних клітин, стимуляцію колагеназ, синтез печінкових білків гострої фази і підвищену продукцію колонієстимулюючих факторів і колагену.

50

55

60

Виділяли і експресували кДНК, кодує IL-1 α і IL-1 β ; ці кДНК представляють два різних продукти генів, що позначаються як IL-1 α (Lomedico et al. (1984) *Nature*, 312:458) і IL-1 β (Auron et al. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:7909). Вісім генів сімейства інтерлейкіну-1 утворюють кластер генів цитокінів на хромосомі 2. IL-1 β є переважною формою, продукуваною

моноцитами людини, на рівнях мРНК і білка. Дві форми IL-1 людини мають тільки 26% гомології амінокислот. Незважаючи на їх відмінні поліпептидні послідовності, дві форми IL-1 мають структурну схожість (Auron et al. (1985) *J. Mol. Cell Immunol.* 2:169) в тому, що гомологія амінокислот обмежується окремими областями молекули IL-1.

IL-1 α і IL-1 β продукуються у вигляді пептидів-попередників. Іншими словами, вони

продукуються у вигляді довгого білка, який потім процесується для вивільнення більш короткої активної молекули, званої зрілим білком. IL-1 α продукується у вигляді пробілка, протеолітично процесованого кальпаїном, і вивільняється за допомогою ще недостатньо вивченого механізму. Наприклад, зрілий IL-1 β вивільняється з про-IL-1 β після розщеплення конкретним членом сімейства білків каспаз, званим каспаза-1 або інтерлейкін-1-перетворювальний фермент (ICE).

Тривимірна структура зрілих форм кожного члена суперсімейства IL-1 людини складається з 12-14 β -складок, що утворюють бочкоподібний білок.

Початково IL-1 α називали "катаболін" через його ефект в підвищенні резорбції хряща, а також "моноцитарний клітинний фактор" (MCF) через його стимуляторну дію на колагеназу і простагландин в синовіальних клітинах і "лейкоцитарний ендогенний фактор" (LEM), що надає стимуляторний ефект на реакції гострої фази. IL-1 α має широкий спектр біологічної активності, оскільки IL-1 α синтезується багатьма різними клітинами, такими як моноцити, макрофаги, фібробласти, ендотеліальні клітини і лімфоцити, і багато які клітини мають специфічні рецептори для IL-1 α . IL-1 α стимулює проліферацію тимоцитів за допомогою стимуляції вивільнення IL-2, дозрівання і проліферації В-клітин і активності фактора росту фібробластів. Білки IL-1 α визначали як ендогенні пірогени і повідомляли, що вони стимулюють вивільнення простагландинів і колагенази з синовіальних клітин. Таким чином, IL-1 α також займає центральне положення як тригер для різних порушень і симптомів порушень. Ці порушення часто є, головним чином, серйозними порушеннями, для яких майже не існує або не існує лікування. Передбачають, що поліморфізм цих генів асоційований з ревматоїдним артритом і хворобою Альцгеймера. В основному, IL-1 залучений у багато які захворювання людини, включаючи артрит, легеневий фіброз, захворювання центральної нервової системи, цукровий діабет і конкретні серцево-судинні захворювання. Небажані ефекти IL-1 α описують, наприклад, в Oppenheim et al. (1986) *Immunol. Today*, 7:45-56, Durum et al. (1985) *Ann. Rev. Immunol.* 3:263-287, і Symons et al. (1989) *Lymphokine Res.* 8:365-372.

Ініціація, підтримання і прогресування ОА опосередковані складним каскадом механічних і біохімічних шляхів, в яких IL-1 грає ключову роль. IL-1 α і IL-1 β продукують не тільки моноцити, макрофаги і нейтрофіли, але і клітини в тканинах суглоба, наприклад хондроцити, синовіальні фібробласти і остеокласти (див., наприклад, Dinarello et al. (2009) *Ann. Rev. Immunol.* 27: 519-550). In vitro IL-1 може стимулювати продукцію хондроцитами і синовіоцитами протеїназ, які беруть участь в руйнуванні хряща, що приводить до ОА (див., наприклад, Dayer et al. (1977) *Science*, 195:181-183; Dayer et al. (1984) *Biochem. Pharmacol.* 33:2893-2899; McGuire-Goldring et al. (1984) *Arthritis Rheum.* 27:654-662), а також інгібує синтез протеогліканів і колагену типу II, основних компонентів позаклітинного матриксу (ECM) нормального гіалінового хряща (див., наприклад, Goldring et al. (1987) *J. Biol. Chem.* 262:16724-16729; Goldring et al. (1988) *J. Clin. Investig.* 82:2026-2037). За допомогою доклінічних і клінічних досліджень одержували додаткові докази участі IL-1 в патогенезі ОА. Наприклад, внутрішньосуглобова (i.a.) ін'єкція IL-1 в коліна тварини приводила до лейкоцитарної інфільтрації і втрати хряща (Pettiphar et al. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:8749-8753). Навпаки, ін'єкція i.a. антагоніста IL-1 приводила до значного зниження прогресування експериментального ОА (див., наприклад, Pelletier et al. (1997) *Arthritis Rheum.* 40:1012-1019; Caron et al. (1996) *Arthritis Rheum.* 39:1535-1544; Fernandes et al. (1999) *Am. J. Pathol.* 154:11590-11690; Zhang et al. (2006) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 341:202-208). Крім того, виявляли, що нокаутні (KO) по IL-1 миші стійкі до хірургічно індукованого пошкодження хряща в порівнянні з аналогічними мишами дикого типу (Glasson et al. (2009) *Osteoarthritis Cartilage*, 18:572-580).

І IL-1 α , і IL-1 β експресуються в синовіальних мембранах, хрящі і синовіальній рідині пацієнта-людини з ОА (див., наприклад, Farahat et al. (1993) *Ann. Rheum. Dis.* 52:870-875). Антагоніст IL-1 анакінра, що є антагоністом рецептора IL-1, і AMG-108, що є моноклональним антитілом до рецептора IL-1, демонстрували деяку ефективність в дослідженнях ОА відносно симптомів і хондропротекції ("Results from a Randomized Controlled Trial of AMG 108 (a fully human monoclonal antibody to IL-1R type I) in Patients With Osteoarthritis of the Knee" Cohen et al.,

ACR2007). У обох цих запропонованих терапевтичних засобів будуть додаткові дослідження для демонстрації чіткої і надійної клінічної ефективності.

Зберігається потреба в нових і ефективних способах і композиціях для лікування індивідуумів, страждаючих остеоартритом.

5 Суть винаходу

Винахід стосується способів лікування остеоартриту (ОА) і болю. Такі способи включають введення індивідууму (людині або іншому ссавцю) одного або декількох зв'язувальних білків, що зв'язуються з IL-1 α і IL-1 β .

10 У одному з аспектів винаходу спосіб лікування остеоартриту у індивідуума (людини або іншого ссавця) включає стадію введення індивідууму зв'язувального білка, що зв'язується з IL-1 α , в комбінації (наприклад, в суміші, шляхом послідовного введення або одночасного введення) зі зв'язувальним білком, що зв'язується з IL-1 β , або введення індивідууму зв'язувального білка, що зв'язується і з IL-1 α , і з IL-1 β .

15 У варіанті здійснення спосіб лікування остеоартриту у індивідуума включає введення індивідууму зв'язувального білка, що зв'язується з IL-1 α , де зв'язувальний білок є антитілом до IL-1 α , наприклад моноклональним антитілом до IL-1 α . У іншому варіанті здійснення спосіб лікування остеоартриту у індивідуума включає введення індивідууму зв'язувального білка, що зв'язується з IL-1 β , де зв'язувальний білок є антитілом, що зв'язується з IL-1 β , наприклад моноклональним антитілом, що зв'язується з IL-1 β .

20 У іншому аспекті винаходу спосіб лікування остеоартриту у індивідуума (людини або іншого ссавця) включає стадію введення індивідууму зв'язувального білка, що зв'язується і з IL-1 α , і з IL-1 β . Переважно, зв'язувальний білок є імуноглобуліновим зв'язувальним білком з подвійним варіабельним доменом (також позначуваним в рамках винаходу як зв'язувальний білок або молекула "DVD-Ig™", або "DVD-Ig"), який містить щонайменше одну ділянку зв'язування, що зв'язується з IL-1 α , і щонайменше одну ділянку зв'язування, що зв'язується з IL-1 β . Більш переважно, зв'язувальний білок DVD-Ig містить дві ділянки зв'язування, що зв'язуються з IL-1 α , і дві ділянки зв'язування, що зв'язуються з IL-1 β .

У іншому варіанті здійснення спосіб лікування остеоартриту за винаходом у індивідуума включає введення індивідууму фармацевтичної композиції, що містить зв'язувальний білок, що зв'язується з IL-1 α , зв'язувальний білок, що зв'язується з IL-1 β , комбінацію зв'язувального білка, що зв'язується з IL-1 α , і зв'язувального білка, що зв'язується з IL-1 β , або зв'язувальний білок, що зв'язується і з IL-1 α , і з IL-1 β ; і фармацевтично прийнятний носій.

У варіанті здійснення винаходу спосіб лікування остеоартриту включає введення індивідууму кристалізованого зв'язувального білка, що зв'язується з IL-1 α , і кристалізованого зв'язувального білка, що зв'язується з IL-1 β , або кристалізованого зв'язувального білка, що зв'язується і з IL-1 α , і з IL-1 β . Такі застосовні за винаходом кристалізовані зв'язувальні білки включають, як необмежувальні приклади, кристалізоване антитіло до IL-1 α , кристалізоване антитіло до IL-1 β і кристалізований зв'язувальний білок DVD-Ig, що зв'язується і з IL-1 α , і з IL-1 β .

40 Композиції, застосовні в способах за винаходом для лікування остеоартриту у індивідуума, включають композицію для вивільнення кристалізованого зв'язувального білка, що зв'язується з IL-1 α , кристалізованого зв'язувального білка, що зв'язується з IL-1 β , комбінації кристалізованого зв'язувального білка, що зв'язується з IL-1 α , і кристалізованого зв'язувального білка, що зв'язується з IL-1 β , або кристалізованого зв'язувального білка, що зв'язується і з IL-1 α , і з IL-1 β .

45 У варіанті здійснення композиція, застосовна в способі лікування остеоартриту за винаходом, містить:

(а) склад, де вказаний склад містить кристалізований зв'язувальний білок, що зв'язується з IL-1 α , кристалізований зв'язувальний білок, що зв'язується з IL-1 β , комбінацію кристалізованого зв'язувального білка, що зв'язується з IL-1 α , і кристалізованого зв'язувального білка, що зв'язується з IL-1 β , або кристалізований зв'язувальний білок, що зв'язується і з IL-1 α , і з IL-1 β ; і, необов'язково, інгредієнт; і

(б) щонайменше один полімерний носій.

У варіанті здійснення описується вище композиція містить комбінацію кристалізованого зв'язувального білка, що зв'язується з IL-1 α , і кристалізованого зв'язувального білка, що зв'язується з IL-1 β . У іншому варіанті здійснення кристалізований зв'язувальний білок, що зв'язується з IL-1 α , є кристалізованим антитілом, наприклад кристалізованим моноклональним антитілом, що зв'язується з IL-1 α , і кристалізований зв'язувальний білок, що зв'язується з IL-1 β , є кристалізованим антитілом, наприклад моноклональним антитілом, що зв'язується з IL-1 β .

60 У варіанті здійснення описується вище композиція містить кристалізований зв'язувальний білок, що зв'язується і з IL-1 α , і з IL-1 β . У іншому варіанті здійснення кристалізований

зв'язувальний білок є кристалізованим зв'язувальним білком з подвійним варіабельним доменом (DVD-Ig), що зв'язується і з IL-1 α , і з IL-1 β . У іншому варіанті здійснення способу лікування остеоартриту у індивідуума включає введення індивідууму композиції, що містить кристалізований зв'язувальний білок, що зв'язується з IL-1 α , кристалізований зв'язувальний білок, що зв'язується з IL-1 β , комбінацію кристалізованого зв'язувального білка, що зв'язується з IL-1 α , і кристалізованого зв'язувального білка, що зв'язується з IL-1 β , або кристалізований зв'язувальний білок, що зв'язується і з IL-1 α , і з IL-1 β ; де щонайменше один вказаний полімерний носій є полімером, вибраним з одного або декількох з групи, що складається з полі(акрилової кислоти), полі(ціаноакрилатів), полі(амінокислот), полі(ангідридів), полі(депсипептиду), складних поліефірів, полі(молочної кислоти), співполімерів молочної і гліколевої кислот або PLGA, полі(b-гідроксибутирату), полі(капролактону), полі(діоксанону), поліетиленгліколю, полі(гідроксипропіл)метакриламиду, полі[(органо)фосфазену], складних полі(ортоефірів), полі(вінілового спирту), полівінілпіролідону, співполімерів малеїнового ангідриду і алкілвінілового простого ефіру, поліолів-пляроніків, альбуміну, альгінату, целюлози і похідних целюлози, колагену, фібрину, желатину, гіалуронової кислоти, олігосахаридів, глікозаміногліканів, сульфатованих полісахаридів, їх сумішей і співполімерів.

У варіанті здійснення, у випадку наявності необов'язкового інгредієнта в описуваній вище композиції, інгредієнт вибраний з групи, що складається з альбуміну, сахарози, трегалози, лактиту, желатину, гідроксипропіл- β -циклодекстрину, метоксиполіетиленгліколю і поліетиленгліколю.

У варіанті здійснення описуваний вище спосіб лікування остеоартриту додатково включає введення індивідууму другого засобу, де другий засіб надає додаткову бажану властивість способу або композиції, використовуваний в способі. Такий другий засіб може бути однією або декількома молекулами в групі, що складається з будезоніду, епідермального фактора росту, кортикостероїдів, циклоспорину, сульфасалазину, аміносаліцилатів, 6-меркаптопуринів, азатіоприну, метронідазолу, інгібіторів ліпоксигенази, месалазину, олсалазину, балсалазиду, антиоксидантів, інгібіторів тромбоксану, антагоністів рецептора IL-1, моноклональних антитіл до IL-1 β , моноклональних антитіл до IL-6, факторів росту, інгібіторів еластази, піридинілімідазольних сполук, антитіл до ФНП, LT, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-18, IL-23, EMAP-II, ГМ-КСФ, FGF і PDGF, антитіл до CD2, CD3, CD4, CD8, CD19, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD90 або їх лігандів, метотрексату, циклоспорину, FK506, рапаміцину, мікофеноляту мофетилу, лефлуноміду, NSAID, ібупрофену, преднізолону, інгібіторів фосфодієстерази, агоністів аденозинових рецепторів, антитромботичних засобів, інгібіторів компонентів комплексу, адренергічних засобів, IRAK, NIK, IKK, p38, інгібіторів MAP-кіназ, інгібіторів IL-1 β -перетворювального ферменту, інгібіторів ФНП-перетворювального ферменту, інгібіторів передачі сигналу Т-клітин, інгібіторів металопротеїнази, інгібіторів ангіотензинперетворювального ферменту, розчинних рецепторів цитокінів, розчинного рецептора ФНП p55, розчинного рецептора ФНП p75, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R, протизапальних цитокінів, IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 і TGF β .

У іншому аспекті винаходу спосіб лікування остеоартриту, представлений в рамках винаходу, включає введення індивідууму одного або декількох зв'язувальних білків, представлених в рамках винаходу, або композиції, представленої в рамках винаходу, щонайменше одним способом, вибраним з парентерального, підшкірного, внутрішньом'язового, внутрішньовенного, внутрішньосуглобового, внутрішньобронхіального, внутрішньоочеревного, внутрішньокапсульного, внутрішньохрящового, внутрішньопорожнинного, внутрішньомозочкового, інтрацеребровентрикулярного, внутрішньотовстокишкового, інтрацервікального, внутрішньошлункового, внутрішньопечінкового, інтраміокардіального, внутрішньокісткового, внутрішньотазового, внутрішньоперикардіального, інтраперитонеального, внутрішньоплеврального, внутрішньопростатичного, внутрішньолегеневого, ректального, внутрішньониркового, інтраретинального, інтраспінального, інтрасиновіального, інтраторакального, внутрішньоматкового, інтравезикального, болюсного, вагінального, ректального, букального, сублінгвального, інтраназального і трансдермального способів.

У одному з аспектів винаходу спосіб лікування болю у індивідуума (людини або іншого ссавця) включає стадію введення індивідууму зв'язувального білка, що зв'язується з IL-1 α , в комбінації (наприклад, в суміші, шляхом послідовного введення або одночасного введення) зі зв'язувальним білком, що зв'язується з IL-1 β , або введення індивідууму зв'язувального білка, що зв'язується і з IL-1 α , і з IL-1 β .

Способи і композиції за винаходом можна використовувати для лікування болю у індивідуума, що має будь-яку форму болю, включаючи біль при злоякісному новоутворенні,

нейропатичний біль, м'язовий біль, суглобовий біль, біль при переломі кістки, біль при ранах, біль від хірургічного втручання, головний біль, мігрень, а також больові стани, такі як алодинія (алодинічний біль), гіпералгезія і комбінація алодинії і гіпералгезії.

У варіанті здійснення способу лікування болю у індивідуума включає введення індивідууму зв'язувального білка, що зв'язується з IL-1 α , де зв'язувальний білок є антитілом до IL-1 α , наприклад моноклональним антитілом до IL-1 α . У іншому варіанті здійснення способу лікування болю у індивідуума включає введення індивідууму зв'язувального білка, що зв'язується з IL-1 β , де зв'язувальний білок є антитілом, що зв'язується з IL-1 β , наприклад моноклональним антитілом, що зв'язується з IL-1 β .

У іншому аспекті винаходу способу лікування болю у індивідуума включає стадію введення індивідууму зв'язувального білка, що зв'язується і з IL-1 α , і з IL-1 β .

Переважно, зв'язувальний білок є імуноглобуліновим зв'язувальним білком з подвійним варіабельним доменом (також позначуваним в рамках винаходу як зв'язувальний білок або молекула "DVD-Ig™", або "DVD-Ig"), який містить щонайменше одну ділянку зв'язування, що зв'язується з IL-1 α , і щонайменше одну ділянку зв'язування, що зв'язується з IL-1 β . Переважно, зв'язувальний білок DVD-Ig містить дві ділянки зв'язування, що зв'язуються з IL-1 α , і дві ділянки зв'язування, що зв'язуються з IL-1 β .

У іншому варіанті здійснення способу за винаходом для лікування болю у індивідуума включає введення індивідууму фармацевтичної композиції, яка містить зв'язувальний білок, що зв'язується з IL-1 α , зв'язувальний білок, що зв'язується з IL-1 β , комбінацію зв'язувального білка, що зв'язується з IL-1 α , і зв'язувального білка, що зв'язується з IL-1 β , або зв'язувальний білок, що зв'язується і з IL-1 α , і з IL-1 β ; і фармацевтично прийнятний носій.

У варіанті здійснення винаходу способу лікування болю включає введення індивідууму кристалізованого зв'язувального білка, що зв'язується з IL-1 α , і кристалізованого зв'язувального білка, що зв'язується з IL-1 β , або кристалізованого зв'язувального білка, що зв'язується і з IL-1 α , і з IL-1 β . Такі кристалізовані зв'язувальні білки, застосовні у винаході, включають, як необмежувальні приклади, кристалізоване антитіло IL-1 α , кристалізоване антитіло до IL-1 β і кристалізований зв'язувальний білок DVD-Ig, що зв'язується і з IL-1 α , і з IL-1 β .

Композиції, застосовні в способах за винаходом для лікування болю у індивідуума, включають композицію для вивільнення кристалізованого зв'язувального білка, що зв'язується з IL-1 α , кристалізованого зв'язувального білка, що зв'язується з IL-1 β , комбінації кристалізованого зв'язувального білка, що зв'язується з IL-1 α , і кристалізованого зв'язувального білка, що зв'язується з IL-1 β , або кристалізованого зв'язувального білка, що зв'язується і з IL-1 α , і з IL-1 β .

У варіанті здійснення композиція, застосовна в способі лікування болю за винаходом, містить:

(а) склад, де вказаний склад містить кристалізований зв'язувальний білок, що зв'язується з IL-1 α , кристалізований зв'язувальний білок, що зв'язується з IL-1 β , комбінацію кристалізованого зв'язувального білка, що зв'язується з IL-1 α , і кристалізованого зв'язувального білка, що зв'язується з IL-1 β , або кристалізований зв'язувальний білок, що зв'язується і з IL-1 α , і з IL-1 β ; і, необов'язково, інгредієнт; і

(b) щонайменше один полімерний носій.

У варіанті здійснення описується вище композиція містить комбінацію кристалізованого зв'язувального білка, що зв'язується з IL-1 α , і кристалізованого зв'язувального білка, що зв'язується з IL-1 β . У іншому варіанті здійснення кристалізований зв'язувальний білок, що зв'язується з IL-1 α , є кристалізованим антитілом, наприклад кристалізованим моноклональним антитілом, що зв'язується з IL-1 α , і кристалізований зв'язувальний білок, що зв'язується з IL-1 β , є кристалізованим антитілом, наприклад моноклональним антитілом, що зв'язується з IL-1 β .

У варіанті здійснення описується вище композиція містить кристалізований зв'язувальний білок, що зв'язується і з IL-1 α , і з IL-1 β . У іншому варіанті здійснення кристалізований зв'язувальний білок є кристалізованим зв'язувальним білком з подвійним варіабельним доменом (DVD-Ig), що зв'язується і з IL-1 α , і з IL-1 β .

У іншому варіанті здійснення способу лікування болю у індивідуума включає введення індивідууму композиції, яка містить кристалізований зв'язувальний білок, що зв'язується з IL-1 α , кристалізований зв'язувальний білок, що зв'язується з IL-1 β , комбінацію кристалізованого зв'язувального білка, що зв'язується з IL-1 α , і кристалізованого зв'язувального білка, що зв'язується з IL-1 β , або кристалізований зв'язувальний білок, що зв'язується і з IL-1 α , і з IL-1 β ; де вказаний щонайменше один полімерний носій є полімером, вибраним з одного або декількох з групи, що складається з полі(акрилової кислоти), полі(ціаноакрилатів), полі(амінокислот), полі(ангідридів), полі(депептиду), складних поліефірів, полі(молочної кислоти),

співполімерів молочної і гліколевої кислот або PLGA, полі(б-гідроксибутирату), полі(капролактону), полі(діоксанону), поліетиленгліколю, полі(гідроксипропіл)метакриламід, полі[(органо)фосфазену], складних полі(ортоефірів), полі(вінілового спирту), полівінілпіролідону, співполімерів малеїнового ангідриду і алкілвінілового простого ефіру, поліолів-пляроніків, альбуміну, альгінату, целюлози і похідних целюлози, колагену, фібрину, желатину, гіалуронової кислоти, олігосахаридів, глікозаміногліканів, сульфатованих полісахаридів, їх сумішей і співполімерів.

У варіанті здійснення при наявності необов'язкового інгредієнта в описуваній вище композиції інгредієнт вибраний з групи, що складається з альбуміну, сахарози, трегалози, лактиту, желатину, гідроксипропіл- β -циклодекстрину, метоксиполіетиленгліколю і поліетиленгліколю.

У варіанті здійснення описуваний вище спосіб лікування болю додатково включає введення індивідууму другого засобу, де другий засіб надає додаткову бажану властивість способу або композиції, використовуваний в способі. Такий другий засіб може бути однією або декількома молекулами з групи, що складається з будезоніду, епідермального фактора росту, кортикостероїдів, циклоспорину, сульфасалазину, аміносаліцилатів, 6-меркаптопурина, азатіоприну, метронідазолу, інгібіторів ліпоксигенази, месалазину, олсалазину, балсалазиду, антиоксидантів, інгібіторів тромбксану, антагоністів рецептора IL-1, моноклональних антитіл до IL-1 β , моноклональних антитіл до IL-6, факторів росту, інгібіторів еластази, піридинілімідазольних сполук, антитіл до ФНП, LT, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-18, IL-23, EMAP-II, GM-KCФ, FGF і PDGF, антитіл до CD2, CD3, CD4, CD8, CD19, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD90 або їх лігандів, метотрексату, циклоспорину, FK506, рапаміцину, мікофеноляту мофетилу, лефлуноміду, NSAID, ібупрофену, преднізолону, інгібіторів фосфодієстерази, агоністів аденозинових рецепторів, антитромботичних засобів, інгібіторів компонентів комплементу, адренергічних засобів, IRAK, NIK, IKK, p38, інгібіторів MAP-кіназ, інгібіторів IL-1 β -перетворювального ферменту, інгібіторів ФНП-перетворювального ферменту, інгібіторів передачі сигналу Т-клітин, інгібіторів металопротеїнази, інгібіторів ангіотензинперетворювального ферменту, розчинних рецепторів цитокінів, розчинного рецептора ФНП p55, розчинного рецептора ФНП p75, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R, протизапальних цитокінів, IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 і TGF β .

У іншому аспекті винаходу, спосіб лікування болю, представлений в рамках винаходу, включає введення індивідууму одного або декількох зв'язувальних білків, представлених в рамках винаходу, або композиції, представленої в рамках винаходу, щонайменше одним способом, вибраним з парентерального, підшкірного, внутрішньом'язового, внутрішньовенного, внутрішньосуглобового, внутрішньобронхіального, внутрішньочеревного, внутрішньокапсульного, внутрішньохрящового, внутрішньопорожнинного, внутрішньомозочкового, інтрацеребровентрикулярного, внутрішньотривожкового, інтрацеревіального, внутрішньопечінкового, внутрішньоперикардального, внутрішньокісткового, внутрішньотазового, внутрішньоперикардального, інтраперитонеального, внутрішньоплевального, внутрішньопростатичного, внутрішньолегеневого, ректального, внутрішньониркового, інtrarетинального, інтраспінального, інтрасиновіального, інтраторакального, внутрішньоматкового, інтравезикального, болюсного, вагінального, ректального, букального, сублінгвального, інтраназального і трансдермального способів.

У іншому варіанті здійснення винахід стосується способу лікування болю у індивідуума, страждаючого захворюванням або порушенням, пов'язаним з експресією IL-1. Така експресія IL-1 у індивідуума може приводити до підвищення рівнів IL-1 в плазмі і/або периферичній тканині індивідуума.

У варіанті здійснення способи і композиції, представлені в рамках винаходу, використовують для лікування болю у індивідуума, страждаючого захворюванням або порушенням, вибраним з групи, що включає остеоартрит, ревматоїдний артрит, ювенільний хронічний артрит, септичний артрит, артрит Лайма, псоріатичний артрит, реактивний артрит, спондилоартропатію, системний червоний вовчак, хворобу Крона, виразковий коліт, запальне захворювання кишечника, інсулінозалежний цукровий діабет, тиреоїдит, астму, алергічні захворювання, псоріаз, дерматит, склеродермію, реакцію "трансплантат проти хазяїна", відторгнення трансплантата органа, гостре або хронічне імунне захворювання, пов'язане з трансплантацією органа, саркоїдоз, атеросклероз, дисеміноване внутрішньосудинне згортання, синдром Кавасакі, хворобу Грейвса, нефротичний синдром, синдром хронічної втоми, гранулематоз Вегенера, пурпуру Шенлейна-Геноха, мікроскопічний васкуліт нирок, хронічний активний гепатит, увеїт, септичний шок, синдром токсичного шоку, сепсис, кахексію, інфекційні

захворювання, паразитичні захворювання, гострий поперечний мієліт, хворобу Хантінгтона, хворобу Паркінсона, хворобу Альцгеймера, інсульт, первинний біліарний цироз, гемолітичну анемію, злоякісні новоутворення, серцеву недостатність, інфаркт міокарда, хворобу Аддісона, спорадичну полігландулярну недостатність типу I, полігландулярну недостатність типу II (синдром Шмідта), гострий респіраторний дистрес-синдром дорослих, алопецію, гніздову алопецію, серонегативну артропатію, артропатію, хворобу Рейтера, псоріатичну артропатію, артропатію при виразковому коліті, ентеропатичний синовіт, Chlamydia-асоційовану артропатію, Yersinia-асоційовану артропатію, Salmonella-асоційовану артропатію, спондилоартропатію, атероматозне захворювання/артеріосклероз, atopічну алергію, бульозні аутоімунні дерматози, звичайну пухирчатку, ексфолюативну пухирчатку, пемфігоїд, IgA-залежний лінійний дерматоз, аутоімунну гемолітичну анемію, гемолітичну анемію з позитивною реакцією Кумбса, набуту перніціозну анемію, ювенільну перніціозну анемію, міалгічний енцефаліт/синдром хронічної втоми, хронічний кандидоз шкіри і слизових оболонок, гігантоклітинний артеріїт, первинний склерозуючий гепатит, криптогенний аутоімунний гепатит, синдром набутого імунodefіциту, пов'язані з синдромом набутого імунodefіциту захворювання, гепатит В, гепатит С, варіабельний імунodefіцит, що не класифікується (варіабельну гіпогаммаглобулінемію, що не класифікується), дилатаційну кардіоміопатію, жіночу безплідність, недостатність яєчників, передчасну недостатність яєчників, фіброз легень, криптогенний фіброзуючий альвеоліт, постзапальну інтерстиціальну хворобу легень, інтерстиціальний пневмоніт, інтерстиціальну хворобу легень, пов'язану з дифузною хворобою легень, інтерстиціальну хворобу легень, пов'язану зі змішаною хворобою сполучної тканини, інтерстиціальну хворобу легень, пов'язану з системною склеродермією, інтерстиціальну хворобу легень, пов'язану з ревматоїдним артритом, хворобу легень, пов'язану з системним червоним вовчаком, хворобу легень, пов'язану з дерматоміозитом/поліміозитом, хворобу легень, пов'язану з хворобою Шегрена, хворобу легень, пов'язану з анкілозуючим спондилітом, дифузну хворобу легень при васкулітах, хворобу легень, пов'язану з гемосидерозом, лікарську інтерстиціальну хворобу легень, фіброз, променевий фіброз, облітеруючий бронхіоліт, хронічну еозинофілну пневмонію, хворобу легень з лімфоцитарною інфільтрацією, постінфекційну інтерстиціальну хворобу легень, подагричний артрит, аутоімунний гепатит, аутоімунний гепатит типу 1 (класичний аутоімунний або вовчаковий гепатит), аутоімунний гепатит типу 2 (гепатит з антитілами проти LKM), аутоімунну гіпоглікемію, резистентність до інсуліну типу В з акантозом, гіпопаратиреоз, гостре імунне захворювання, пов'язане з трансплантацією органів, хронічне імунне захворювання, пов'язане з трансплантацією органів, остеоартроз, первинний склерозуючий холангіт, псоріаз типу 1, псоріаз типу 2, ідіопатичну лейкопенію, аутоімунну нейтропенію, неуточнену нефропатію, гломерулонефрит, мікроскопічний васкуліт нирок, хворобу Лайма, дискоїдний червоний вовчак, ідіопатичну або неуточнену чоловічу безплідність, аутоімунну реакцію на сперму, розсіяний склероз (всі підтипи), симпатичну офтальмію, легенеvu гіпертензію, вторинну відносно хвороби сполучної тканини, синдром Гудпасчера, легеневий вияв вузликового поліартеріїту, гостру ревматичну пропасницю, ревматоїдний спондиліт, хворобу Стілла, системну склеродермію, синдром Шегрена, синдром Такаясу/артеріїт, аутоімунну тромбоцитопенію, ідіопатичну тромбоцитопенію, аутоімунний тиреоїдит, гіпертиреоз, аутоімунний тиреоїдит (хворобу Хашимото), атрофічний аутоімунний гіпотиреоз, первинну мікседему, факогенний увеїт, первинний васкуліт, вітиліго, гостру печінкову недостатність, хронічні захворювання печінки, алкогольний цироз, алкогольне ураження печінки, холестаза, ідіосинкразичний гепатит, лікарський гепатит, неалкогольний стеатогепатит, алергію, інфекцію стрептококами групи В (GBS), психічні розлади (наприклад, депресію і шизофренію), Th2- і Th1-опосередковані захворювання, гострий і хронічний біль (різні форми болю), злоякісні новоутворення, такі як рак легень, молочної залози, шлунка, сечового міхура, товстого кишечника, підшлункової залози, яєчника, передміхурової залози і прямої кишки і гематопоетичні злоякісні новоутворення (лейкоз і лімфому), абеталіпопротеїнемію, акроціаноз, гострі і хронічні паразитичні або інфекційні процеси, гострий лейкоз, гострий лімфобластний лейкоз (ALL), гострий мієлолейкоз (AML), гостру або хронічну бактеріальну інфекцію, гострий панкреатит, гостру ниркову недостатність, аденокарциноми, передсердні ектопічні ритми, комплекс СНІД-деменція, алкогольний гепатит, алергічний кон'юнктивіт, алергічний контактний дерматит, алергічний риніт, відторгнення алотрансплантата, недостатність альфа-1-антитрипсину, бічний аміотрофічний склероз, анемію, стенокардію, дегенерацію клітин передніх роїв, терапію до CD3, антифосфоліпідний синдром, антирецепторні реакції гіперчутливості, аневризми аорти і периферичні аневризми, розшарування аорти, артеріальну гіпертензію, артеріосклероз, артеріовенозний анастомоз, атаксію, фібриляцію передсердь (тривалу або пароксизмальну), тріпотіння передсердь, атріовентрикулярну блокаду, В-клітинну лімфому, відторгнення кісткового трансплантата,

відторгнення трансплантата кісткового мозку (BMT), блокаду ніжки пучка Гіса, лімфому Беркітта, опіки, серцеві аритмії, синдром зупинки серця, пухлини серця, кардіоміопатію, запальну відповідь на серцево-легеневе шунтування, відторгнення трансплантата хряща, дегенерацію кори мозочка, мозочкові порушення, хаотичну або мультифокальну передсердну тахікардію, пов'язані з хіміотерапією порушення, хронічний мієлоцитарний лейкоз (CML), хронічний алкоголізм, хронічні запальні захворювання, хронічний лімфоцитарний лейкоз (CLL), хронічну обструктивну хворобу легень (COPD), хронічну інтоксикацію саліцилатами, колоректальну карциному, застійну серцеву недостатність, кон'юнктивіт, контактний дерматит, легеневе серце, ішемічну хворобу легень, хворобу Крейтцфельда-Якоба, культурально-негативний сепсис, кістозний фіброз, порушення, пов'язані з терапією цитокінами, деменцію боксерів, демієлінізуючі захворювання, геморагічну пропасницю денге, дерматит, дерматологічні порушення, діабет, діабетичний артеріосклероз, деменцію з тільцями Леві, дилатаційну застійну кардіоміопатію, порушення базальних гангліїв, синдром Дауна в зрілому віці, рухові порушення, які викликаються лікарськими засобами, що блокують допамінові рецептори в ЦНС, чутливість до лікарських засобів, екзему, енцефаломієліт, ендокардит, ендокринопатію, епіглотит, інфекцію вірусом Епштейна-Барре, еритро мелалгію, екстрапірамідні і мозочкові порушення, сімейний гемофагоцитарний лімфогістіоцитоз, відторгнення імпланта фетального тимуса, атаксію Фрідрейха, функціональні порушення периферичних артерій, грибовий сепсис, газову гангрену, виразку шлунка, гломерулонефрит, відторгнення трансплантата будь-якого органа або тканини, грамнегативний сепсис, грампозитивний сепсис, гранульоми внаслідок внутрішньоклітинних паразитів, волосатоклітинний лейкоз, хворобу Галлервордена-Шпатца, тиреоїдит Хашимото, поліноз, відторгнення трансплантата серця, гемохроматоз, гемодіаліз, гемолітичний уремичний синдром/тромболітичну тромбоцитопенічну пурпуру, геморагію, гепатит А, аритмії, пов'язані з порушеннями в пучку Гіса, інфекцію ВІЛ/нейропатію при ВІЛ, хворобу Ходжкіна, гіперкінетичні рухові порушення, реакції гіперчутливості, екзогенний алергічний альвеоліт, гіпертонічну хворобу, гіпокінетичні рухові порушення, оцінку функції гіпоталамо-гіпофізарно-наднирковозалозної осі, ідіопатичну хворобу Аддісона, ідіопатичний легеневий фіброз, антитіло-опосередковану цитотоксичність, астенію, спінально-м'язову атрофію дітей, запалення аорти, грип А, вплив іонізуючого випромінювання, іридоцикліт/uveїт/оптичний неврит, пошкодження при ішемії/реперфузії, ішемічний інсульт, ювенільний ревматоїдний артрит, ювенільну спінально-м'язову атрофію, саркому Капоші, відторгнення трансплантата нирки, легіонельоз, лейшманіоз, проказу, ураження кортикоспінальної системи, ліпедему, відторгнення трансплантата печінки, лімфедему, малярію, злоякісну лімфому, злоякісний гістіоцитоз, злоякісну меланому, менінгіт, менінгококемію, метаболічну мігрень, ідіопатичну мігрень, мультисистемне мітохондріальне порушення, змішану хворобу сполучної тканини, моноклональну гаммопатію, множинну мієлому, мультисистемні дегенерації (синдром Менцеля, Дежерина-Томас, Шая-Дрейджера і Мачадо-Джозефа), міастенію, інфекцію комплексом *Mycobacterium avium* і *Mycobacterium intracellulare*, інфекцію *Mycobacterium tuberculosis*, мієлодиспластичний синдром, інфаркт міокарда, ішемічні порушення міокарда, назофарингеальну карциному, хронічні захворювання легень новонароджених, нефрит, нефроз, нейродегенеративні захворювання, неврогенні м'язові атрофії, нейтропенічну пропасницю, неходжкінську лімфому, оклюзію черевної аорти і її гілок, оклюзуючі захворювання артерій, терапію ОКТ3®, орхіт/епідидиміт, орхіт/реверсивну вазектомію, органомегалію, остеопороз, відторгнення трансплантата підшлункової залози, карциному підшлункової залози, паранеопластичний синдром/гіперкальціємію при злоякісних новоутвореннях, відторгнення трансплантата паразитовидної залози, запальне захворювання тазових органів, цілорічний риніт, захворювання перикардія, атеросклеротичне ураження периферичних судин, порушення периферичних судин, перитоніт, перніціозну анемію, пневмоцистну пневмонію, пневмонію, синдром POEMS (полінейропатію, органомегалію, ендокринопатію, моноклональну гаммопатію і ураження шкіри), постперфузійний синдром, посткардіотомний синдром, прееклампсію, прогресуючий над'ядерний параліч, первинну легеневу гіпертензію, променеву терапію, феномен Рейно, хворобу Рейно, синдром Рефсума, тахікардію з широкими комплексами QRS, вазоренальну гіпертензію, реперфузійне пошкодження, рестриктивну кардіоміопатію, саркоми, сенільну хорею, сенільну деменцію з тільцями Леві, серонегативні артрити, шок, серпоподібноклітинну анемію, відторгнення алотрансплантата шкіри, ураження шкіри, відторгнення трансплантата тонкого кишечника, солідні пухлини, специфічні аритмії, спінальну атаксію, спіноцеребелярну дегенерацію сітківки, стрептококовий міозит, структурні пошкодження мозочка, підгострий склерозуючий паненцефаліт, непритомність, сифіліс серцево-судинної системи, системну анафілаксію, синдром системної запальної відповіді, системну форму ювенільного ревматоїдного артриту, Т-клітинний або FAB ALL, телеангієктазію, облітеруючий тромбангіїт, тромбоцитопенію,

токсичність, трансплантати, кровотечу при травмі, реакції гіперчутливості типу III, гіперчутливість типу IV, нестабільну стенокардію, уремію, уросепсис, кропивницю, набуті вади серця, варикозне розширення вен, васкуліт, захворювання вен, тромбоз вен, фібриляцію шлуночків, вірусні і грибкові інфекції, вірусний енцефаліт/асептичний менінгіт, асоційований з вірусом гемофагоцитарний синдром, синдром Верніке-Корсакова, хворобу Вільсона-Коновалова, відторгнення ксенотрансплантата будь-якого органа або тканини, гострий коронарний синдром, гостру ішемію, хворобу Стілла дорослих, гніздову алопецію, анафілаксію, антифосфоліпідний синдром, апластичну анемію, артеріосклероз, atopічну екзему, atopічний дерматит, аутоімунний дерматит, аутоімунне порушення, пов'язане зі стрептококовою інфекцією, аутоімунну ентеропатію, аутоімунну втрату слуху, аутоімунний лімфопроліферативний синдром (ALPS), аутоімунний міокардит, аутоімунну передчасну недостатність яєчників, блефарит, бронхоектатичну хворобу, бульозний пемфігоїд, серцево-судинне захворювання, катастрофічний антифосфоліпідний синдром, глютену хворобу, шийний спондиліоз, хронічну ішемію, пемфігоїд, що рубцюється, клінічно ізольований синдром (CIS) з ризиком розсіяного склерозу, психічні порушення з початком в дитячому віці, хронічну обструктивну хворобу легень (COPD), дакриоцитит, дерматоміозит, діабетичну ретинопатію, грижу міжхребетного диска, пролапс міжхребетного диска, лікарську гемолітичну анемію, ендокардит, ендометріоз, ендодальміт, епісклерит, мультиформну еритему, синдром Стівенса-Джонсона, гестаційний пемфігоїд, синдром Гієна-Барре (GBS), синдром Хьюза, ідіопатичну хворобу Паркінсона, ідіопатичну інтерстиціальну пневмонію, IgE-опосередковану алергію, імунну гемолітичну анемію, міозит з тільцями включення, інфекційне запальне захворювання очей, запальне демієлінізуюче захворювання, запальне захворювання серця, запальне захворювання нирок, IPF/UIP, ірит, кератит, сухий кератокон'юнктивіт, хворобу Куссмауля або хворобу Куссмауля-Мейєра, параліч Ландрі, лангергансоклітинний гістіоцитоз, сітчасте ліведо, дегенерацію жовтої плями, мікроскопічний поліангіїт, анкілозуючий спондилоартрит, порушення моторних нейронів, пемфігоїд слизових оболонок, поліорганну недостатність, міастенію, мієлодиспластичний синдром, міокардит, порушення корінців нервів, нейропатію, не-А не-В гепатит, оптичний неврит, остеоліз, рак яєчників, поліартикулярний ювенільний ревматоїдний артрит, оклюзійну хворобу периферичних артерій (PAOD), хворобу периферичних судин (PVD), хворобу периферичних артерій (PAD), флебіт, вузликовий поліартеріїт (вузликовий періартеріїт), поліхондрит, ревматичну поліміалгію, поліоз, поліартикулярний ювенільний ревматоїдний артрит, синдром поліендокринної недостатності, поліміозит, ревматичну поліміалгію (PMR), постперфузійний синдром, первинний паркінсонізм, рак передміхурової залози і прямої кишки і гематопоетичні злоякісні новоутворення (лейкоз і лімфому), простатит, істинну еритроцитарну аплазію, первинну недостатність кори надниркових залоз, рецидивуючий оптикомієліт, рестеноз, ревматичну хворобу серця, SAPHO (синовіт, акне, пустульоз, гіперостоз і остит), вторинний амілоїдоз, шоківу легень, склерит, ішіас, вторинну недостатність кори надниркових залоз, пов'язані з діоксидом кремнію захворювання сполучної тканини, дерматоз Снеддона-Уїлкінсона, анкілозуючий спондилоартрит, синдром Стівенса-Джонсона (SJS), синдром системної запальної відповіді, скроневий артеріїт, токсоплазмозний ретиніт, синдром Лайєлла, поперечний мієліт, TRAPS (періодичний синдром, асоційований з рецептором 1 типу фактора некрозу пухлини (TNFR)), алергічну реакцію типу 1, діабет типу 2, кропивницю, звичайну інтерстиціальну пневмонію (UIP), васкуліт, весняний кон'юнктивіт, вірусний ретиніт, синдром Фогта-Коянагі-Харади (синдром VKH), вологу дегенерацію жовтої плями і загоєння ран.

У варіанті здійснення способи і композиції, представлені в рамках винаходу, використовують для лікування болю у індивідуума, страждаючого захворюванням. Спосіб лікування болю у індивідуума за п. 16, де індивідуум страждає захворюванням, вибраним з групи, що складається з первинного злоякісного захворювання, метастазуючого злоякісного захворювання, раку молочної залози, раку товстого кишечника, раку прямої кишки, раку легень, раку ротоглотки, раку гортаноглотки, раку стравоходу, раку шлунка, раку підшлункової залози, раку печінки, раку жовчного міхура, раку жовчних проток, раку тонкого кишечника, раку товстого кишечника, раку сечовивідних шляхів, раку нирки, раку сечового міхура, уротеліального раку, злоякісних новоутворень жіночих статевих органів, раку шийки матки, раку матки, раку яєчників, хоріокарциноми, гестаційної трофобластичної хвороби, злоякісних новоутворень чоловічих статевих органів, раку передміхурової залози, злоякісних новоутворень сім'яних пухирців, раку яєчка, пухлин статевих клітин, злоякісних новоутворень ендокринних залоз, раку щитовидної залози, раку надниркових залоз, злоякісних новоутворень гіпофіза, раку шкіри, гемангіоми, меланоми, саркоми, злоякісних новоутворень кісткової тканини, злоякісних новоутворень м'яких тканин, саркоми Капоші, пухлини головного мозку, злоякісних новоутворень нервової тканини,

злюкисних новоутворень ока, злюкисних новоутворень оболонок головного мозку, астроцитомі, гліомі, гліобластоми, ретинобластоми, невроми, нейробластоми, шваномі, менінгіомі, солідної пухлини, що виникає з гематопоетичного злюкисного новоутворення, лейкозу, лімфоми Ходжкіна і неходжкінської лімфоми.

5 Короткий опис креслень

Фігура 1А являє собою схематичне зображення конструкцій імуноглобуліну з подвійним варіабельним доменом (DVD-Ig), а також на ній показана стратегія одержання молекули DVD-Ig з двох батьківських антитіл.

10 На фігурі 1В представлені схематичні зображення генетичних конструкцій для DVD1-Ig, DVD2-Ig і двох химерних, моноспецифічних моноклональних антитіл 2D13.E3 (до IL-1 α) і 13F5.G5 (до IL-1 β). Позначеннями "VH β " і "VL β " вказують, відповідно, варіабельний домен важкого ланцюга і варіабельний домен легкого ланцюга антигензв'язувальної ділянки антитіла 13F5.G5, що зв'язує IL-1 β . Позначеннями "VH α " і "VL α " вказують, відповідно, варіабельний домен важкого ланцюга і варіабельний домен легкого ланцюга антитіла 3D12.E3, що зв'язує IL-1 α . "L" вказують лідерну послідовність. На діаграмі генетичної конструкції для DVD2-Ig горизонтальними відмітками між "VH β " і "VH α " і між "VL β " і "VL α " вказують наявність лінкерної послідовності.

20 На фігурі 2 показані гістограми гістологічної оцінки в балах суглобового хряща миші в остеоартритичній моделі нестабільності суглоба (JIM). Кожний набір гістограм представляє оцінку в балах суглобового хряща в колінах мишей в чотирьох досліджуваних групах: лікування тільки розріджувачем фосфатно-сольовим буфером (PBS) ("PBS"), лікування моноклональним антитілом до IL-1 α ("mAb до IL-1 α "), лікування моноклональним антитілом до IL-1 β ("mAb до IL-1 β ") і лікування комбінацією моноклональних антитіл до IL-1 α і до IL-1 β ("mAb до IL-1 α + mAb до IL-1 β "). Окремі гістограми в кожному наборі представляють загальні гістологічні бали і бали для 25 трьох окремих зон, де кожна зона являє собою одну третину області медіального меніска колінного суглоба (зона 1: внутрішня зона, зона 2: середня зона, і зона 3: зовнішня зона). Зліва направо: гістограма загальних балів для зон медіального меніска 1, 2 і 3; гістограма балів для зони медіального меніска 1; гістограма балів для зони медіального меніска 2; і гістограма балів для зони медіального меніска 3. Див. приклад 3.3.1.

30 На фігурі 3 показані гістограми гістологічної оцінки в балах суглобового хряща мишей в остеоартритичній моделі нестабільності суглоба (JIM). Кожний набір гістограм представляє оцінку в балах суглобового хряща колін мишей в чотирьох досліджуваних групах: лікування тільки розріджувачем PBS ("Розріджувач"), лікування комбінацією моноклонального антитіла до IL-1 α і моноклонального антитіла до IL-1 β ("mAb до IL-1 α (6 мг/кг) + mAb до IL-1 β (6 мг/кг)"), лікування зв'язувальним білком DVD-Ig до mIL-1 α/β в концентрації 6 мг/кг ("DVD-Ig до IL-1 α/β (6 мг/кг)"), і лікування зв'язувальним білком DVD-Ig до mIL-1 α/β в концентрації 12 мг/кг ("DVD-Ig до IL-1 α/β (12 мг/кг)"). Окремі гістограми в кожному наборі представляють загальні гістологічні бали і бали для трьох окремих зон, де кожна зона являє собою одну третину області 35 медіального меніска колінного суглоба (зона 1: внутрішня зона, зона 2: середня зона, і зона 3: зовнішня зона). Зліва направо: гістограма загальних балів для зон медіального меніска 1, 2 і 3; гістограма балів для зони медіального меніска 1; гістограма балів для зони медіального меніска 2; і гістограма балів для зони медіального меніска 3. Див. приклад 3.3.2.

45 На фігурі 4 показані гістограми гістологічної оцінки в балах суглобового хряща мишей в остеоартритичній моделі нестабільності суглоба (JIM). Кожний набір гістограм представляє оцінку в балах суглобового хряща колін мишей в чотирьох досліджуваних групах: лікування тільки розріджувачем PBS ("Розріджувач"), лікування комбінацією моноклонального антитіла до IL-1 α (6 мг/кг) і моноклонального антитіла до IL-1 β (6 мг/кг) ("mAb до IL-1 α (6 мг/кг) + mAb до IL-1 β (6 мг/кг)"), лікування моноклональним антитілом до IL-1 β (12 мг/кг) ("mAb до IL-1 β (12 мг/кг)"), лікування моноклональним антитілом до IL-1 β (6 мг/кг) ("mAb до IL-1 β (6 мг/кг)"), і лікування 50 моноклональним антитілом до IL-1 β (3 мг/кг) ("mAb до IL-1 β (3 мг/кг)"). Окремі гістограми в кожному наборі представляють загальні гістологічні бали і бали для трьох окремих зон, де кожна зона являє собою одну третину області медіального меніска колінного суглоба (зона 1: внутрішня зона, зона 2: середня зона, і зона 3: зовнішня зона). Зліва направо: гістограма загальних балів для зон медіального меніска 1, 2 і 3; гістограма балів для зони медіального меніска 1; гістограма балів для зони медіального меніска 2; і гістограма балів для зони 55 медіального меніска 3. Див. приклад 3.3.3.

На фігурі 5 показаний рівень індукованої зимозаном продукції IL-6 (пг/мл) у тварин в остеоартритичній моделі нестабільності суглоба при лікуванні тільки розріджувачем PBS ("Розріджувач"), комбінацією моноклонального антитіла до IL-1 α (6 мг/кг) і моноклонального антитіла до IL-1 β (6 мг/кг) ("mAb до IL-1 α (6 мг/кг) + mAb до IL-1 β (6 мг/кг)"), зв'язувальним 60

білком DVD-Ig до mIL-1 α / β в концентрації 6 мг/кг ("DVD-Ig до IL-1 α / β (6 мг/кг)") і лікуванні зв'язувальним білком DVD-Ig до mIL-1 α / β в концентрації 12 мг/кг ("DVD-Ig до IL-1 α / β (12 мг/кг)"). Див. приклад 3.3.4.

На фігурі 6 показана загальна оцінка в балах дегенерації хряща у тварин в 5
остеоартритичній моделі дестабілізації медіального меніска (DMM), підданих лікуванню розріджувачем PBS ("Розріджувач"), комбінацією моноклонального антитіла до IL-1 α (6 мг/кг) і моноклонального антитіла до IL-1 β (6 мг/кг) ("mAb до IL-1 α (6 мг/кг) + mAb до IL-1 β (6 мг/кг)"), і зв'язувальним білком DVD-Ig до mIL-1 α / β в концентрації 6 мг/кг ("DVD-Ig до IL-1 α / β (6 мг/кг)"). Див. приклад 3.3.5.

На фігурі 7 показані результати 8-тижневого дослідження дії різних способів лікування на 10
дегенерацію хряща у тварин в остеоартритичній моделі дестабілізації медіального меніска (DMM). На кожній гістограмі вказана середня сума балів для дегенерації хряща у тварин, підданих лікуванню тільки розріджувачем PBS ("Розріджувач"), моноклональним антитілом до IL-1 α (6 мг/кг) ("mAb до IL-1 α (6 мг/кг)"), моноклональним антитілом до IL-1 β (6 мг/кг) ("mAb до IL-1 β (6 мг/кг)"), комбінацією моноклонального антитіла до IL-1 α (6 мг/кг) і моноклонального антитіла до IL-1 β (6 мг/кг) ("mAb до IL-1 α (6 мг/кг) + mAb до IL-1 β (6 мг/кг)"), зв'язувальним білком DVD-Ig до mIL-1 α / β в концентрації 1,5 мг/кг ("DVD-Ig до IL-1 α / β (1,5 мг/кг)"), зв'язувальним білком DVD-Ig до mIL-1 α / β в концентрації 3 мг/кг ("DVD-Ig до IL-1 α / β (3 мг/кг)"), або зв'язувальним білком DVD-Ig до mIL-1 α / β в концентрації 6 мг/кг ("DVD-Ig до IL-1 α / β (6 мг/кг)"). Див. приклад 3.3.6.

На фігурі 8 показані результати 4-тижневого дослідження лікування тварин в 25
остеоартритичній моделі дестабілізації медіального меніска (DMM) тільки розріджувачем ("Розріджувач"), доксицикліном (30 мг/кг) ("Доксициклін (30 мг/кг)"), або комбінацією моноклонального антитіла до IL-1 α (6 мг/кг) і моноклонального антитіла до IL-1 β (6 мг/кг) ("mAb до IL-1 α (6 мг/кг) + mAb до IL-1 β (6 мг/кг)"). Див. приклад 3.3.7.

На фігурі 9 показані гістограми порога відсмикування кінцівки (грами, "г") в кінцівках мишей з 30
хірургічним втручанням DMM в дні 7, 14, 21, 28 і 35. Поріг відсмикування кінцівок після DMM ("DMM") значущо підвищувався в порівнянні з контралатеральними кінцівками (не підданими хірургічному втручання) ("Контралатеральна кінцівка") і кінцівками, підданими "хибній" операції ("Хибна операція"). Кінцівки після DMM виявляли алодинію вже в день 7 і виявляли цю больову поведінку до дня 35. Див. приклад 4.

На фігурі 10 показані гістограми порога відсмикування кінцівки (грами, "г") у мишей після 35
DMM після лікування тільки розріджувачем ("PBS-контроль"), IgG-ізотипічним контролем (позитивний контроль на розвинене захворювання і біль "IgG-контроль") або комбінацією моноклональних антитіл до IL-1 α і до IL-1 β ("mAb до IL-1 α (6 мг/кг) + mAb до IL-1 β (6 мг/кг)") через 5 тижнів (день 35) в порівнянні з контралатеральними кінцівками (не підданими хірургічному втручання) ("Контралатеральна кінцівка") і кінцівками, підданими "хибній" операції ("Хибна операція"). Дані свідчать про те, що нейтралізація і IL-1 α , і IL-1 β значущо запобігає розвитку алодинії. Аналогічну ефективність спостерігали у тварин після лікування через один 40
тиждень (не представлено). Див. приклад 4.

На фігурі 11 показані гістограми порога відсмикування кінцівки (грами, "г") у мишей після 45
DMM, раніше підданих лікуванню IgG-ізотипічним контролем (позитивний контроль на розвинене захворювання і біль) протягом 35 днів, яким потім вводили дозу комбінації моноклональних антитіл до IL-1 α або до IL-1 β і тестували на поріг відсмикування кінцівки на 24 години пізніше в день 36 ("mAb до IL-1 α (6 мг/кг) + mAb до IL-1 β (6 мг/кг) (через 24 години після введення дози)"). Для порівняння, значення порога відсмикування кінцівки в день 35 представляли для контралатеральної (не підданої хірургічному втручання) кінцівки ("Контралатеральна кінцівка"), кінцівки після "хибної" операції ("Хибна операція"), лікування тільки розріджувачем ("PBS-контроль"), лікування IgG-ізотипічним контролем ("IgG-контроль") і 50
кінцівки після хірургічного втручання, підданої лікуванню комбінацією моноклональних антитіл до IL-1 α і до IL-1 β ("mAb до IL-1 α (6 мг/кг) + mAb до IL-1 β (6 мг/кг)") через 5 тижнів (день 35). Дані свідчать про те, що нейтралізація і IL-1 α , і IL-1 β значущо реверсувала алодинію у мишей з розвиненим болем. Див. приклад 4.

На фігурі 12 показані гістограми порога відсмикування кінцівки (грами, "г") у мишей після 55
DMM, підданих лікуванню тільки розріджувачем PBS ("Розріджувач"), моноклональним антитілом до IL-1 α (6 мг/кг) ("mAb до IL-1 α (6 мг/кг)"), моноклональним антитілом до IL-1 β (6 мг/кг) ("mAb до IL-1 β (6 мг/кг)"), або комбінацією моноклонального антитіла до IL-1 α (6 мг/кг) і моноклонального антитіла до IL-1 β (6 мг/кг) ("mAb до IL-1 α (6 мг/кг) + mAb до IL-1 β (6 мг/кг)"), що вводяться інтраперитонеально (i.p.) двічі на тиждень протягом чотирьох тижнів. Тварин 60
тестували на алодинію в день 28. На гістограмі для "контралатеральної кінцівки"

представлений поріг відсмикування кінцівки типової не підданої хірургічному втручанню (контралатеральної) кінцівки. Іспилатеральна (піддана хірургічному втручанню) кінцівка тварин в групах, підданих лікуванню розріджувачем, виявляла алодинію (була хворобливою) в порівнянні з контралатеральною (не підданою хірургічному втручанню) кінцівкою або в порівнянні з тваринами, підданими "хибній" операції ("Хибна операція"). Див. приклад 5.

На фігурі 13 показані гістограми порога відсмикування кінцівки (грами, "г") у мишей після DMM, підданих лікуванню тільки розріджувачем PBS ("Розріджувач") або комбінацією моноклонального антитіла до IL-1 α і моноклонального антитіла до IL-1 β , що вводяться інтраперитонеально (i.p.) кожні чотири дні протягом чотирьох тижнів в концентрації 1 мг/кг ("mAb до IL-1 α (1 мг/кг) + mAb до IL-1 β (1 мг/кг)"), в концентрації 3 мг/кг ("mAb до IL-1 α (3 мг/кг) + mAb до IL-1 β (3 мг/кг)"), або в концентрації 6 мг/кг ("mAb до IL-1 α (6 мг/кг) + mAb до IL-1 β (6 мг/кг)"). Тварин тестували в день 28. Іспилатеральна (піддана хірургічному втручанню) кінцівка тварин в групах, підданих лікуванню тільки розріджувачем PBS, виявляла алодинію (була хворобливою) в порівнянні з контралатеральною (не підданою хірургічному втручанню) кінцівкою ("Контралатеральною кінцівкою") або в порівнянні з тваринами, підданими "хибній" операції ("Хибна операція"). Результати показали, що лікування комбінацією моноклонального антитіла до IL-1 α і моноклонального антитіла до IL-1 β запобігає розвитку алодинії у мишей після DMM дозозалежним чином. Див. приклад 6.

На фігурі 14 показані гістограми порога відсмикування кінцівки (грами, "г"), коли мишей після DMM з розвиненим остеоартритом і механічною алодинією в день 27 піддавали лікуванню комбінацією моноклонального антитіла до IL-1 α і моноклонального антитіла до IL-1 β , що вводяться інтраперитонеально (i.p.) в концентрації 1 мг/кг ("mAb до IL-1 α (1 мг/кг) + mAb до IL-1 β (1 мг/кг)"), в концентрації 3 мг/кг ("mAb до IL-1 α (3 мг/кг) + mAb до IL-1 β (3 мг/кг)"), або в концентрації 6 мг/кг ("mAb до IL-1 α (6 мг/кг) + mAb до IL-1 β (6 мг/кг)"), за 24 години до тестування на алодинію в день 28. Іспилатеральна (піддана хірургічному втручанню) кінцівка тварин в групах, підданих лікуванню розріджувачем ("Розріджувач"), виявляла алодинію (була хворобливою) в порівнянні з контралатеральною (не підданою хірургічному втручанню) кінцівкою ("Контралатеральною кінцівкою") або в порівнянні з тваринами, підданими "хибній" операції ("Хибна операція"). Результати показали, що лікування комбінацією моноклонального антитіла до IL-1 α і моноклонального антитіла до IL-1 β реверсує розвинену алодинію у мишей після DMM з розвиненим захворюванням дозозалежним чином. Див. приклад 7.

На фігурі 15 показані гістограми затримки відсмикування кінцівки (секунди, "сек.") у тварин в моделі індукованого карагеном запального болю (гіпералгезії) у миші. Через 30 годин після внутрішньопідошовної ін'єкції карагенану мишей піддавали лікуванню тільки моноклональним антитілом до IL-1 α (900 мкг) ("mAb до IL-1 α "), тільки моноклональним антитілом до IL-1 β (900 мкг) ("mAb до IL-1 β "), комбінацією моноклонального антитіла до IL-1 α (900 мкг) і моноклонального антитіла до IL-1 β (900 мкг) ("mAb до IL-1 α + mAb до IL-1 β "), розріджувачем PBS ("PBS") або IgG-ізотипічним контролем ("IgG"). Іншій групі вводили дозу (30 мг/кг) диклофенаку (контрольного нестероїдного протизапального анальгетика) через 47 і 95 годин після внутрішньопідошовного введення карагенану. Тестування термічної гіпералгезії з використанням стимуляції променистим теплом здійснювали через 48 годин (фігура 15A) і 96 годин (фігура 15B) після внутрішньопідошовного введення карагенану. Зафарбованими стовпцями показана затримка відсмикування кінцівки для контрольної кінцівки (без карагенану). Незафарбованими стовпцями показана затримка відсмикування кінцівки для кінцівки, в яку вводили карагенан. Див. приклад 8.

На фігурі 16 показані гістограми затримки відсмикування кінцівки (секунди, "сек.") у тварин в моделі індукованого карагеном запального болю (гіпералгезії) у миші. Через 30 годин після внутрішньопідошовної ін'єкції карагенану мишей піддавали лікуванню розріджувачем ("PBS"), IgG-ізотипічним контролем ("IgG") або однією з трьох доз комбінації моноклонального антитіла до IL-1 α і моноклонального антитіла до IL-1 β , де кожне моноклональне антитіло вводили в дозі 100 мкг ("mAb до IL-1 α (100 мкг) + mAb до IL-1 β (100 мкг)"), в дозі 300 мкг ("mAb до IL-1 α (300 мкг) + mAb до IL-1 β (300 мкг)"), або в дозі 900 мкг ("mAb до IL-1 α (900 мкг) + mAb до IL-1 β (900 мкг)"). Іншій групі вводили дозу (30 мг/кг) диклофенаку (нестероїдного протизапального анальгетика для позитивного контролю) через 47 і 95 годин після внутрішньопідошовного введення карагенану. Тестування термічної гіпералгезії з використанням стимуляції променистим теплом здійснювали через 48 годин (фігура 16A) і 96 годин (фігура 16B) після внутрішньопідошовного введення карагенану. Зафарбованими стовпцями показана затримка відсмикування кінцівки для контрольної кінцівки (без карагенану). Незафарбованими стовпцями показана затримка відсмикування кінцівки для кінцівки, в яку вводили карагенан. Див. приклад 9.

На фігурі 17 показані результати тестування комбінованого лікування моноклональними антитілами до IL-1 α і до IL-1 β в моделі запального болю, індукованого CFA ("повний ад'ювант Фрейнда"), у мишей. Через 30 годин після внутрішньопідошовної ін'єкції CFA мишей піддавали лікуванню комбінацією моноклонального антитіла до IL-1 α (900 мкг) і моноклонального антитіла до IL-1 β (900 мкг), розріджувачем PBS ("PBS") або IgG-ізотипічним контролем ("IgG"). Іншій групі вводили дозу (30 мг/кг) диклофенаку (нестероїдного протизапального анальгетика для позитивного контролю) через 47 годин після внутрішньопідошовного введення CFA. Тестування механічної алодинії у тварин з використанням мононитки фон Фрея здійснювали через 48 годин після введення CFA. На фігурі 17A показані гістограми порога відсмикування кінцівки (грами, "г"). Зафарбованими стовпцями показаний поріг відсмикування кінцівки для контралатеральних (без CFA) контрольних кінцівок. Незафарбованими стовпцями показаний поріг відсмикування кінцівки для кінцівки, в яку вводили CFA, у тварин в досліджуваних групах. На фігурі 17B показані гістограми величини ефективності (% MPE) для тварин в досліджуваних групах. Див. приклад 10.

На фігурі 18 показані гістограми порога відсмикування кінцівки (грами, "г") у тварин з нейропатичним болем в моделі лігатури спінального нерва L5/L6 (SNL) миші. У день 6 після хірургічного втручання SNL тварин піддавали лікуванню комбінацією моноклонального антитіла до IL-1 α (900 мкг) і моноклонального антитіла до IL-1 β (900 мкг) ("mAb до IL-1 α + mAb до IL-1 β "), розріджувачем PBS ("PBS") або IgG-ізотипічним контролем ("IgG"). Тестування механічної алодинії у тварин з використанням мононитки фон Фрея здійснювали через 24 години (фігура 18A) і 72 години (фігура 18B) після хірургічного втручання SNL. Як позитивний контроль іншу групу піддавали лікуванню габапентином (100 мг/кг, "габапентин") за 1 годину до тестування. Див. приклад 11.

На фігурі 19 показані гістограми величини ефективності (% MPE) для тварин в досліджуваних групах через 24 і 72 години, як описано для фігури 18. Позначенням "Розріджувач" вказані тварини після SNL, піддані лікуванню розріджувачем PBS. Позначенням "IgG" вказані тварини після SNL, піддані лікуванню IgG-ізотипічним контролем. Позначенням "IL-1 α / β " вказані тварини, піддані лікуванню комбінацією моноклонального антитіла до IL-1 α (900 мкг) і моноклонального антитіла до IL-1 β . Див. приклад 11.

Докладний опис винаходу

Винахід оснований на виявленні того, що блокування функції інтерлейкіну-1 (IL-1) може бути ефективним засобом для лікування остеоартриту (ОА) у індивідуума (людини або іншого ссавця).

За винаходом блокування функції IL-1 для лікування ОА можна досягати введенням індивідууму одного або декількох білків, що зв'язуються з IL-1 α і IL-1 β . Такої терапії "з подвійною специфічністю" можна досягати введенням пацієнту з ОА зв'язувального білка (наприклад, антитіла), що зв'язує IL-1 α , і зв'язувального білка (наприклад, антитіла), що зв'язує IL-1 β , або введенням полівалентного і поліспецифічного зв'язувального білка, що зв'язується і з IL-1 α , і з IL-1 β . Такий полівалентний і поліспецифічний зв'язувальний білок, застосовний у винаході, включає імуноглобуліновий зв'язувальний білок з подвійним варіабельним доменом (також позначуваний в рамках винаходу як зв'язувальний білок або молекула "DVD-IgTM", або "DVD-Ig"). Див., наприклад, публікацію PCT № WO 2007/024715 і Wu et al. (2007) Nature Biotech. 25(11):1290-1297. Конкретну комбінацію зв'язувальних білків до IL-1 α і IL-1 β або конкретну молекулу DVD-Ig, що зв'язує і IL-1 α , і IL-1 β , застосовну для лікування ОА, можна оцінювати з використанням ОА-моделі на тваринах, такої як ОА-модель нестабільності суглоба (JIM) або ОА-модель дестабілізації медіального меніска (DMM) (Glasson et al. (2007) Osteoarthritis. Cart. 15(9):1061-9).

Якщо в рамках винаходу не указано інакше, наукові і технічні терміни, використовувані в контексті даного винаходу, повинні мати значення, що загальноприйнято розуміються фахівцями в цій галузі. Значення і обсяг термінів повинні бути чіткими, однак, у випадку будь-якої прихованої двозначності, визначення, представлені в рамках винаходу, переважають над будь-яким словником або зовнішнім джерелом. Крім того, якщо інше не потрібно за контекстом, терміни в однині повинні включати множину і терміни у множині повинні включати однину. У даній заявці використання терміна "або" означає "і/або", якщо не указано інакше. Крім того, використання терміна "включаючи", а також інших форм, таких як "включає" і "включений", не є обмежувальним. Також, терміни, такі як "елемент" або "компонент", включають елементи і компоненти, що включають одну одиницю, і елементи і компоненти, що включають декілька субодиниць, якщо конкретно не указано інакше.

Як правило, номенклатури і способи, використовувані в зв'язку з культивуванням клітин і тканин, молекулярною біологією, імунологією, мікробіологією, генетикою, хімією білків і

нуклеїнових кислот і гібридизацією нуклеїнових кислот, представлені в рамках винаходу, добре відомі і загальноновживані в цій галузі. Способи за даним винаходом, як правило, здійснюють відповідно до загальноприйнятих способів, які добре відомі в цій галузі і описуються в різних загальних і більш спеціальних джерелах, цитованих і обговорюваних протягом всього даного опису, якщо не указано інакше. Способи ферментативних реакцій і очищення здійснювали за інструкціями виробника, загальноприйнятими в цій галузі або представленими в рамках винаходу. Номенклатури і лабораторні способи, використовувані в зв'язку з аналітичною хімією, синтетичною органічною хімією і медичною і фармацевтичною хімією, представлені в рамках винаходу, добре відомі і загальноновживані в цій галузі. Для хімічного синтезу, хімічних аналізів, одержання фармацевтичних препаратів, складів, їх доставки і лікування пацієнтів використовують стандартні способи.

Для кращого розуміння даного винаходу вибрані терміни визначені нижче.

Термін "поліпептид" означає будь-який полімерний ланцюг амінокислот. Терміни "пептид" і "білок" взаємозамінно використовують з терміном поліпептид і вони також стосуються полімерного ланцюга амінокислот. Термін "поліпептид" включає нативні або штучні білки, фрагменти білків і поліпептидні аналоги білкової послідовності. Поліпептид може бути мономерним або полімерним.

Термін "виділений білок" або "виділений поліпептид" означає білок або поліпептид, який завдяки своєму походженню або джерелу одержання не зв'язаний з супутніми йому в природі компонентами, що супроводжують його в його нативному стані, по суті не містить інші білки того ж виду, експресується клітинами різних видів або не існує в природі. Таким чином, поліпептид, синтезований хімічно або синтезований в клітинній системі, відмінний від клітини, в якій він в природі існує, будуть "виділяти" з супутніх йому в природі компонентів. Білок також можна одержувати, по суті, таким, що не містить супутні йому в природі компоненти, за допомогою виділення з використанням способів очищення білка, добре відомих в цій галузі.

Термін "виділення" означає спосіб одержання хімічних сполук, таких як поліпептид, що по суті не містять супутні ним в природі компоненти, за допомогою виділення, наприклад, з використанням способів очищення білка, добре відомих в цій галузі.

Термін "IL-1 α людини" (також скорочено позначуваний в рамках винаходу як "hIL-1 α " або "IL-1 α ") включає плейотропний цитокін, що бере участь в різних імунних відповідях, запальних процесах і гемопоезі. Наприклад, IL-1 α включає цитокін людини, продукований активованими макрофагами; він стимулює проліферацію тимоцитів, індукуючи вивільнення IL-2, дозрівання і проліферацію В-клітин, і активність фактора росту фібробластів. Термін "IL-1 α людини" призначений для включення рекомбінантного IL-1 α людини ("rhIL-1 α "), який можна одержувати стандартними способами рекомбінантної експресії.

Термін "IL-1 β людини" (також скорочено позначуваний в рамках винаходу як "hIL-1 β " або "IL-1 β ") включає плейотропний цитокін, що бере участь в різних імунних відповідях, запальних процесах і гемопоезі. Термін "IL-1 β " людини включає рекомбінантний IL-1 β людини ("rhIL-1 β "), який можна одержувати стандартними способами рекомбінантної експресії.

Амінокислотні послідовності IL-1 α і IL-1 β людини представлені в таблиці 1.

Таблиця 1

Послідовності IL-1 α і IL-1 β людини

Білок	Ідентифікатор послідовності	Послідовність
		123456789012345678901234567890
Про-IL-1 α людини	SEQ ID NO:1	MAKVPMDFEDLKNCYSENEEDSSSIDHLSL NQKSFYHVSYGPLHEGCMQSVLSISSETS KTSKLTFKESMVVATNGKVLKRRRLSLSQ SITDDDLLEAIANDSEEEIIPRSAPFSFLS NVKYNFMRIIKYEFILNDALNQSIIRANDQ YLTAALHNLDEAVKFDMGAYKSSKDDAKI TVILRISKTLQYVTAQDEDQPVLLKEMPEI PKTITGSETNLLFFWETHGKKNYFTSVAHP NLFIATKQDYWVCLAGGPPSITDFQILENQ A

Білок	Ідентифікатор послідовності	Послідовність
Зрілий IL-1 α людини	Залишки 113-271 SEQ ID NO:1	SAPFSFLSNVKNFMRIIKYEFILNDALNQ SIIRANDQYLTAALHNLDEAVKFDMGAYK SSKDDAKITVILRISKTLQYVTAQDEDQPV LLKEMPEIPKTITGSETNLLFFWETHGTKN YFTSVAHPNLFIATKQDYWVCLAGGPPSIT DFQILENQA
Зрілий IL-1 β людини	SEQ ID NO:2	APVRSNLNCTLRDSQQKSLVMSGPYELKALH LQQQDMEQQVVFMSFVQGEESNDKIPVAL GLKEKNLYLSCVLKDDKPTLQLESVDPKNY PKKKMEKRFFVFNKIEINNKFESQAQFPNW YISTSQAENMPVFLGGTKGGQDITDFTMQF VSS

Термін "біологічна активність" стосується всіх характерних біологічних властивостей цитокіну. Біологічні властивості IL-1 α і IL-1 β включають, як необмежувальні приклади, зв'язування з рецептором IL-1.

5 "Біологічна активність" стосується всіх характерних біологічних властивостей IL-1 α . Біологічні властивості IL-1 α включають, як необмежувальні приклади, властивості зв'язування з рецептором IL-1 α , стимуляцію проліферації тимоцитів за допомогою індукування вивільнення IL-2, дозрівання і проліферацію В-клітин і активність фактора росту фібробластів.

10 Терміни "специфічне зв'язування" або "що специфічно зв'язує" відносно взаємодії антитіла, білка або пептиду з другою хімічною сполукою означає, що взаємодія залежить від наявності конкретної структури (наприклад, антигенної детермінанти або епітопа) в хімічній сполуці, наприклад, антитіло розпізнає конкретну білкову структуру і зв'язується з нею більшою мірою, ніж з білками взагалі. Якщо антитіло є специфічним для епітопа "А", наявність молекули, що містить епітоп А (або вільний, немічений А), в реакції, що містить мічений "А" і антитіло, буде
15 знижувати кількість міченого А, зв'язаного з антитілом.

Термін "антитіло" в широкому розумінні стосується будь-якої молекули імуноглобуліну (Ig), що складається з чотирьох поліпептидних ланцюгів, двох важких (H) ланцюгів і двох легких (L) ланцюгів, або будь-якого його функціонального фрагмента, мутанта, варіанта або похідного, що зберігає основні властивості зв'язування епітопа молекули Ig. Такі формати мутанта, варіанта
20 або похідного антитіла відомі в цій галузі і їх необмежувальні варіанти здійснення описані нижче.

У повнорозмірному антитілі кожний важкий ланцюг складається з варіабельної області важкого ланцюга (скорочено позначуваної в рамках винаходу як HCVR або VH) і константної області важкого ланцюга. Константна область важкого ланцюга складається з трьох доменів, CH1, CH2 і CH3. Кожний легкий ланцюг складається з варіабельної області легкого ланцюга (скорочено позначуваної в рамках винаходу як LCVR або VL) і константної області легкого ланцюга. Константна область легкого ланцюга складається з одного домену CL. Області VH і VL можна додатково розділяти на гіперваріабельні області, позначувані як області, що визначають комплементарність (CDR), які перемижуються більш консервативними областями, позначуваними як каркасні області (FR). Кожна VH і VL складається з трьох CDR і чотирьох FR, розташованих від амінокінця до карбоксикінця в наступному порядку: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Молекули імуноглобулінів можуть являти собою будь-який тип (наприклад, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA і IgY), клас (наприклад, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 і IgA2) або підклас.

35 Термін "антигензв'язувальна частина" антитіла стосується одного або декількох фрагментів антитіла, що зберігають здатність специфічно зв'язуватися з антигеном (наприклад, hIL-1 α). Антигензв'язувальну функцію антитіла можуть здійснювати фрагменти повнорозмірного антитіла. Такі варіанти антитіла також можуть мати біспецифічні формати, формати з подвійною специфічністю або поліспецифічні формати, що специфічно зв'язуються з двома або більше
40 різними антигенами. Приклади зв'язувальних фрагментів, включених в термін "антигензв'язувальна частина" антитіла, включають (i) Fab-фрагмент, який являє собою одновалентний фрагмент, що складається з доменів VL, VH, CL і CH1; (ii) F(ab')₂-фрагмент, який являє собою двовалентний фрагмент, що містить два Fab-фрагменти, сполучені дисульфідним містком в шарнірній області; (iii) Fd-фрагмент, який складається з доменів VH і CH1; (iv) Fv-фрагмент, який складається з доменів VL і VH одного плеча антитіла; (v) dAb-фрагмент (Ward et al. (1989) Nature, 341:544-546, публікація PCT № WO 90/05144), що містить окремий
45

варіабельний домен; і (vi) виділену область, що визначає комплементарність (CDR). Крім того, хоч два домени Fv-фрагмента, VL і VH, кодуються окремими генами, їх можна з'єднувати з використанням рекомбінантних способів за допомогою синтетичного лінкера, що дозволяє одержувати їх у вигляді єдиного білкового ланцюга, в якому області VL і VH попарно з'єднують для одержання одновалентних молекул (відомих 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 (scFv) також призначені для включення в термін "антигензв'язувальна частина" антитіла. Також включають інші форми одноланцюжкових антитіл, такі як діатіла. Діатіла є двовалентними біспецифічними антитілами, в яких домени VH і VL експресуються на єдиному поліпептидному ланцюзі, але з використанням лінкера, занадто короткого для утворення пари між двома доменами на одному ланцюзі, що, таким чином, примушує домени утворювати пари з комплементарними доменами іншого ланцюга і дозволяє одержувати дві антигензв'язувальні ділянки (див., наприклад, Holliger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448; Poljak et al. (1994) Structure, 2:1121-1123). В цій галузі відомі такі зв'язувальні частини антитіл (Kontermann and Dubel eds., Antibody Engineering (Springer-Verlag, New York, 2001) (ISBN 3-540-41354-5)).

Термін "конструкція антитіла" стосується поліпептиду, що містить одну або декілька антигензв'язувальних частин за винаходом, сполучених з лінкерним поліпептидом або константним доменом імуноглобуліну. Лінкерні поліпептиди містять два або більше амінокислотних залишків, сполучених пептидними зв'язками, і їх використовують для з'єднання однієї або декількох антигензв'язувальних частин. Такі лінкерні поліпептиди добре відомі в цій 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 належить до константного домену важкого або легкого ланцюга. Амінокислотні послідовності константних доменів важкого ланцюга IgG (гамма) і легкого ланцюга (каппа і лямбда) людини відомі в цій галузі і представлені в таблиці 2.

Таблиця 2

Послідовності константних доменів важкого і легкого ланцюгів IgG людини

Блок	Ідентифікатор послідовності	Послідовність
		123456789012345678901234567890
Константна область IgG1	SEQ ID NO:3	ASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
		ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Мутантна константна область IgG1	SEQ ID NO:4	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Константна область каппа-ланцюга Ig	SEQ ID NO:5	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC

Білок	Ідентифікатор послідовності	Послідовність
Константна область лямбда-ланцюга Ig	SEQ ID NO:6	QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSQCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

Крім того, антитіло або його антигензв'язувальна частина може бути частиною більшої імуномолекули адгезії, утвореної за допомогою ковалентного або нековалентного з'єднання антитіла або антигензв'язувальної частини з одним або декількома іншими білками або пептидами. Приклади таких імуномолекул адгезії включають використання корової області стрептавідину для одержання тетрамерної молекули scFv (Kipriyanov S. et al. (1995) Human Antibod. Hybridomas, 6:93-101) і використання залишку цистеїну, маркерного пептиду і C-кінцевої поліістидинової мітки для одержання бівалентних і біотинільованих молекул scFv (Kipriyanov S. et al. (1994) Mol. Immunol. 31:1047-1058). Антигензв'язувальні частини антитіл, такі як Fab- і F(ab')₂-фрагменти, можна одержувати з цілих антитіл з використанням загальноприйнятих способів, таких як розщеплення цілих антитіл папаїном або пепсином, відповідно. Крім того, антитіла, їх антигензв'язувальні частини і імуномолекули адгезії можна одержувати з використанням стандартних способів рекомбінантної ДНК, представлених в рамках винаходу.

Термін "виділене антитіло" стосується антитіла, яке по суті, не містить інші антитіла, що мають різну антигенну специфічність (наприклад, виділене антитіло, що специфічно зв'язується з hIL-1 α , по суті, не містить антитіла, що специфічно зв'язуються з антигенами, іншими, ніж hIL-1 α). Однак виділене антитіло, що специфічно зв'язується з hIL-1 α , може мати перехресну реактивність з іншими антигенами, такими як молекули IL-1 α іншого виду. Крім того, виділене антитіло, по суті, може не містити інший клітинний матеріал і/або хімічні речовини.

Термін "антитіло людини" включає антитіла, які мають варіабельні і константні області, одержані з послідовностей імуноглобулінів зародкової лінії людини. Антитіла людини за винаходом можуть включати амінокислотні залишки, не кодовані послідовностями імуноглобулінів зародкової лінії людини (наприклад, мутації, що вносяться випадковим або сайт-специфічним мутагенезом *in vitro*, або соматичну мутацію *in vivo*), наприклад в CDR, зокрема CDR3. Однак термін "антитіло людини" не включає антитіла, в яких послідовності CDR, одержані із зародкової лінії іншого виду ссавців, таких як миша, пересаджують на каркасні послідовності людини.

Термін "рекомбінантне антитіло людини" включає всі антитіла людини, які одержуються, експресуються, створюються або виділяються рекомбінантними способами, наприклад антитіла, експресовані з використанням рекомбінантного експресуючого вектора, трансфікованого в клітину-хазяїна (детально описано в розділі II, С, нижче), антитіла, що виділяються з рекомбінантної комбінаторної бібліотеки антитіл людини (Hoogenboom H. (1997) Trends Biotechnol. 15:62-70; Azzazy і Highsmith (2002) Clin. Biochem. 35:425-445; Gavalondo and Larrick (2000) BioTechniques, 29:128-145; Hoogenboom and Chames (2000) Immunol. Today, 21:371-378), антитіла, що виділяються з тварини (наприклад, миші), трансгенної по генах імуноглобуліну людини (див., наприклад, Taylor et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295; Kellermann and Green (2002) Curr. Opin. Biotechnol. 13:593-597; Little et al. (2000) Immunol. Today, 21:364-370), або антитіла, які одержуються, експресуються, створюються або виділяються будь-якими іншими способами, які включають сплайсинг послідовностей генів імуноглобулінів людини з іншими послідовностями ДНК. Такі рекомбінантні антитіла людини містять варіабельні і константні області, одержувані з послідовностей імуноглобулінів зародкової лінії людини. Однак в деяких варіантах здійснення такі рекомбінантні антитіла людини піддають мутагенезу *in vitro* (або соматичному мутагенезу *in vivo*, якщо використовують тварину, трансгенну по послідовностям Ig людини) і, таким чином, амінокислотні послідовності областей VH і VL рекомбінантних антитіл є послідовностями, які, одночасно будучи такими, що виділяються з послідовностей VH і VL зародкової лінії людини і споріднені з ними, можуть не існувати в природі в репертуарі антитіл зародкової лінії людини *in vivo*.

Термін "химерне антитіло" стосується антитіл, які містять послідовності варіабельної області важкого і легкого ланцюгів одного виду і послідовності константної області іншого виду, таких як антитіла, що містять варіабельні області важкого і легкого ланцюгів миші, сполучені з константними областями людини.

Термін "антитіло з пересадженими CDR" стосується антитіл, які містять послідовності варіабельної області важкого і легкого ланцюгів одного виду, але в яких послідовності однієї або декількох областей CDR областей VH і/або VL замінюють послідовностями CDR іншого виду, такими як антитіла, що містять варіабельні області важкого і легкого ланцюгів людини, в яких одну або декілька CDR людини (наприклад, CDR3) замінюють послідовностями CDR миші, наприклад, одержуваними з моноклонального антитіла миші до IL-1 α людини.

У рамках винаходу термін "CDR" стосується області, що визначає комплементарність, в послідовності варіабельної області антитіла. У кожній з варіабельних областей важкого ланцюга і легкого ланцюга знаходяться три CDR, позначувані CDR1, CDR2 і CDR3, для кожної з варіабельних областей. У рамках винаходу термін "набір CDR" стосується групи з трьох CDR, що знаходяться в одній варіабельній області (тобто VH або VL) антигензв'язувальної ділянки. Точні границі цих CDR по-різному визначають згідно з різними системами. Система, описувана Kabat (Kabat et al. (1987, 1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland), не тільки представляє чітку систему нумерації залишків, застосовну до будь-якої варіабельної області антитіла, але також дозволяє визначати точні границі залишків, які визначають три CDR. Ці CDR можна позначати як CDR по Kabat. Chothia і співавт. (Chothia і Lesk (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917, і Chothia et al. (1989) *Nature*, 342:877-883) виявили, що конкретні субфрагменти в CDR по Kabat приймають майже ідентичні конформації пептидного кістяка, незважаючи на наявність значної різноманітності на рівні амінокислотної послідовності. Ці субфрагменти позначали як L1, L2 і L3 або H1, H2 і H3, де "L" і "H" означають області легкого ланцюга і важкого ланцюга, відповідно. Ці області можна позначати як CDR по Chothia, що мають границі, що перекриваються з CDR по Kabat. Інші границі, які визначають CDR, що перекриваються з CDR по Kabat, описують Padlan et al. (1995) *FASEB J.* 9:133-139; і MacCallum (1996) *J. Mol. Biol.* 262(5):732-745. Інші визначення границь CDR можуть не відповідати суворо одній з вказаних вище систем, але, проте, будуть перекриватися з CDR по Kabat, хоч їх можна укорочувати або подовжувати з урахуванням прогнозування або експериментальних результатів про те, що конкретні залишки або групи залишків або навіть цілі CDR не впливають значно на зв'язування антигену. У способах, представлених в рамках винаходу, можуть використовувати CDR, що визначаються по будь-якій з цих систем, хоч в конкретних варіантах здійснення використовують CDR, що визначаються по Kabat або Chothia.

Терміни "нумерація по Kabat", "визначення по Kabat" і "мічення по Kabat" в рамках винаходу використовують взаємозамінно. Ці терміни стосуються системи нумерації амінокислотних залишків, більш варіабельних (тобто гіперваріабельних), ніж інші амінокислотні залишки у варіабельних областях важкого і легкого ланцюгів антитіла або його антигензв'язувальної частині (Kabat et al. (1971) *Ann. NY Acad. Sci.* 190:382-391; і Kabat E. et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242). У випадку варіабельної області важкого ланцюга гіперваріабельна область розташовується в положеннях амінокислот з 31 по 35 для CDR1, положеннях амінокислот з 50 по 65 для CDR2 і положеннях амінокислот з 95 по 102 для CDR3. У випадку варіабельної області легкого ланцюга гіперваріабельна область розташовується в положеннях амінокислот з 24 по 34 для CDR1, положеннях амінокислот з 50 по 56 для CDR2 і положеннях амінокислот з 89 по 97 для CDR3.

Зростання великих загальнодоступних баз даних про амінокислотні послідовності варіабельних областей важкого і легкого ланцюгів і їх аналіз за останні двадцять років привели до розуміння типових границь між послідовностями каркасних областей (FR) і CDR в послідовностях варіабельних областей і дозволили фахівцям в цій галузі точно визначати CDR згідно з нумерацією по Kabat, нумерацією по Chothia або іншими системами. Див., наприклад, Martin, "Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains", In Kontermann and Dubel, eds., *Antibody Engineering* (Springer-Verlag, Berlin, 2001), chapter 31, pages 432-433. Застосовний спосіб визначення амінокислотних послідовностей CDR по Kabat в амінокислотних послідовностях варіабельних областей важкого ланцюга (VH) і варіабельних областей легкого ланцюга (VL) представлений нижче.

Для визначення амінокислотної послідовності CDR-L1

Починається приблизно через 24 амінокислотних залишки з амінокінця 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 і 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 визначення амінокислотної послідовності CDR-L2

Завжди починається через 16 залишків від кінця CDR-L1;
 залишки перед послідовністю CDR-L2, як правило, являють собою Ile-Tyr (I-Y), але також і Val-Tyr (V-Y), Ile-Lys (I-K) і Ile-Phe (I-F);
 довжина завжди являє собою 7 амінокислотних залишків.

5 Для визначення амінокислотної послідовності CDR-L3
 Завжди починається через 33 амінокислоти від кінця CDR-L2;
 залишок перед амінокислотою 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:7), де X є будь-якою амінокислотою;

10 довжина, як правило, складає від 7 до 11 амінокислотних залишків.
 Для визначення амінокислотної послідовності CDR-H1
 Починається приблизно через 31 амінокислотний залишок від амінокінця області VH 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:151), де X є будь-якою амінокислотою;

15 залишок після послідовності CDR-H1 завжди являє собою Trp (W), як правило Trp-Val (W-V), але також і Trp-Ile (W-I) і Trp-Ala (W-A);
 довжина, як правило, складає від 5 до 7 амінокислотних залишків.
 Для визначення амінокислотної послідовності CDR-H2

20 Завжди починається через 15 амінокислотних залишків від 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), але також і 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);

25 довжина, як правило, складає від 16 до 19 амінокислотних залишків.
 Для визначення амінокислотної послідовності CDR-H3
 Завжди починається через 33 амінокислотних залишки від кінця CDR-H2 і завжди через 3 амінокислотних залишки після цистеїну (C);
 залишки перед послідовністю CDR-H3 завжди являють собою Cys-X-X (C-X-X), де X є будь-якою амінокислотою, як правило Cys-Ala-Arg (C-A-R);

30 залишки після послідовності CDR-H3 завжди являють собою Trp-Gly-X-Gly (W-G-X-G) (SEQ ID NO:9), де X є будь-якою амінокислотою;
 довжина, як правило, складає від 3 до 25 амінокислотних залишків.

У рамках винаходу терміни "акцептор" і "акцепторне антитіло" стосуються антитіла або послідовності нуклеїнової кислоти, що визначає або кодує щонайменше 80%, щонайменше 85%, щонайменше 90%, щонайменше 95%, щонайменше 98% або 100% амінокислотних послідовностей однієї або декількох каркасних областей. У деяких варіантах здійснення термін "акцептор" стосується амінокислотної послідовності або послідовності нуклеїнової кислоти антитіла, що визначає або кодує константні області. У ще одному варіанті здійснення термін "акцептор" стосується амінокислотної послідовності або послідовності нуклеїнової кислоти антитіла, що визначає або кодує одну або декілька каркасних областей і константних областей. У конкретному варіанті здійснення термін "акцептор" стосується амінокислотної послідовності або послідовності нуклеїнової кислоти антитіла людини, що визначає або кодує щонайменше 80%, щонайменше 85%, щонайменше 90%, щонайменше 95%, щонайменше 98% або 100% амінокислотних послідовностей однієї або декількох каркасних областей. За цим варіантом здійснення акцептор може містити щонайменше 1, щонайменше 2, щонайменше 3, щонайменше 4, щонайменше 5 або щонайменше 10 амінокислотних залишків, що не знаходяться в одному або декількох конкретних положеннях антитіла людини. Каркасні області акцептора і/або константні області акцептора, наприклад, можна одержувати з гена антитіла зародкової лінії, гена зрілого антитіла, функціонального антитіла (наприклад, антитіл, добре відомих в цій галузі, антитіл, що знаходяться в розробці, або комерційно доступних антитіл).

У рамках винаходу термін "канонічний" залишок стосується залишку в CDR або каркасі, що визначає конкретну канонічну структуру CDR, як визначають по Chothia et al. (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; і Chothia et al. (1992) J. Mol. Biol. 227:799-817. Згідно з Chothia et al., критичні частини CDR багатьох антитіл мають майже ідентичні конформації пептидного кістяка, незважаючи на значне різноманіття на рівні амінокислотної послідовності. Кожна канонічна структура, головним чином, визначає набір торсійних кутів пептидного кістяка для суміжного сегмента амінокислотних залишків, що формують петлю.

У рамках винаходу терміни "донор" і "донорне антитіло" стосуються антитіла, з якого одержують одну або декілька CDR. У одному з варіантів здійснення донорне антитіло є

60

антитілом виду, відмінного від антитіла, з якого одержують каркасні області. Відносно гуманізованого антитіла термін "донорне антитіло" стосується антитіла, що не належить людині, з якого одержують одну або декілька CDR.

У рамках винаходу термін "каркас" або "каркасна послідовність" стосується послідовностей, що залишилися, варіабельної області без CDR. Оскільки точне визначення послідовності CDR можна здійснювати за допомогою різних систем, значення каркасної послідовності є предметом, відповідно, різних інтерпретацій. Шість CDR (CDR-L1, -L2 і -L3 легкого ланцюга і CDR-H1, -H2 і -H3 важкого ланцюга) також розділяють каркасні області легкого ланцюга і важкого ланцюга на чотири підобласті (FR1, FR2, FR3 і FR4) на кожному ланцюзі, де CDR1 розташована між FR1 і FR2, CDR2 між FR2 і FR3 і CDR3 між FR3 і FR4. Без визначення конкретних підобластей як FR1, FR2, FR3 або FR4, каркасна область, як указано іншими, представляє комбіновані FR у варіабельній області єдиного ланцюга природного імунoglobulinу. У рамках винаходу FR в однині представляє одну з чотирьох підобластей, і FR у множині представляє дві або більше з чотирьох підобластей, що складають каркасну область.

У цій галузі відомі акцепторні послідовності важкого ланцюга і легкого ланцюга людини. У одному з варіантів здійснення винаходу акцепторні послідовності важкого ланцюга і легкого ланцюга людини вибрані з послідовностей, описуваних в таблиці 3 і таблиці 4.

Таблиця 3

Акцепторні послідовності важкого ланцюга

SEQ ID NO:	Область білка	Послідовність
		123456789012345678901234567890
10	VH2-70/JH6 FR1	EVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLS
11	VH2-70/JH6 FR2	WIRQPPGKALEWLA
12	VH2-70/JH6 FR3	RLTISKDTSKNQVLTMTNMDPVDATYYCAR
13	VH2-70/JH6 FR4	WGQGTTVTVSS
14	VH2-26/JH6 FR1	EVTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSLS
15	VH2-26/JH6 FR2	WIRQPPGKALEWLA
16	VH2-26/JH6 FR3	RLTISKDTSKSQVLTMTNMDPVDATYYCAR
17	VH2-26/JH6 FR4	WGQGTTVTVSS
18	VH3-72/JH6 FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
19	VH3-72/JH6 FR2	WVRQAPGKGLEWVG
20	VH3-72/JH6 FR3	RFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCAR
21	VH3-72/JH6 FR4	WGQGTTVTVSS
22	VH3-21/JH6 FR1	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS
23	VH3-21/JH6 FR2	WVRQAPGKGLEWVS
24	VH3-21/JH6 FR3	RFTISRDNKNSLYLQMNSLRSEDATVYYCAR
25	VH3-21/JH6 FR4	WGQGTTVTVSS
26	VH1-69/JH6 FR1	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFS
27	VH1-69/JH6 FR2	WVRQAPGQGLEWMG
28	VH1-69/JH6 FR3	RVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDATVYYCAR
29	VH1-69/JH6 FR4	WGQGTTVTVSS
30	VH1-18/JH6 FR1	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT
31	VH1-18/JH6 FR2	WVRQAPGQGLEWMG
32	VH1-18/JH6 FR3	RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDATVYYCAR
33	VH1-18/JH6 FR4	WGQGTTVTVSS
34	VH7-4.1/JH6 FR1	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFT
35	VH7-4.1/JH6 FR2	WVRQAPGQGLEWMG
36	VH7-4.1/JH6 FR3	RFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDATVYYCAR
37	VH7-4.1/JH6 FR4	WGQGTTVTVSS

Таблиця 4

Акцепторні послідовності легкого ланцюга

SEQ ID NO:	Область білка	Послідовність
		123456789012345678901234567890
38	B3/JK4 FR1	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC
39	B3/JK4 FR2	WYQQKPGQPPKLLIY
40	B3/JK4 FR3	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC
41	B3/JK4 FR4	FGGGTKVEIKR
42	L2/JK4 FR1	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC
43	L2/JK4 FR2	WYQQKPGQAPRLIY
44	L2/JK4 FR3	GIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYC
45	L2/JK4 FR4	FGGGTKVEIKR
46	L15/JK4 FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC
47	L15/JK4 FR2	WYQQKPEKAPKSLIY
48	L15/JK4 FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC
49	L15/JK4 FR4	FGGGTKVEIKR
50	L5/JK4 FR1	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITC
51	L5/JK4 FR2	WYQQKPGKAPKLLIY
52	L5/JK4 FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC
53	L5/JK4 FR4	FGGGTKVEIKR
54	1-33/018/JK2 FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC
55	1-33/018/JK2 FR2	WYQQKPGKAPKLLIY
56	1-33/018/JK2 FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDATYYC
57	1-33/018/JK2 FR4	FGGGTKLEIKR
58	1-33/018/JK4 FR4	FGGGTKVEIKR

У рамках винаходу термін "ген антитіла зародкової лінії" або "фрагмент гена" стосується послідовності імуноглобуліну, кодованої в нелімфоїдних клітинах, які не піддалися процесу дозрівання, що приводить до перегруповання генів і мутації для експресії конкретного імуноглобуліну (див., наприклад, Shapiro et al. (2002) Crit. Rev. Immunol. 22(3):183-200; Marchalonis et al. (2001) Adv. Exp. Med. Biol. 484:13-30). Одна з переваг, забезпечуваних різними варіантами здійснення даного винаходу, впливає з твердження, що гени антитіла зародкової лінії більш ймовірно, ніж гени зрілого антитіла, зберігають основну структуру амінокислотної послідовності, характерну для індивідумів цього виду, таким чином, менш ймовірно, що вони будуть розпізнаватися як чужорідні при терапевтичному використанні для цього виду.

У рамках винаходу термін "ключові" залишки стосується конкретних залишків у варіабельній області, що більшою мірою впливають на специфічність зв'язування і/або афінність антитіла, зокрема гуманізованого антитіла. Ключовий залишок включає, як необмежувальні приклади, один або декілька з наступного: суміжний з CDR залишок, потенційна ділянка глікозилювання (може являти собою ділянку N- або O-глікозилювання), 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 в зоні Верньє і залишок в області перекриття між визначенням CDR1 варіабельної області важкого ланцюга по Chothia і визначенням першої каркасної області важкого ланцюга по Kabat.

Термін "гуманізоване антитіло" стосується антитіла, які містять послідовності варіабельної області важкого і легкого ланцюгів виду, що не є людиною (наприклад, миші), але в яких щонайменше частина послідовності VH і/або VL змінена на більш "подібну до людської", тобто більш схожу з варіабельними послідовностями зародкової лінії людини. Одним з типів гуманізованого антитіла є антитіло з пересадженими CDR, в якому послідовності CDR, що не належать людині, вбудовані в послідовності VH і VL людини для заміни відповідних каркасних (FR) послідовностей, що не належать людині. Наприклад, "гуманізоване антитіло" є антитілом або його варіантом, похідним, аналогом або фрагментом, що імуноспецифічно зв'язується з антигеном, що представляє інтерес, і містить каркасну область (FR), яка має, по суті, амінокислотну послідовність антитіла людини, і область, що визначає комплементарність (CDR), яка має, по суті, амінокислотну послідовність антитіла, що не належить людині. У рамках

винаходу термін "по суті" відносно CDR стосується CDR, що має амінокислотну послідовність, щонайменше на 80%, щонайменше на 85%, щонайменше на 90%, щонайменше на 95%, щонайменше на 98% або щонайменше на 99% ідентичну амінокислотній послідовності CDR антитіла, що не належить людині. Гуманізоване антитіло містить, по суті, всі з щонайменше одного і, як правило, двох варіабельних доменів (Fab, Fab', F(ab')₂, FabC, Fv), де всі, або по суті всі, області CDR відповідають таким з імуноглобуліну, що не належить людині (тобто донорного антитіла), і всі, або по суті всі, з каркасних областей є такими з консенсусної послідовності імуноглобуліну людини. У варіанті здійснення гуманізоване антитіло також містить щонайменше частину константної області (Fc) імуноглобуліну, як правило імуноглобуліну людини. У деяких варіантах здійснення гуманізоване антитіло містить як варіабельний домен легкого ланцюга, так і щонайменше варіабельний домен важкого ланцюга. Антитіло також може включати шарнірну область, області CH1, CH2, CH3 і CH4 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 можна вибирати з будь-якого класу імуноглобулінів, включаючи IgM, IgG, IgD, IgA і IgE, і будь-якого ізотипу, включаючи, як необмежувальні приклади, IgG1, IgG2, IgG3 і IgG4. Гуманізоване антитіло може містити послідовності з декількох класів або ізотипів, і для оптимізації бажаних ефекторних функцій можна вибирати конкретні константні домени з використанням способів, добре відомих в цій галузі.

Каркасні області і CDR гуманізованого антитіла можуть не відповідати точно батьківським послідовностям, наприклад CDR донорного антитіла або консенсусний каркас можна піддавати мутагенезу за допомогою заміни, інсерції і/або делеції щонайменше одного амінокислотного залишку таким чином, що CDR або каркасний залишок в цій ділянці не відповідає залишку в донорному антитілі або консенсусному каркасі. Однак в одному з варіантів здійснення такі мутації не будуть протяжними. Як правило, щонайменше 80%, щонайменше 85%, щонайменше 90% і щонайменше 95% залишків гуманізованого антитіла будуть відповідати таким в послідовностях батьківських FR і CDR. У рамках винаходу термін "консенсусний каркас" стосується каркасної області в консенсусній послідовності імуноглобуліну. У рамках винаходу термін "консенсусна послідовність імуноглобуліну" стосується послідовності, утвореної амінокислотами, що найчастіше зустрічаються (або нуклеотидами) в сімействі споріднених послідовностей імуноглобулінів (див., наприклад, Winnaker (1987) From Genes to Clones (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany)). Таким чином, "консенсусна послідовність імуноглобуліну" може містити "консенсусний варіабельний домен" і/або "консенсусний константний домен". У свою чергу, "консенсусний варіабельний домен" може містити одну або декілька "консенсусних каркасних областей" і/або одну або декілька "консенсусних CDR". У сімействі імуноглобулінів кожне положення в консенсусній послідовності зайняте амінокислотою, що зустрічається найчастіше в цьому положенні в сімействі. Якщо дві амінокислоти зустрічаються однаковою мірою часто, то в консенсусну послідовність можна включати будь-яку.

У рамках винаходу термін "зона Верньє" стосується підгрупи каркасних залишків, які можуть регулювати структуру CDR і точно настроювати її для відповідності антигену, як описують Foote і Winter (1992) J. Mol. Biol. 224:487-499. Залишки зони Верньє утворюють шар, що лежить під CDR, і можуть впливати на структуру CDR і афінність антитіла.

У рамках винаходу термін "полівалентний зв'язувальний білок" означає зв'язувальний білок, що містить дві або більше антигензв'язувальних ділянок. Полівалентний зв'язувальний білок конструюють таким, що містить три або більше антигензв'язувальних ділянок, і, як правило, він не є природним антитілом. Термін "поліспецифічний зв'язувальний білок" стосується зв'язувального білка, здатного зв'язуватися з двома або більше спорідненими або неспорідненими мішенями. Зв'язувальні білки з подвійним варіабельним доменом (DVD) є зв'язувальними білками, які містять дві або більше антигензв'язувальних ділянок і є чотиривалентними або полівалентними зв'язувальними білками. Такі зв'язувальні білки з DVD можуть бути моносpezifічними, тобто здатними зв'язуватися з одним антигеном, або поліспецифічними, тобто здатними зв'язуватися з двома або більше антигенами. Зв'язувальні білки з DVD, що містять два поліпептиди важкого ланцюга з DVD і два поліпептиди легкого ланцюга з DVD, позначають як молекула DVD-IgTM. Кожна половина молекули DVD-IgTM містить поліпептид важкого ланцюга з DVD, поліпептид легкого ланцюга з DVD і дві антигензв'язувальні ділянки. Кожна ділянка зв'язування містить варіабельний домен важкого ланцюга і варіабельний домен легкого ланцюга всього з 6 CDR, що беруть участь в зв'язуванні

антигену, на антигензв'язувальну ділянку. Зв'язувальні білки з DVD і способи одержання зв'язувальних білків з DVD описують в патенті США № 7612181.

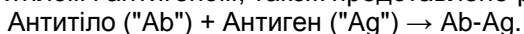
Один з аспектів винаходу стосується зв'язувального білка з DVD, що включає зв'язувальні білки, здатні зв'язуватися з IL-1 α людини. У іншому аспекті зв'язувальний білок з DVD здатний зв'язуватися з IL-1 α і другою мішенню. У одному з варіантів здійснення зв'язувальний білок з DVD здатний зв'язуватися з IL-1 α і IL-1 β .

Термін "нейтралізація" стосується нейтралізації біологічної активності цитокіну, коли зв'язувальний білок специфічно зв'язується з цитокіном. У варіанті здійснення нейтралізуючий зв'язувальний білок є нейтралізуючим антитілом, зв'язування якого з hIL-1 α приводить до інгібування біологічної активності hIL-1 α . У варіанті здійснення нейтралізуючий зв'язувальний білок зв'язується з hIL-1 α і знижує біологічну активність hIL-1 α щонайменше приблизно на 20%, щонайменше приблизно на 40%, щонайменше приблизно на 60%, щонайменше приблизно на 80%, щонайменше приблизно на 85%, щонайменше приблизно на 90%, щонайменше приблизно на 95% або щонайменше приблизно на 100%. Інгібування біологічної активності hIL-1 α за допомогою нейтралізації зв'язувального білка можна оцінювати за допомогою вимірювання одного або декількох показників біологічної активності hIL-1 α , добре відомих в цій галузі.

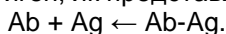
Термін "епітоп" включає будь-яку поліпептидну детермінанту, здатну специфічно зв'язуватися з імуноглобуліном або Т-клітинним рецептором. У деяких варіантах здійснення епітопи включають хімічно активні поверхневі угруповання молекул, таких як амінокислоти, бічні цукрові ланцюги, фосфорильні або сульфонільні групи, і в деяких варіантах здійснення можуть мати конкретні тривимірні структурні характеристики і/або конкретні характеристики заряду. Епітоп є областю 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 партнері по зв'язуванню. Антигенний фрагмент може містити декілька епітопів. У деяких варіантах здійснення вказують, що антитіло специфічно зв'язується з антигеном, коли воно розпізнає свій антиген-мішень в складній суміші білків і/або макромолекул. Вказують, що антитіла "зв'язуються з одним і тим же епітопом", якщо антитіла перехресно конкурують (одне запобігає зв'язуванню або модулює ефект іншого). Крім того, структурні визначення епітопів (які перекриваються, аналогічні, ідентичні) є інформативними, але функціональні визначення часто є більш значущими, оскільки вони включають структурні (зв'язування) і функціональні (модуляція, конкуренція) параметри.

Термін "поверхневий плазмонний резонанс" стосується оптичного явища, яке дозволяє аналізувати біоспецифічні взаємодії в реальному часі за допомогою визначення змін концентрацій білків в матриці біосенсора, наприклад, з використанням системи BIACORE™ (Biacore International AB, a GE Healthcare company, Uppsala, Sweden and Piscataway, New Jersey). Додатково опис див. в Jonsson U. et al. (1993) Ann. Biol. Clin. 51:19-26; Jonsson U. et al. (1991) BioTechniques, 11:620-627; Johnsson B. et al. (1995) J. Mol. Recognit. 8:125-131; і Johnsson B. et al. (1991) Anal. Biochem. 198:268-277.

Термін " k_{on} " стосується константи швидкості прямої реакції для асоціації зв'язувального білка (наприклад, антитіла) з антигеном для утворення, наприклад, комплексу антитіло/антиген, як відомо в цій галузі. " k_{on} " також відома по термінах "константа швидкості асоціації" або "ka", як взаємозамінно використовують в рамках винаходу. Це значення, яке свідчить про швидкість зв'язування антитіла зі своїм антигеном-мішенню або швидкість утворення комплексу між антитілом і антигеном, також представлено рівнянням:



Термін " k_{off} " стосується константи швидкості зворотної реакції для дисоціації зв'язувального білка (наприклад, антитіла), наприклад, від комплексу антитіло/антиген, як відомо в цій галузі. " k_{off} " також відома по термінах "константа швидкості дисоціації" або "kd", як взаємозамінно використовують в рамках винаходу. Це значення свідчить про швидкість дисоціації антитіла від свого антигену-мішені або розділення комплексу Ab-Ag з перебігом часу на вільне антитіло і антиген, як представлено в рівнянні нижче:



Терміни "рівноважна константа дисоціації" або " K_D ", як взаємозамінно використовують в рамках винаходу, стосуються значення, одержаного при вимірюванні титруванням при рівновазі або за допомогою ділення константи швидкості дисоціації (k_{off}) на константу швидкості асоціації (k_{on}). Константу швидкості асоціації, константу швидкості дисоціації і рівноважну константу швидкості дисоціації використовують для представлення афінності зв'язування антитіла з антигеном. Способи визначення констант швидкості асоціації і дисоціації добре відомі в цій галузі. Використання способів на основі флуоресценції характеризується високою

чутливістю і можливістю аналізувати зразки в фізіологічних буферах при рівновазі. Можна використовувати інші експериментальні підходи і інструменти, такі як аналіз BIACORE™ (аналіз біомолекулярної взаємодії) (наприклад, інструмент, доступний в Biacore International AB, a GE Healthcare company, Uppsala, Sweden). Крім того, також можна використовувати аналіз KinExA® (Kinetic Exclusion Assay), доступний в Sapidyne Instruments (Boise, Idaho).

У рамках винаходу термін "мічений зв'язувальний білок" стосується білка з вбудованою міткою, яка забезпечує ідентифікацію зв'язувального білка. У одному з аспектів мітка є детектованим маркером, наприклад у випадку вбудовування радіоактивно міченої амінокислоти або прикріплення до поліпептиду залишків біотину, які можна визначати за допомогою міченого авідину (наприклад, стрептавідину, що містить флуоресцентний маркер, або ферментативної активності, яку можна визначати оптичними або колориметричними способами). Приклади міток для поліпептидів включають, як необмежувальні приклади, наступні: радіоактивні ізотопи або радіонукліди (наприклад, ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho і ^{153}Sm), флуоресцентні мітки (наприклад, FITC, родамін і фосфати лантанодів), ферментативні мітки (наприклад, пероксидазу хрому, люциферазу, лужну фосфатазу), хемілюмінесцентні маркери, біотинільні групи, попередньо визначені поліпептидні епітопи, розпізнавані вторинним репортером (наприклад, парні послідовності лейцинової блискавки, ділянки зв'язування вторинних антитіл, металзв'язувальні домени і епітопні мітки), і магнітні засоби, такі як хелати гадолінію.

Термін "кон'югат антитіла" стосується зв'язувального білка, такого як антитіло, хімічно зв'язане з другою хімічною сполукою, такою як терапевтичний або цитотоксичний засіб. Термін "засіб" використовують в рамках винаходу для позначення хімічної сполуки, суміші хімічних сполук, біологічної макромолекули або екстракту, одержуваного з біологічних матеріалів. У одному з аспектів терапевтичні або цитотоксичні засоби включають, як необмежувальні приклади, коклюшний токсин, таксол, цитохалазин В, граміцидин D, бромистий етидид, еметин, мітоміцин, етопозид, тенепозид, вінкрисин, вінбластин, колхіцин, доксорубіцин, даунорубіцин, дигідроксіантрацендіон, мітоксантрон, мітраміцин, актиноміцин D, 1-дегідротестостерон, глюкокортикоїди, прокаїн, тетракаїн, лідокаїн, пропранолол і пуроміцин і їх аналоги або гомологи.

Терміни "кристал" і "кристалізований" стосуються антитіла або його антигензв'язувальної частини, що існує у формі кристала. Кристали є однією з форм твердого стану речовини, відмінною від інших форм, таких як аморфний твердий стан або рідкокристалічний стан. Кристали складаються з регулярних, повторюваних, тривимірних решіток атомів, іонів, молекул (наприклад, білків, таких як антитіла) або молекулярних агрегатів (наприклад, комплексів антиген/антитіло). Ці тривимірні решітки розташовані відповідно до конкретних математичних закономірностей, добре відомих в цій галузі. Основну одиницю або структурний елемент, що повторюється в кристалі, називають асиметричною одиницею. Повторення асиметричної одиниці в порядку, відповідному встановленій, чітко визначеній кристалографічній симетрії, представляє "базисну комірку" кристала. Повторення базисної комірки за допомогою регулярних трансляцій у всіх трьох вимірах представляє кристал. Див. Giege і Ducruix (1999) Chapter 1, In Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach, 2nd ed. (Ducruix and Giege, eds.) (Oxford University Press, New York, 1999) pp. 1-16.

Термін "полінуклеотид" означає полімерну форму з двох або більше нуклеотидів, як рибонуклеотидів, так і дезоксинуклеотидів, або модифіковану форму будь-якого типу нуклеотиду. Термін включає одно- і дволанцюжкові форми ДНК або РНК, але у варіанті здійснення це дволанцюжкова ДНК.

Термін "виділений полінуклеотид" означає полінуклеотид (наприклад, геномного, кДНК- або синтетичного походження або їх комбінацію), не зв'язаний з всім полінуклеотидом або його частиною, з якими він зв'язаний в природі, з якими він функціонально зв'язаний в природі або з якими він спільно знаходиться в природі як частина більшої послідовності.

Термін "вектор" стосується молекули нуклеїнової кислоти, здатної транспортувати іншу нуклеїнову кислоту, з якою вона зв'язана. Одним з типів вектора є "плазміда", що позначає замкнену кільцеву дволанцюжкову ДНК, в яку можна лігувати додаткові сегменти ДНК. Іншим типом вектора є вірусний вектор, де додаткові сегменти ДНК можна лігувати у вірусний геном. Конкретні вектори здатні до автономної реплікації в клітині-хазяїні, в яку їх вбудовують (наприклад, бактеріальні вектори, що мають бактеріальну ділянку початку реплікації, і епісомні вектори ссавців). Інші вектори (наприклад, неепісомні вектори ссавців) можна вбудовувати в геном клітини-хазяїна після введення в клітину-хазяїна, і, таким чином, вони реплікуються разом з геномом хазяїна. Крім того, конкретні вектори здатні регулювати експресію генів, з якими вони функціонально зв'язані. Такі вектори в рамках винаходу позначають як "рекомбінантні експресуючі вектори" (або просто "експресуючі вектори"). В основному,

експресуючі вектори, придатні для способів рекомбінантної ДНК, часто є формою плазмід. У рамках винаходу терміни "плазміда" і "вектор" можна використовувати взаємозамінно, оскільки плазміда є найбільш загальноживаною формою вектора. Однак винахід призначений для включення інших форм експресуючих векторів, таких як вірусні вектори (наприклад, ретровіруси з дефективною реплікацією, аденовіруси і аденоасоційовані віруси), що виконують еквівалентні функції.

Термін "функціонально зв'язаний" стосується такого положення компонентів, що вони функціонують певним чином. Контролююча послідовність, "функціонально зв'язана" з кодуючою послідовністю, лігована таким чином, що експресії кодуючої послідовності досягають в умовах, сумісних з контрольними послідовностями. "Функціонально зв'язані" послідовності включають контролюючі експресію послідовності, суміжні з нуклеїновою кислотою, що представляє інтерес, контролюючі експресію послідовності, діючі в транс-положенні, тобто такі, що знаходяться на іншій молекулі нуклеїнової кислоти, ніж нуклеїнова кислота, що представляє інтерес, але, незважаючи на це, здійснюють контроль над нуклеїновою кислотою, що представляє інтерес, і контролюючі експресію послідовності, локалізовані на тій же молекулі нуклеїнової кислоти, що і нуклеїнова кислота, що представляє інтерес, але на відстані від неї. У рамках винаходу термін "контролююча експресію послідовність" стосується полінуклеотидних послідовностей, необхідних для впливу на експресію і процесингу кодуючих послідовностей, з якими вони ліговані. Контролюючі експресію послідовності включають відповідні послідовності ініціації транскрипції, термінуючі, промоторні і енхансерні послідовності, ефективні сигнали процесингу РНК, такі як сигнали сплайсингу і поліаденілювання, послідовності, що стабілізують цитоплазматичну мРНК, послідовності, що підвищують ефективність трансляції (тобто консенсусна послідовність Козака), послідовності, що підвищують стабільність білка, і, при бажанні, послідовності, що підвищують секрецію білка. Природа таких контролюючих послідовностей відрізняється залежно від організму-хазяїна, у прокаріот такі контролюючі послідовності, як правило, включають промотор, ділянку зв'язування рибосоми і послідовність термінації транскрипції, у еукаріот, як правило, такі контролюючі послідовності включають промотори і послідовність термінації транскрипції. Термін "контролюючі послідовності" призначений для включення компонентів, наявність яких важлива для експресії і процесингу, і вони також можуть включати додаткові компоненти, наявність яких є перевагою, наприклад лідерні послідовності і послідовності партнера по злиттю.

"Трансформація" стосується будь-якого процесу, за допомогою якого екзогенна ДНК проникає в клітину-хазяїна. Трансформація може відбуватися в природних або штучних умовах з використанням різних способів, добре відомих в цій галузі, наприклад, для вбудовування чужорідних послідовностей нуклеїнової кислоти в прокаріотичну або еукаріотичну клітину-хазяїна. Способи вибирають з урахуванням клітини-хазяїна, що підлягає трансформації, і вони можуть включати, як необмежувальні приклади, вірусну інфекцію, електропорацію, ліпофекцію і бомбардування частинками. Такі "трансформовані" клітини включають стабільно трансформовані клітини, в яких вбудовувана ДНК здатна реплікуватися як плазміда, що автономно реплікується, або як частина хромосоми хазяїна. Вони також включають клітини, транзитивно експресуючі вбудовувану ДНК або РНК протягом обмеженого періоду часу.

У рамках винаходу термін "рекомбінантна клітина-хазяїн" (або просто "клітина-хазяїн") призначений для позначення клітини, в яку вбудовують екзогенну ДНК. Такі терміни призначені для включення не тільки конкретної вказаної клітини, але і потомства такої клітини. Оскільки конкретні модифікації можуть відбуватися в подальших поколіннях внаслідок мутації або впливу навколишнього середовища, таке потомство може, по суті, не бути ідентичним батьківській клітині, але все одно входить в обсяг терміна "клітина-хазяїн", в рамках винаходу. У одному з аспектів клітини-хазяїни включають прокаріотичні і еукаріотичні клітини, вибрані з будь-якого Царства живих організмів. Еукаріотичні клітини включають клітини найпростіших, грибів, рослин і тварин. У іншому аспекті клітини-хазяїни включають, як необмежувальні приклади, лінію клітин прокаріот *Escherichia coli*, лінії клітин ссавців CHO, HEK 293 і COS, лінію клітин комарів Sf9 і клітини грибів *Saccharomyces cerevisiae*.

Можна використовувати стандартні способи для рекомбінантної ДНК, синтезу олігонуклеотидів і культивування і трансформації тканин (наприклад, електропорації і ліпофекції). Способи ферментативних реакцій і очищення можна здійснювати згідно з інструкціями виробника або як загальноприйнято в цій галузі або представлено в рамках винаходу. Наведені вище способи, як правило, можна здійснювати згідно із загальноприйнятими способами, добре відомими в цій галузі, і як описано в різних загальних і більш спеціальних джерелах, цитованих і обговорюваних протягом всього даного опису. Див.

наприклад, Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2d ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989).

Термін "трансгенний організм" стосується організму, який має клітини, що містять трансген, де з трансгена, вбудованого в організм (або предка організму), експресується поліпептид, що не експресується в природі в організмі. "Трансген" є конструкцією ДНК, стабільно функціонально вбудованою в геном клітини, з якої розвивається трансгенний організм, що направляє експресію продукту кодованого гена в одному або декількох типах клітин або тканин трансгенного організму.

Терміни "регулює" і "модулює" використовують взаємозамінно і вони стосуються зміни активності молекули, що представляє інтерес (наприклад, біологічної активності hIL-1 α). Модуляція може являти собою підвищення або зниження величини конкретної активності або функції молекули, що представляє інтерес. Приклади активностей і функцій молекули включають, як необмежувальні приклади, характеристики зв'язування, ферментативну активність, активацію клітинного рецептора і передачу сигналу.

Відповідно, термін "модулятор" означає сполуку, здатну змінювати активність або функцію молекули, що представляє інтерес (наприклад, біологічну активність hIL-1 α). Наприклад, модулятор може викликати підвищення або зниження величини конкретної активності або функції молекули в порівнянні з величиною активності або функції, спостережуваною за відсутності модулятора. У деяких варіантах здійснення модулятор є інгібітором, що знижує величину щонайменше однієї активності або функції молекули. Приклади інгібіторів включають, як необмежувальні приклади, білки, пептиди, антитіла, пептидні антитіла, вуглеводи або невеликі органічні молекули. Пептидні антитіла описують, наприклад, в публікації PCT № WO 01/83525.

Термін "агоніст" стосується модулятора, який при контакті з молекулою, що представляє інтерес, викликає підвищення величини конкретної активності або функції молекули в порівнянні з величиною активності або функції, спостережуваною за відсутності агоніста. Конкретні агоністи, що представляють інтерес, можуть включати, як необмежувальні приклади, поліпептид, нуклеїнову кислоту, вуглевод або будь-яку іншу молекулу, що зв'язується з IL-1 α і/або IL-1 β .

Термін "антагоніст" або "інгібітор" стосується модулятора, який при контакті з молекулою, що представляє інтерес, викликає зниження величини конкретної активності або функції молекули в порівнянні з величиною активності або функції, спостережуваною за відсутності антагоніста. Антагоністи включають ті, що блокують або модулюють біологічну або імунологічну активність IL-1 α і/або IL-1 β . Антагоністи і інгібітори IL-1 α можуть включати, як необмежувальні приклади, поліпептид, нуклеїнову кислоту, вуглевод або будь-яку іншу молекулу, що зв'язується з IL-1 α . Антагоністи і інгібітори IL-1 β можуть включати, як необмежувальні приклади, поліпептид, нуклеїнову кислоту, вуглевод або будь-яку іншу молекулу, що зв'язується з IL-1 β .

Термін "ефективна кількість" стосується кількості терапевтичного засобу, достатньої для зниження тяжкості і/або тривалості порушення або одного або декількох його симптомів, профілактики прогресування порушення, викликання регресування порушення, профілактики рецидиву, розвитку, дебюту або прогресування одного або декількох симптомів, асоційованих з порушенням, визначення порушення або підвищення або поліпшення профілактичних або терапевтичних ефектів іншого терапевтичного засобу (наприклад, профілактичного або терапевтичного засобу).

Термін "зразок" використовують в його найширшому розумінні. Термін "біологічний зразок" включає, як необмежувальні приклади, будь-яку кількість речовини з живого організму або раніше живого організму. Такі живі організми включають, як необмежувальні приклади, людину, мишей, щурів, мавп, собак, кроликів і інших тварин. Такі речовини включають, як необмежувальні приклади, кров, сироватку, сечу, синовіальну рідину, клітини, органи, тканини, кістковий мозок, лімфовузли і селезінку.

"Афінно зріле" антитіло є антитілом з однією або декількома змінами в одній або декількох CDR або їх каркасах, що приводить до поліпшення афінності антитіла до антигену в порівнянні з батьківським антитілом, що не має таких змін. Переважні афінно зрілі антитіла будуть мати наномольні або навіть пікомольні афінності для антигену-мішені. Афінно зрілі антитіла одержують відомими в цій галузі способами. У Marks et al. (1992) *BioTechnology*, 10:779-783, описують дозрівання афінності перетасовуванням доменів VH і VL. Випадковий мутагенез CDR і/або каркасних залишків описують в Barbas et al. (1994) *Proc Nat. Acad. Sci. USA*, 91:3809-3813; Schier et al. (1995) *Gene*, 169:147-155; Yelton et al. (1995) *J. Immunol.* 155:1994-2004; Jackson et al. (1995) *J. Immunol.* 154(7):3310-3319; і Hawkins et al. (1992) *J. Mol. Biol.* 226:889-896.

Біль, що зберігається у індивідуума після зникнення його вихідної причини, є вже не симптомом, а окремим визнаним захворюванням. У рамках винаходу термін "алодинія" стосується стану, при якому індивідуум випробовує больову відповідь на безпечний в нормі стимул, як правило, механічної природи, такий як обробка шкіри щіткою. Алодинічний біль не залучає ноцицептори і, таким чином, його також можна позначати як "неноцицептивний" біль. У рамках винаходу термін "гіпералгезія" стосується стану, при якому індивідуум має підвищену чутливість до болю, що є результатом впливу больового стимулу, особливо стимулу, що активує ноцицептори, такого як больова механічна, термічна або хімічна стимуляція. Стимул, що активує ноцицептори, викликає біль. Гіпералгезія є станом, при якому індивідуум має підвищену больову відповідь на нормальний больовий стимул. Індивідуум може страждати алодинією, гіпералгезією або комбінацією алодинії і гіпералгезії.

I. Одержання зв'язувальних білків DVD-Ig™, що зв'язуються з IL-1α і IL-1β

Описують конструювання і одержання імуноглобулінових зв'язувальних білків з подвійним варіабельним доменом (DVD-Ig™), здатних зв'язуватися з одним або декількома антигенами-мішенями (або епітопами) (див., наприклад, публікацію PCT № WO 2007/024715). Зв'язувальний білок DVD-Ig, застосовний в способах і композиціях для лікування остеоартриту, представлених в рамках винаходу, зв'язується з IL-1α і IL-1β. У варіанті здійснення зв'язувальний білок DVD-Ig™ містить щонайменше два поліпептидні ланцюги, де перший поліпептидний ланцюг містить VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, де VD1 є першим варіабельним доменом важкого ланцюга, VD2 є другим варіабельним доменом важкого ланцюга, C є константним доменом важкого ланцюга, X1 є лінкером, за умови, що він не є CH1, і X2 є Fc-областю, і де вказаний другий поліпептидний ланцюг містить VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, де VD1 є першим варіабельним доменом легкого ланцюга, VD2 є другим варіабельним доменом легкого ланцюга, C є константним доменом легкого ланцюга, X1 є лінкером, за умови, що він не є CH1, і X2 не містить Fc-область, і n є 0 або 1. Зв'язувальний білок DVD-Ig™, що складається з першого і другого поліпептидних ланцюгів, має дві антигензв'язувальні ділянки.

У іншому варіанті здійснення зв'язувальний білок DVD-Ig™ містить чотири поліпептидні ланцюги, де кожний з перших двох поліпептидних ланцюгів містить VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, відповідно, де VD1 є першим варіабельним доменом важкого ланцюга, VD2 є другим варіабельним доменом важкого ланцюга, C є константним доменом важкого ланцюга, X1 є лінкером, за умови, що він не є CH1, і X2 є Fc-областю, і кожний з других двох поліпептидних ланцюгів містить VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, відповідно, де VD1 є першим варіабельним доменом легкого ланцюга, VD2 є другим варіабельним доменом легкого ланцюга, C є константним доменом легкого ланцюга, X1 є лінкером, за умови, що він не є CH1, і X2 не містить Fc-область, і n є 0 або 1. Такий зв'язувальний білок DVD-Ig™ має чотири антигензв'язувальні ділянки.

Як приклад, зв'язувальний білок DVD-Ig, застосовний в способах і композиціях для лікування остеоартриту у індивідуума, представлених в рамках винаходу, можна конструювати таким, що має ділянку зв'язування IL-1β, утворену з'єднанням варіабельних доменів VD1 двох (першого і другого) поліпептидів, і ділянку зв'язування IL-1α, утворену з'єднанням варіабельних доменів VD2 двох (першого і другого) поліпептидів. Альтернативно, зв'язувальний білок DVD-Ig, застосовний в способах і композиціях для лікування остеоартриту у індивідуума, представлених в рамках винаходу, може мати ділянку зв'язування IL-1α, утворену з'єднанням варіабельних доменів VD1 двох (першого і другого) поліпептидів, і ділянку зв'язування IL-1β, утворену з'єднанням варіабельних доменів VD2 двох (першого і другого) поліпептидів.

A. Одержання батьківських моноклональних антитіл

Варіабельні домени зв'язувального білка з DVD можна одержувати з батьківських антитіл, включаючи поліклональні і моноклональні антитіла, здатні зв'язуватися з антигенами, що представляють інтерес. Ці антитіла можуть бути природними або їх можна одержувати за допомогою рекомбінантної технології.

Моноклональні антитіла можна одержувати з використанням широкого спектра способів, відомих в цій галузі, включаючи використання гібридом, рекомбінантної технології, технології фагового дисплея або їх комбінацій. Наприклад, моноклональні антитіла можна одержувати з використанням гібридомних способів, включаючи відомі в цій галузі і наведені, наприклад, в Harlow et al. *Antibodies: A Laboratory Manual*, 2nd ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988); Hammerling et al. *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* (Elsevier, N.Y., 1981), pages 563-581 (вказані джерела включені як посилання в повному обсязі). У рамках винаходу термін "моноклональне антитіло" (скорочено "mAb") не обмежений антитілами, одержуваними за допомогою гібридомної технології. Термін "моноклональне антитіло" стосується антитіла, одержуваного з одного клону, включаючи будь-який еукаріотичний, прокаріотичний або фаговий клон, а не способу, яким його одержують. Гібридами піддають селекції, клонують і

додатково піддають скринінгу відносно бажаних характеристик, включаючи стійкий ріст гібридами, високу продукцію антитіл і бажані характеристики антитіл, з використанням стандартних способів. Гібридами можна культивувати і вирощувати *in vivo* в сингенних тваринах, в тваринах з дефектною імунною системою, наприклад безтимусних мишах, або в культурі клітин *in vitro*. Способи селекції, клонування і вирощування гібридом добре відомі фахівцям в цій галузі. У переважному варіанті здійснення гібридами є гібридами миші. У іншому варіанті здійснення гібридами одержують в видах, що не належать до людини, не належать до миші, таких як щури, вівці, свині, кози, велика рогата худоба або коні. У іншому варіанті здійснення гібридами є гібридами людини, в яких несекреторну мієлому людини піддають злиттю з клітиною людини, експресуючою антитіло, здатне зв'язуватися з бажаним специфічним антигеном, таким як IL-1 α або IL-1 β .

Рекомбінантні моноклональні антитіла також одержують з окремих виділених лімфоцитів з використанням способу, позначуваного в цій галузі як спосіб виділення антитіл з вибраних 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. В цьому способі визначають окремі клітини, секретуючі антитіла, що представляють інтерес, наприклад лімфоцити, одержані з імунізованих тварин, і виділяють кДНК варіабельних областей важкого і легкого ланцюгів з клітин за допомогою ПЛР із зворотною транскрипцією, і потім ці варіабельні області можна експресувати, відносно відповідних константних областей імуноглобулінів (наприклад, константних областей людини), в клітинах-хазяїнах ссавців, таких як клітини COS або CHO. Клітини-хазяїни, трансфіковані ампліфікованими послідовностями імуноглобуліну, одержаними з селектованих *in vivo* лімфоцитів, потім можна піддавати додатковому аналізу і селекції *in vitro*, наприклад пенінгом трансфікованих клітин для виділення клітин, експресуючих антитіла до антигену, що представляє інтерес. На ампліфіковані послідовності імуноглобуліну можна додатково впливати *in vitro*, наприклад, за допомогою способів дозрівання афінності *in vitro*, таких, як описувані в публікації PCT № WO 97/29131 і публікації PCT № WO 00/56772.

Моноклональні антитіла також одержують імунізацією тварини, що не належить до людини, яка містить частину або весь імуноглобуліновий локус людини, з використанням антигену, що представляє інтерес. У варіанті здійснення тварина, що не належить до людини, є трансгенною мишею XENOMOUSE, що є сконструйованою лінією мишей, які містять великі фрагменти імуноглобулінових локусів людини і дефектних по продукції антитіл миші. Див., наприклад, Green et al. (1994) Nature Genetics, 7:13-21, і патенти США №№ 5916771, 5939598, 5985615, 5998209, 6075181, 6091001, 6114598 і 6130364. Див. також 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 00/037504. Трансгенна миша XENOMOUSE продукує подібний дорослому репертуар людини повністю людських антитіл і антигенспецифічні моноклональні антитіла людини. Трансгенна миша XENOMOUSE містить приблизно 80% репертуару антитіл людини, завдяки вбудовуванню фрагментів локусів важкого ланцюга зародкової лінії людини, конфігурації YAC розміром порядку мегабази і х-локусів легкого ланцюга. Див., Mendez et al. (1997) Nature Genet. 15:146-156, і Green і Jakobovits (1998) J. Exp. Med. 188:483-495.

Для одержання батьківських антитіл також можна використовувати способи *in vitro*, де бібліотеку антитіл піддають скринінгу для визначення антитіла, що має бажану специфічність зв'язування. Способи такого скринінгу бібліотек рекомбінантних антитіл добре відомі в цій галузі і включають способи, описувані, наприклад, в 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, і 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. Acid Res. 19:4133-4137; і Barbas et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:7978-7982, і патентній публікації США № 2003/0186374.

Батьківські антитіла, застосовні в даному винаході, також можна одержувати з використанням різних способів фагового дисплея, відомих в цій галузі. У способах фагового дисплея домени функціонального антитіла представляються на поверхні фагових частинок, що несуть кодуєчі їх полінуклеотидні послідовності. Зокрема, такий фаг можна використовувати для представлення антигензв'язувальних доменів, експресованих з репертуару або комбінаторної бібліотеки антитіл (наприклад, людини або миші). Фаг, експресуючий антигензв'язувальний домен, який зв'яже антиген, що представляє інтерес, можна піддавати

селекції або ідентифікувати з використанням антигену, наприклад з використанням міченого антигену або антигену, зв'язаного або фіксованого на твердій поверхні або бусині. Фаг, використовуваний в цих способах, як правило, є ниткоподібним фагом, включаючи fd і M13, зв'язуючі домени, експресовані з фага з доменами Fab, Fv або стабілізованого дисульфідними зв'язками Fv антитіла, піддавали рекомбінантному злиттю з геном білка III або білка VIII фага. Приклади способів фагового дисплея, які можна використовувати для одержання антитіл за даним винаходом, включають описувані в Brinkman 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 і WO 95/20401, і патентах США №№ 5698426, 5223409, 5403484, 5580717, 5427908, 5821047, 5571698, 5427908, 5516637, 5780225, 5658727, 5733743 і 5969108.

Як описано у вказаних вище посиланнях, після селекції фага кодуєчі антитіло області з фага можна виділяти і використовувати для одержання цілих антитіл, включаючи антитіла людини або будь-який інший бажаний антигензв'язувальний фрагмент, і експресувати в будь-якому бажаному хазяїні, включаючи клітини ссавців, клітини комах, рослинні клітини, дріжджі і бактерії, наприклад, як детально описано нижче. Наприклад, способи рекомбінантного одержання Fab-, Fab'- і F(ab')₂-фрагментів також можна використовувати за допомогою відомих в цій галузі способів, таких як описувані в публікації PCT № WO 92/22324; Mullinax et al. (1992) BioTechniques, 12(6):864-869; Sawai et al. (1995) AJRI, 34:26-34; і Better et al. (1988) Science, 240:1041-1043. Приклади способів, які можна використовувати для одержання одноланцюжкових Fv і антитіл, включають описувані 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, можна використовувати інші способи, відомі в цій галузі, для скринінгу великих комбінаторних бібліотек для ідентифікації батьківських антитіл. Одним з типів альтернативних систем експресії є система, в якій бібліотеку рекомбінантних антитіл експресують у вигляді продукту злиття РНК-білок, як описано в публікації PCT № WO 98/31700 Szostak і Roberts, і в Roberts R.W. and Szostak J.W. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:12297-12302. В цій системі одержують ковалентне злиття між мРНК і пептидом або білком, який вона кодує, за допомогою трансляції *in vitro* синтетичної мРНК, що несе пуроміцин, пептидильний акцепторний антибіотик, на своєму 3'-кінці. Таким чином, специфічну мРНК можна збагачувати зі складної суміші мРНК (наприклад, комбінаторної бібліотеки) на основі властивостей кодованого пептиду або білка, наприклад антитіла або його частини, таких як зв'язування антитіла або його частини з антигеном подвійної специфічності. Послідовності нуклеїнової кислоти, кодуєчі антитіла або їх частини, що виділяються при скринінгу таких бібліотек, можна експресувати рекомбінантними способами, як описано вище (наприклад, в клітинах-хазяїнах ссавців), і, крім того, їх можна піддавати додатковому дозріванню афінності за допомогою додаткових раундів скринінгу продуктів злиття мРНК-пептид, в яких мутації введені в початково вибрані послідовності, або іншими способами дозрівання афінності *in vitro* рекомбінантних антитіл, як описано вище.

У іншому підході батьківські антитіла також можна одержувати з використанням способів дріжджового дисплея, відомого в цій галузі. У способах дріжджового дисплея генетичні способи використовують для приєднання доменів антитіла до стінки дріжджової клітини і представлення їх на поверхні дріжджової клітини. Зокрема, такі дріжджі можна використовувати для представлення антигензв'язувальних доменів, експресованих з репертуару або комбінаторної бібліотеки антитіл (наприклад, людини або миші). Приклади способів дріжджового дисплея, які можна використовувати для одержання батьківських антитіл, включають описувані в патенті США № 6699658.

Описувані вище антитіла можна додатково модифікувати для одержання антитіл з пересадженими CDR і гуманізованих батьківських антитіл. Батьківські антитіла з пересадженими CDR містять послідовності варіабельної області важкого і легкого ланцюгів з антитіла людини, де одну або декілька областей CDR VH і/або VL замінюють послідовностями CDR антитіл миші, здатних зв'язуватися з антигеном, що представляє інтерес. Каркасна послідовність з будь-якого антитіла людини може служити матрицею для пересадження CDR. Однак заміна нерозгалуженого ланцюга на такому каркасі часто приводить до деякої втрати афінності зв'язування з антигеном. Чим більш гомологічним є антитіло людини відносно вихідного мишачого антитіла, тим менше імовірність того, що комбінування CDR миші з каркасом людини буде вносити викривлення в CDR, які можуть знижувати афінність. Таким

чином, переважно варіабельна область каркаса людини, вибрана для заміни варіабельної області каркаса миші за винятком CDR, має щонайменше 65% ідентичність послідовності з варіабельною областю каркаса антитіла миші. Більш переважно, варіабельні області людини і миші за винятком CDR мають щонайменше 70% ідентичність послідовності. Навіть більш переважно, варіабельні області людини і миші за винятком CDR мають щонайменше 75% ідентичність послідовності. Найбільш переважно, варіабельні області людини і миші за винятком CDR мають щонайменше 80% ідентичність послідовності. В цій галузі відомі способи одержання таких антитіл (див. EP 239400, публікацію PCT № WO 91/09967; патенти США №№ 5225539, 5530101 і 5585089), ремоделювання поверхні антитіл (EP 592106; EP 519596; Padlan (1991) *Mol. Immunol.* 28(4/5):489-498; Studnicka et al. (1994) *Protein Engineering*, 7(6):805-814; Roguska et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:969-973) і перестановки ланцюгів (патент США № 5565352).

Гуманізовані антитіла є молекулами антитіл з видів, що не є людиною, що зв'язують бажаний антиген, які містять одну або декілька областей, що визначають комплементарність (CDR), з видів, що не є людиною, і каркасні області з молекули імуноглобуліну людини. Описують відомі послідовності Ig людини, наприклад, 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/links.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/links1.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/; abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html; www.unizh.ch/about.honegger/AHOseminar/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/about.fmolina/Web-pages/Pept/spottech.html; www.jerini.de/frproducts.htm; www.patents.ibm.com/ibm.html. Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Dept. Health (1983), зміст кожного включений в даний опис як посилання в повному обсязі. Такі імпортовані послідовності можна використовувати для зниження імуногенності або зниження, підвищення або модифікації зв'язування, афінності, швидкості прямої реакції, швидкості зворотної реакції, авідності, специфічності, часу напівжиття або будь-якої іншої придатної характеристики, як відомо в цій галузі.

Каркасні залишки в каркасних областях людини можна замінювати відповідним залишком з CDR-донорного антитіла для зміни, переважно поліпшення, зв'язування антигену. Ці заміни в каркасі визначають способами, добре відомими в цій галузі, наприклад, за допомогою моделювання взаємодій CDR і каркасних залишків для визначення каркасних залишків, важливих для зв'язування антигену, і порівняння послідовностей для визначення незвичайних каркасних залишків в конкретних положеннях. Див., наприклад, патент США № 5585089; Riechmann et al. (1988) *Nature*, 332:323. Тривимірні моделі імуноглобулінів є загальнодоступними і добре відомі фахівцям в цій галузі. Доступні комп'ютерні програми, які ілюструють і представляють можливі тривимірні конформаційні структури вибраних кандидатів-послідовностей імуноглобулінів. Дослідження цих дисплеїв дозволяє аналізувати можливу роль залишків в функціонуванні кандидата-послідовності імуноглобуліну, тобто аналізувати залишки, що впливають на здатність імуноглобуліну-кандидата зв'язуватися з антигеном. Таким чином, залишки в FR можна вибирати і комбінувати з консенсусних і імпортованих послідовностей таким чином, щоб досягати бажаної характеристики антитіла, такої як підвищена афінність для антигену-мішені. В основному, залишки в CDR напряму і найбільш значно беруть участь у впливі на зв'язування антигену. Антитіла можна гуманізувати з використанням різних способів, відомих в цій галузі, таких як, як необмежувальні приклади, описувані в Jones et al. (1986) *Nature*, 321:522; Verhoeven et al. (1988) *Science*, 239:1534; Sims et al. (1993) *J. Immunol.*

151:2296; Chothia and Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901; Carter et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285; Presta et al. (1993) J. Immunol. 151:2623; Padlan (1991) Mol. Immunol. 28(4/5):489-498; Studnicka et al. (1994) Protein Engineering, 7(6):805-814; Roguska et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:969-973; публікаціях PCT №№ WO 91/09967, WO 90/14443, WO 90/14424, WO 90/14430, 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) і WO 93/06213 (PCT/GB92/01755), EP 0 592 106, EP 0 519 596, EP 0 239 400, патентах США №№ 5565332, 5723323, 5976862, 5824514, 5817483, 5814476, 5763192, 5723323, 5766886, 5714352, 6204023, 6180370, 5693762, 5530101, 5585089, 5225539 і 4816567.

Батьківські моноклональні антитіла можна вибирати з різних моноклональних антитіл, здатних зв'язуватися з IL-1 α або IL-1 β .

Батьківські моноклональні антитіла також можна вибирати з різних терапевтичних антитіл, схвалених для використання, що знаходяться на стадії клінічних випробувань або розробки для клінічного використання.

В. Конструювання молекул DVD-Ig

Молекулу імуноглобуліну з подвійним варіабельним доменом (DVD-Ig) конструюють таким чином, що два різних варіабельних домени легких ланцюгів (VL) з двох різних батьківських моноклональних антитіл з'єднують в тандем напряму або через короткий лінкер способами рекомбінантної ДНК, за якими іде константний домен легкого ланцюга. Аналогічно, важкий ланцюг містить два різних варіабельних домени важкого ланцюга (VH), сполучені в тандем, за якими іде константний домен СН1 і Fc-область. Див. публікацію PCT № WO 2007/024715.

Варіабельні домени можна одержувати з використанням способів рекомбінантної ДНК з батьківського антитіла, одержаного будь-яким зі способів, описуваних вище. У переважному варіанті здійснення варіабельний домен є варіабельним доменом важкого або легкого ланцюга миші. Більш переважно, варіабельний домен є варіабельним доменом з пересадженими CDR або гуманізованим варіабельним доменом важкого або легкого ланцюга. Найбільш переважно, варіабельний домен є варіабельним доменом важкого або легкого ланцюга людини.

У одному з варіантів здійснення перший і другий варіабельні домени з'єднують напряму один з одним з використанням способів рекомбінантної ДНК. У іншому варіанті здійснення варіабельні домени з'єднують через лінкерну послідовність. Переважно, з'єднують два варіабельних домени. Також можна з'єднувати три або більше варіабельних доменів напряму або через лінкерну послідовність. Варіабельні домени можуть зв'язуватися з одним і тим же антигеном або можуть зв'язуватися з різними антигенами. Молекули DVD-Ig за винаходом можуть включати один варіабельний домен імуноглобуліну і один неімуноглобуліновий варіабельний домен, такий як лігандзв'язувальний домен рецептора, активний домен ферменту. Молекули DVD-Ig також можуть містити 2 або більше не-Ig доменів.

Послідовність лінкера може являти собою одну амінокислоту або поліпептидну послідовність. Приклади послідовностей лінкера, які можна використовувати в конструюванні і одержанні зв'язувальних білків DVD-Ig, застосовних в способах і композиціях, представлених в рамках винаходу, включають, як необмежувальні приклади, AKTTPKLEEGEFSEAR (SEQ ID NO:59), AKTTPKLEEGEFSEARV (SEQ ID NO:60), AKTTPKLGG (SEQ ID NO:61), SAKTTPKLGG (SEQ ID NO:62), SAKTTP (SEQ ID NO:63), RADAAP (SEQ ID NO:64), RADAAPTVS (SEQ ID NO:65), RADAAAAGGPGS (SEQ ID NO:66), RADAAA(G4S)4 (SEQ ID NO:67), SAKTTPKLEEGEFSEARV (SEQ ID NO:68), ADAAP (SEQ ID NO:69), ADAAPTVSIFPP (SEQ ID NO:70), TVAAP (SEQ ID NO:71), TVAAPSVFIFPP (SEQ ID NO:72), QPKAAP (SEQ ID NO:73), QPKAAPSVTLFPP (SEQ ID NO:74), AKTTPP (SEQ ID NO:75), AKTTPPSVTPLAP (SEQ ID NO:76), AKTTAP (SEQ ID NO:77), AKTTAPSVYPLAP (SEQ ID NO:78), ASTKGP (SEQ ID NO:79), ASTKGPSVFPLAP (SEQ ID NO:80), GSGSGGGSG (SEQ ID NO:81), GGGSGGGSGSGGGGS (SEQ ID NO:82), GENKVEYAPALMALS (SEQ ID NO:83), GPAKELTPLKEAKVS (SEQ ID NO:84), GHEAAVMQVQYPAS (SEQ ID NO:85), TVAAPSVFIFPPTVAAPSVFIFPP (SEQ ID NO:86) і ASTKGPSVFPLAP (SEQ ID NO:87). Вибір послідовностей лінкерів оснований на аналізі кристалічної структури декількох молекул Fab. Між варіабельним доменом і константним доменом СН1/CL в молекулярній структурі Fab або антитіла існує природне гнучке з'єднання. Це природне з'єднання містить приблизно 10-12 амінокислотних залишків, представлених 4-6 залишками з С-кінця V-домени і 4-6 залишками з N-кінця домену CL/CH1. У варіанті здійснення молекулу DVD-Ig, застосовну у винаході, одержують з використанням 5-6 N-кінцевих амінокислотних залишків або 11-12 амінокислотних залишків CL або СН1 як лінкера в легкому і важкому ланцюгах молекули DVD-Ig, відповідно. N-кінцеві залишки доменів CL або СН1, зокрема перші 5-6 амінокислотних залишків, приймають конформацію петлі без стійких вторинних структур і, таким чином, можуть діяти як гнучкі лінкери між двома варіабельними

доменами. N-кінцеві залишки доменів CL або CH1 є природними продовженнями варіабельних доменів, оскільки вони є частиною послідовностей імуноглобулінів, і, таким чином, значною мірою мінімізують будь-яку імуногенність, потенційно виникаючу через лінкери і з'єднання.

Інші послідовності лінкерів можуть включати будь-яку послідовність будь-якої довжини з домену CL/CH1, але не всі залишки домену CL/CH1, наприклад перші 5-12 амінокислотних залишків доменів CL/CH1, лінкери легкого ланцюга можна одержувати з Ск або СЛ, і лінкери важкого ланцюга можна одержувати з СН1 будь-яких ізотипів, включаючи С_γ1, С_γ2, С_γ3, С_γ4, С_α1, С_α2, С_δ, С_ε і С_μ. Послідовності лінкерів також можна одержувати з інших білків, таких як Ig-подібні білки (наприклад, TCR, FcR, KIR), послідовностей на основі G/S (наприклад, повтори G4S (SEQ ID NO:88)), послідовностей на основі шарнірної області і інших природних послідовностей з інших білків.

У варіанті здійснення константний домен з'єднують з двома з'єднуваними варіабельними доменами з використанням способів рекомбінантної ДНК. Переважно, послідовність, що містить з'єднувані варіабельні домени важкого ланцюга, з'єднують з константним доменом важкого ланцюга і послідовність, що містить з'єднувані варіабельні домени легкого ланцюга, з'єднують з константним доменом легкого ланцюга. Переважно, константні домени є константним доменом важкого ланцюга людини і константним доменом легкого ланцюга людини, відповідно, якщо зв'язувальний білок DVD-Ig підлягає використанню у людини. Переважно, важкий ланцюг DVD-Ig додатково з'єднують з Fc-областю. Fc-область може бути нативною послідовністю Fc-області або варіантом Fc-області. Найбільш переважно, Fc-область є Fc-областю людини. У переважному варіанті здійснення Fc-область включає Fc-область IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgE або IgD.

У варіанті здійснення два поліпептиди важкого ланцюга DVD-Ig і два поліпептиди легкого ланцюга DVD-Ig комбінують для утворення молекули DVD-Ig. Існує докладний опис прикладів конкретних молекул DVD-Ig, здатних зв'язуватися з конкретними мішенями, і способів їх одержання. Див., наприклад, публікацію PCT № WO 2007/024715.

С. Одержання зв'язувальних білків DVD-Ig

Білки DVD-Ig, що зв'язуються з IL-1 α і IL-1 β і застосовні в способах і композиціях, представлених в рамках винаходу для лікування остеоартриту, можна одержувати будь-яким з ряду способів, відомих в цій галузі. Див., наприклад, публікацію PCT № 2007/024715. Наприклад, експресія з клітин-хазяїнів, де експресуючі вектори, кодуєчі важкі і легкі ланцюги DVD-Ig, трансфікують в клітину-хазяїна стандартними способами. Різні форми терміна "трансфекція" призначені для включення широкого спектра способів, загальноновживаних для введення екзогенної ДНК в прокаріотичну або еукаріотичну клітину-хазяїна, наприклад електропорації, осадження фосфатом кальцію, трансфекції DEAE-декстраном і т. п. Хоч можна експресувати зв'язувальні білки DVD-Ig в прокаріотичних або еукаріотичних клітинах-хазяїнах, експресія білків DVD-Ig в еукаріотичних клітинах є переважною і найбільш переважною в клітинах-хазяїнах ссавців, оскільки такі еукаріотичні клітини (зокрема, клітини ссавців) більш ймовірно, ніж прокаріотичні клітини, будуть збирати і секретувати правильно згорнений і імунологічно активний білок DVD-Ig.

Переважно клітини-хазяїни ссавців для експресії рекомбінантних антитіл за винаходом включають клітини китайського хом'яка (клітини CHO) (включаючи клітини dhfr-CHO, описувані Urlaub і Chasin (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216-4220, використовувані з селективним маркером DHFR, наприклад, як описано в Kaufman R.J. and Sharp P.A. (1982) Mol. Biol. 159:601-621), мієломні клітини NS0, клітини COS і клітин SP2. Якщо рекомбінантні експресуючі вектори, кодуєчі білки DVD-Ig, вбудовують в клітини-хазяїни ссавців, білки DVD-Ig одержують культивуванням клітин-хазяїнів протягом періоду часу, достатнього, щоб зробити можливою експресію білків DVD-Ig в клітинах-хазяїнах або, більш переважно, секрецію білків DVD-Ig в середовище для культивування, в якому вирощують клітини-хазяїни. Білки DVD-Ig можна виділяти з середовища для культивування з використанням стандартних способів очищення білка.

У переважній системі для рекомбінантної експресії білків DVD-Ig, застосовних у винаході, рекомбінантний експресуючий вектор, кодуєчий і важкий ланцюг DVD-Ig, і легкий ланцюг DVD-Ig, вбудовують в клітини dhfr-CHO за допомогою опосередкованої фосфатом кальцію трансфекції. У рекомбінантному експресуючому векторі кожний з генів важкого і легкого ланцюгів DVD-Ig функціонально зв'язаний з регуляторними елементами енхансером CMV/промотором AdMLP для запуску високих рівнів транскрипції генів. Рекомбінантний експресуючий вектор також несе ген DHFR, що робить можливою селекцію клітин CHO, трансфікованих з використанням вектора за допомогою селекції/ампліфікації метотрексатом. Селектовані трансформовані клітини-хазяїни культивують, роблячи можливою експресію

важких і легких ланцюгів DVD-Ig, і виділяють інтактний білок DVD-Ig з середовища для культивування. Використовують стандартні способи молекулярної біології для одержання рекомбінантного експресуючого вектора, трансфекції клітин-хазяїнів, селекції трансформантів, культивування клітин-хазяїнів і виділення білка DVD-Ig з середовища для культивування. Крім того, винахід стосується способу синтезу білка DVD-Ig за винаходом за допомогою культивування клітини-хазяїна за винаходом у придатному середовищі для культивування, поки не синтезується білок DVD-Ig за винаходом. Спосіб може додатково включати виділення білка DVD-Ig з середовища для культивування.

Важливою властивістю зв'язувального білка DVD-Ig є те, що його можна одержувати і очищати аналогічно загальноприйнятому антитілу. Одержання зв'язувального білка DVD-Ig приводить до гомогенного, одного основного продукту з бажаною подвійною специфічною активністю без якої-небудь модифікації послідовності константної області або хімічних модифікацій будь-якого типу. Інші описувані раніше способи одержання "біспецифічних", "поліспецифічних" і "поліспецифічних полівалентних" повнорозмірних зв'язувальних білків не приводять до одного основного продукту, але, фактично, приводять до внутрішньоклітинної продукції або секреції суміші зібраних неактивних, моноспецифічних, поліспецифічних, полівалентних, повнорозмірних зв'язувальних білків і полівалентних повнорозмірних зв'язувальних білків з комбінацією різних ділянок зв'язування. Наприклад, на основі конструювання, описуваного Miller і Presta (публікація PCT № WO2001/077342), існує 16 можливих комбінацій важких і легких ланцюгів. Таким чином, тільки 6,25% білка, ймовірно, знаходиться в бажаній активній формі. Досі не продемонстроване відділення повністю активних форм білка від неактивних і частково активних форм білка з використанням стандартних способів хроматографії, як правило, використовуваних у великомасштабному виробництві.

Несподівано, конструювання зв'язувальних білків DVD-Ig, що є "полівалентними повнорозмірними зв'язувальними білками з подвійною специфічністю", приводить до одержання легкого ланцюга з подвійним варіабельним доменом і важкого ланцюга з подвійним варіабельним доменом, що збираються, головним чином, в бажаний "полівалентний повнорозмірний зв'язувальний білок з подвійною специфічністю", тобто функціональний зв'язувальний білок DVD-Ig. Див., публікацію PCT № WO 2007/024715.

II. Кристалічні і дериватизовані зв'язувальні білки

Винахід включає способи і композиції для лікування остеоартриту, де зв'язувальний білок є кристалом. У варіанті здійснення кристалізований зв'язувальний білок має більший час напівжиття *in vivo*, ніж розчинний варіант зв'язувального білка. У іншому варіанті здійснення зв'язувальний білок зберігає біологічну активність після кристалізації.

Кристалізовані зв'язувальні білки, застосовні у винаході, можна одержувати відомими в цій галузі способами і як описують в публікації PCT № WO 02072636, включеній в даний опис як посилання.

У іншому варіанті здійснення винаходу використовують глікозилований зв'язувальний білок, де зв'язувальний білок або його антигензв'язувальна частина містить один або декілька вуглеводних залишків. Білковий продукт, що утворюється *in vivo*, може піддаватися подальшому процесингу, відомому як посттрансляційна модифікація. Зокрема, залишки цукру (глікозили) можуть додаватися ферментативно в процесі, відомому як глікозилювання. Одержувані білки, що несуть ковалентно зв'язані олігосахаридні бічні ланцюги, відомі як глікозиловані білки або глікопротеїни. Антитіла є глікопротеїнами з одним або декількома вуглеводними залишками в Fc-домені, а також варіабельному домені. Вуглеводні залишки в Fc-домені надають важливий ефект на ефекторну функцію Fc-домену з мінімальним ефектом на зв'язування антигену або час напівжиття антитіла (Jefferis (2005) *Biotechnol. Prog.* 21:11-16). Навпаки, глікозилювання варіабельного домену може надавати ефект на антигензв'язувальну активність антитіла. Глікозилювання у варіабельному домені може надавати негативний ефект на афінність зв'язування антитіла, ймовірно, внаслідок стеричної невідповідності (Co et al. (1993) *Mol. Immunol.* 30:1361-1367) або приводити до підвищення афінності до антигену (Wallick et al. (1998) *Exp. Med.* 168:1099-1109, Wright et al. (1991) *EMBO J.* 10:2717-2723).

Також можна одержувати мутантів по ділянці глікозилювання, в яких O- або N-зв'язана ділянка глікозилювання зв'язувального білка є мутантною. Фахівець в цій галузі може одержувати таких мутантів з використанням стандартних способів. Мутантів по ділянці глікозилювання, що зберігають біологічну активність але мають підвищену або знижену активність зв'язування, також можна використовувати в способах і композиціях, представлених в рамках винаходу для лікування остеоартриту.

Можна модифікувати глікозилювання зв'язувального білка або його антигензв'язувальної частини, застосовних в способах і композиціях за винаходом. Наприклад, можна одержувати

аглікозиловане антитіло (тобто антитіло без глікозилювання). Глікозилювання можна змінювати, наприклад, для підвищення афінності антитіла до антигену. Такі модифікації вуглеводів можна здійснювати, наприклад, змінюючи одну або декілька ділянок глікозилювання в послідовності антитіла. Наприклад, можна робити одну або декілька заміни амінокислот, що приводять до усунення однієї або декількох ділянок глікозилювання у варіабельній області, таким чином, усуваючи глікозилювання в цій ділянці. Таке аглікозилювання може підвищувати афінність антитіла до антигену. Такий підхід детально описують в публікації РСТ № WO 2003/016466 і патентах США №№ 5714350 і 6350861.

Додатково або альтернативно, можна одержувати модифікований зв'язувальний білок, застосовний у винаході, із зміненим типом глікозилювання, такий як гіпофукозиловане антитіло зі зниженою кількістю фукозильних залишків або антитіло з підвищенням структур з бісектним GlcNAc. Показано, що такі змінені профілі глікозилювання підвищують здатність антитіл до ADCC. Такі модифікації вуглеводів можна здійснювати, наприклад, експресуючи зв'язувальний білок в клітині-хазяїні із зміненим механізмом глікозилювання. Клітини із зміненим механізмом глікозилювання описані в цій галузі і їх можна використовувати як клітини-хазяїни, в яких експресують рекомбінантні антитіла за винаходом, таким чином, одержуючи антитіло із зміненим глікозилюванням. Див., наприклад, Shields et al. (2002) J. Biol. Chem. 277:26733-26740; Umana et al. (1999) Nat. Biotech. 17:176-181, а також європейський патент № EP 1176195 і публікації РСТ №№ WO 03/035835 і WO 99/5434280.

Глікозилювання білка залежить від амінокислотної послідовності білка, що представляє інтерес, а також клітини-хазяїна, в якій експресують білок. Різні організми можуть продукувати різні ферменти глікозилювання (наприклад, глікозилтрансферази і глікозидази) і мати різні доступні субстрати (цукри нуклеотидів). Внаслідок таких факторів, профіль глікозилювання білка і композиція глікозильних залишків можуть відрізнятися залежно від системи хазяїна, в якій експресують конкретний білок. Глікозильні залишки зв'язувального білка, застосовного у винаході, можуть включати, як необмежувальні приклади, глюкозу, галактозу, манозу, фукозу, n-ацетилглюкозамін і сіалову кислоту. Переважно, глікозилований зв'язувальний білок містить глікозильні залишки таким чином, що профіль глікозилювання є профілем людини.

Фахівцям в цій галузі відомо, що різне глікозилювання білків може приводити до різних властивостей білка. Наприклад, ефективність терапевтичного білка, продукovanого мікроорганізмом-хазяїном, таким як дріжджі, і глікозилованого з використанням ендогенного шляху дріжджів, може бути нижчою, ніж ефективність того ж, експресованого в клітині ссавця, наприклад клітинній лінії CHO. Такі глікопротеїни також можуть бути імуногенними для людини і демонструвати знижений час напівжиття in vivo після введення. Конкретні рецептори у людини і інших тварин можуть розпізнавати конкретні глікозильні залишки і сприяти швидкому виведенню білка з кровотоку. Інші побічні ефекти можуть включати зміни фолдингу білка, розчинності, схильності до впливу протеаз, міграції, транспорту, компартменталізації, секреції, розпізнавання іншими білками або факторами, антигенності або алергенності. Таким чином, практикуючий фахівець може віддавати перевагу терапевтичному білку з конкретною композицією і профілем глікозилювання, наприклад композицією і профілем глікозилювання, ідентичними або щонайменше аналогічними таким в клітинах людини або у видоспецифічних клітинах передбачуваної досліджуваної тварини.

Експресії глікозилованих білків, відмінних від таких клітини-хазяїна, можна досягати генетичною модифікацією клітини-хазяїна для експресії гетерологічних ферментів глікозилювання. З застосуванням відомих в цій галузі способів практикуючий фахівець може одержувати антитіла або їх антигензв'язувальні частини, що виявляють профіль глікозилювання білка людини. Наприклад, штами дріжджів генетично модифікували для експресії неприродних ферментів глікозилювання таким чином, що глікозиловані білки (глікопротеїни), продукovanі в цих штаммах дріжджів, виявляють глікозилювання білка, ідентичне такому в клітинах тварин, особливо клітинах людини (патентні публікації США №№ 2004/0018590 і 2002/0137134 і публікація РСТ № WO 2005/100584).

Крім того, фахівцю в цій галузі потрібно розуміти, що білок, що представляє інтерес, можна експресувати з використанням бібліотеки клітин-хазяїнів, генетично сконструйованих для експресії різних ферментів глікозилювання, таким чином, що член бібліотеки клітин-хазяїнів продукує білок, що представляє інтерес, з варіантами профілів глікозилювання. Потім практикуючий фахівець може вибирати і виділяти білок, що представляє інтерес, з конкретними новими профілями глікозилювання. Переважно, білок, що має конкретний вибраний новий профіль глікозилювання, виявляє поліпшені або змінені біологічні властивості.

III. Фармацевтичні композиції

У способах за винаходом використовують фармацевтичні композиції для лікування остеоартриту або болю у індивідуума, які містять один або декілька зв'язувальних білків, що зв'язуються з IL-1 α і/або IL-1 β . Такі композиції також можуть містити фармацевтично прийнятний носій, розріджувач і/або ексципієнт або будь-які інші сполуки, що надають бажаний терапевтичний, фармацевтичний або фармакологічний сприятливий ефект на композицію, інший, ніж активність одного або декількох зв'язувальних білків по зв'язуванню IL-1 α і/або IL-1 β . У варіанті здійснення композиція за винаходом, застосовна в лікуванні остеоартриту або болю у індивідуума, містить зв'язувальний білок, що зв'язується з IL-1 α , наприклад антитіло до IL-1 α , і зв'язувальний білок, що зв'язується з IL-1 β , такий як антитіло до IL-1 β , або зв'язувальний білок, що зв'язується з IL-1 α , і з IL-1 β , такий як зв'язувальний білок DVD-Ig до IL-1 α/β .

Зв'язувальні білки, застосовні в способах за винаходом, можна включати в фармацевтичні композиції, придатні для введення індивідууму. Як правило, фармацевтична композиція містить один або декілька зв'язувальних білків, що зв'язуються з IL-1 α і/або IL-1 β , і фармацевтично прийнятний носій. У рамках винаходу "фармацевтично прийнятний носій" в широкому розумінні включає будь-який і всі розчинники, диспергуючі середовища, покриття, антибактеріальні і протигрибкові засоби, ізотонічні і уповільнюючі абсорбцію засоби і т. п., що є фізіологічно прийнятними. Приклади фармацевтично прийнятних носіїв включають один або декілька з води, фізіологічного розчину, фосфатно-сольового буфера, декстрази, гліцерину, етанолу і т. п., а також їх комбінації. У багатьох випадках переважно включати в композицію ізотонічний засіб, наприклад цукор, поліспирт (наприклад, маніт або сорбіт) або хлорид натрію. Фармацевтично прийнятні носії додатково можуть містити незначні кількості допоміжних засобів, таких як зволожувачі або емульгатори, консерванти або буфери, які підвищують термін зберігання або ефективність антитіла або частини антитіла.

Відомі різні системи доставки і їх можна використовувати для введення одного або декількох зв'язувальних білків, застосовних у винаході, або комбінації одного або декількох зв'язувальних білків і профілактичного засобу або іншого терапевтичного засобу, застосовного для профілактики, лікування або поліпшення остеоартриту або болю у індивідуума, наприклад інкапсуляція в ліпосомах, мікрочастинки, мікрокапсули, рекомбінантні клітини, здатні експресувати зв'язувальний білок або фрагмент, і рецептор-опосередкований 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 індивідууму зв'язувального білка, що зв'язується з IL-1 α і/або IL-1 β , включають, як необмежувальні приклади, парентеральне введення (наприклад, внутрішньошкірне, внутрішньом'язове, інтраперитонеальне, внутрішньовенне і підшкірне), епідуральне введення, внутрішньопухлинне введення і введення в слизові оболонки (наприклад, інтраназальним і пероральним шляхами). Крім того, можна використовувати легеневе введення, наприклад, з використанням інгалятора або небулайзера, і склад з аерозольним засобом. Див., наприклад, патенти США №№ 6019968, 5985320, 5985309, 5934272, 5874064, 5855913 і 5290540 і публікації РСТ №№ WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346 і WO 99/66903. У одному з варіантів здійснення зв'язувальний білок, застосовний у винаході, вводять з використанням технології легеневої доставки лікарських засобів Alkermes AIR® (Alkermes, Inc., Cambridge, Mass.). У конкретному варіанті здійснення зв'язувальний білок, застосовний у винаході, вводять внутрішньом'язово, внутрішньовенно, внутрішньопухлинно, перорально, інтраназально, легенево або підшкірно. Зв'язувальний білок можна вводити загальноприйнятим способом, наприклад, за допомогою вливання або болюсної ін'єкції, за допомогою абсорбції через епітелій і слизові оболонки (наприклад, слизову оболонку ротової порожнини, слизову оболонку прямої кишки і шлунково-кишкового тракту і т. д.), і його можна вводити разом з іншими біологічно активними засобами. Введення може бути системним або місцевим.

У конкретному варіанті здійснення, бажаним може бути місцеве введення зв'язувального білка в потребує лікування область, наприклад напряду в область суглоба. Цього можна досягати, як необмежувальні приклади, за допомогою місцевого вливання, ін'єкції або імплантата, де імплантат є пористим або непористим матеріалом, включаючи мембрани і матриці, такі як силіконові мембрани, полімери, волокнисті матриці (наприклад, Tissuel®) або колагенові матриці. У варіанті здійснення ефективну кількість одного або декількох зв'язувальних білків вводять місцево в уражений суглоб для лікування, поліпшення і/або профілактики подальшого прогресування дегенерації хряща, як в іншому випадку відбувається при остеоартриті, включаючи біль. У іншому варіанті здійснення, ефективну кількість одного або декількох зв'язувальних білків вводять місцево в пошкоджений суглоб в комбінації з ефективною кількістю одного або декількох інших терапевтичних засобів (наприклад, одного або декількох профілактичних або терапевтичних засобів), інших, ніж зв'язувальні білки, для профілактики,

лікування і/або поліпшення остеоартриту або одного або декількох його симптомів, включаючи біль.

У іншому варіанті здійснення, білки, що зв'язуються з IL-1 α і IL-1 β , можна доставляти в системі з контрольованим вивільненням або уповільненим вивільненням. У одному з варіантів здійснення для досягнення контрольованого або уповільненого вивільнення можна використовувати помпу (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 зв'язувальних білків, застосованих у винаході, 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; дивись також 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, які можна використовувати в складах з уповільненим вивільненням, включають, як необмежувальні приклади, полі(2-гідроксіетилметакрилат), полі(метилметакрилат), полі(акрилову кислоту), співполімери етилену і вінілацетату, полі(метакрилову кислоту), полігліколіди (PLG), поліангідриди, полі(N-вінілпіролідон), полі(вініловий спирт), поліакриламід, полі(етиленгліколь), полілактиди (PLA), співполімери молочної і гліколевої кислот (PLGA) і складні поліортоєфіри. У варіанті здійснення полімер, використовуваний в складі з уповільненим вивільненням, є інертним, не містить домішки, що вимиваються, стабільним при зберіганні, стерильним і біодеградує. У ще одному варіанті здійснення системи для контрольованого або уповільненого вивільнення можна поміщати поблизу профілактичної або терапевтичної мішені, таким чином, потрібна тільки фракція системної дози (див., наприклад, Goodson J.M., Chapter 6, *In Medical Applications of Controlled release*, Vol. II, Applications and Evaluation (Langer and Wise, eds.) (CRC Press, Inc., Boca Raton, 1984), pp. 115-138).

Системи для контрольованого вивільнення обговорюють в огляді Langer, *Science*, 249:1527-1533 (1990). Можна використовувати будь-який спосіб, відомий фахівцю в цій галузі, для одержання складів з уповільненим вивільненням, що містять один або декілька терапевтичних засобів за винаходом. Див., наприклад, патент США № 4526938, публікації PCT №№ WO 91/05548 і WO 96/20698; 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, застосовна у винаході, є нуклеїноювою кислотою, кодуною білок, що зв'язується з IL-1 α і/або IL-1 β , нуклеїнову кислоту можна вводити *in vivo* для посилення експресії кодованого нею профілактичного або терапевтичного засобу, конструюючи її як частину відповідного експресуючого нуклеїнову кислоту вектора і вводячи її таким чином, що вона стає внутрішньоклітинною, наприклад, з використанням ретровірусного вектора (див., наприклад, патент США № 4980286), або за допомогою прямої ін'єкції, або з використанням бомбардування мікрочастинками (наприклад, "генної гармати"; Biolistic, DuPont), або покриваючи ліпідами або рецепторами поверхні клітини, або засобами для трансфекції, або вводячи її сполученою з гомеобоксоподібним пептидом, який, як відомо, проникає в ядро (див., наприклад, Joliot et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:1864-1868). Альтернативно, нуклеїнову кислоту можна вводити внутрішньоклітинно і вбудовувати в ДНК клітини-хазяїна для експресії за допомогою гомологічної рекомбінації.

Фармацевтичну композицію, застосовну у винаході, для лікування остеоартриту або болю складають сумісною з передбачуваним шляхом її введення. Приклади шляхів введення включають, як необмежувальні приклади, парентеральне, наприклад внутрішньовенне, внутрішньошкірне, підшкірне, пероральне, інтраназальне (наприклад, інгаляцію), трансдермальне (наприклад, місцеве), трансмукозальне і ректальне введення. У конкретному варіанті здійснення композицію складають загальноприйнятими способами як фармацевтичну композицію, адаптовану для внутрішньовенного, підшкірного, внутрішньом'язового, перорального, інтраназального або місцевого введення людині. Як правило, композиції для внутрішньовенного введення є розчинами в стерильному ізотонічному водному буфері. За необхідності, композиція також може включати солубілізатор і місцевий анестетик, такий як лігнокаїн, для полегшення болю в ділянці ін'єкції.

Якщо композиції, застосовні у винаході, для лікування остеоартриту або болю підлягають місцевому введенню, композиції можна складати у формі мазі, крему, трансдермального

пластиру, лосьйону, гелю, шампуню, спрею, аерозолю, розчину, емульсії або у іншій формі, добре відомій фахівцю в цій галузі. Див., наприклад, Remington's Pharmaceutical Sciences and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 19th ed. (Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania, 1995). У випадку нерозпилюваних місцевих лікарських форм, як правило, використовують форми від в'язких до напівтвердих або твердих, що містять носій або один або декілька ексципієнтів, які сумісні з місцевим застосуванням і мають динамічну в'язкість, переважно вище ніж у воді. Інші придатні склади включають, як необмежувальні приклади, суспензії, порошки, лініменти, мазі і т. п. У варіанті здійснення такі склади стерилізують або змішують з допоміжними засобами (наприклад, консервантами, стабілізаторами, зволожувачами, буферами або солями) для впливу на різні їх властивості, такі як, наприклад, осмотичний тиск. Інші придатні місцеві лікарські форми включають розпилювані аерозольні препарати, де активний інгредієнт, наприклад, в комбінації з твердим або рідким інертним носієм, упаковують в суміші з легкою речовиною під тиском (наприклад, газоподібним пропелентом, таким як FREON®) або в м'якому бутлі. При бажанні в фармацевтичні композиції і лікарські форми також можна додавати зволожувачі. Приклади таких додаткових інгредієнтів добре відомі в цій галузі.

Якщо спосіб за винаходом для лікування остеоартриту або болю включає інтраназальне введення композиції, її можна складати в формі аерозолю, спрею або у формі крапель. Зокрема, зв'язувальний білок для застосування за даним винаходом загальноприйнято можна доставляти у формі аерозольного спрею в упаковках під тиском або небулайзері з використанням придатного пропеленту (наприклад, дихлордифторметану, трихлорфторметану, дихлортетрафторетану, діоксиду вуглецю або іншого придатного газу). У випадку аерозолю під тиском одиницю дозування можна визначати за допомогою клапана для доставки відміряної кількості. Капсули і картриджі (наприклад, що складаються з желатину) для застосування в інгаляторі або інсуфляторі можна складати такими, що містять порошкову суміш сполуки і придатну порошкову основу, таку як лактоза або крохмаль.

Якщо спосіб за винаходом для лікування остеоартриту або болю включає пероральне введення, можна складати пероральну композицію у формі таблеток, капсул, крохмальних капсул, желатинових капсул, розчинів, суспензій і т. п. Таблетки або капсули можна одержувати загальноприйнятими способами з використанням фармацевтично прийнятних ексципієнтів, таких як зв'язувальні засоби (наприклад, прежелатинізований кукурудзяний крохмаль, полівінілпіролідон або гідроксипропілметилцелюлозу), наповнювачі (наприклад, лактозу, мікрокристалічну целюлозу або гідрофосфат кальцію), мастильні засоби (наприклад, стеарат магнію, тальк або діоксид кремнію), розпушувачі (наприклад, картопляний крохмаль або крохмальгліколят натрію) або зволожувачі (наприклад, лаурилсульфат натрію). Таблетки можна покривати способами, добре відомими в цій галузі. Рідкі препарати для перорального введення можна одержувати у формі, як необмежувальні приклади, розчинів, сиропів або суспензій або їх можна надавати як сухий продукт для розведення водою або іншим придатним розріджувачем перед використанням. Такі рідкі препарати можна одержувати загальноприйнятими способами з фармацевтично прийнятними добавками, такими як суспендуєчі засоби (наприклад, сорбітний сироп, похідні целюлози або гідрогенізовані харчові жири), емульгатори (наприклад, лецитин або глуміарабік), неводні розріджувачі (наприклад, мигдалева олія, масляні складні ефіри, етиловий спирт або фракціоновані рослинні олії) і консерванти (наприклад, метил або пропіл-р-гідроксibenзоати або сорбінову кислоту). За необхідності препарати також можуть містити буферні солі, ароматизатори, барвники і підсолоджувачі. Препарати для перорального введення можна відповідним чином складати для контрольованого вивільнення або уповільненого вивільнення зв'язувальних білків, застосовних у винаході, для лікування остеоартриту або болю.

Спосіб лікування остеоартриту або спосіб лікування болю за винаходом може включати легеневе введення композиції, яка складається з аерозольним засобом, наприклад, з використанням інгалятора або небулайзера. Див., наприклад, патенти США №№ 6019968, 5985320, 5985309, 5934272, 5874064, 5855913 і 5290540 і публікації PCT №№ WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346 і WO 99/66903. У конкретному варіанті здійснення зв'язувальний білок, що зв'язується з IL-1 α і/або IL-1 β , або комбінований терапевтичний засіб для лікування остеоартриту вводять з використанням технології легеневої доставки лікарського засобу Alkermes AIR® (Alkermes, Inc., Cambridge, Massachusetts).

Спосіб за винаходом може включати введення композиції, яка містить зв'язувальний білок, що зв'язується з IL-1 α і/або IL-1 β , що складається для парентерального введення за допомогою ін'єкції (наприклад, за допомогою болюсної ін'єкції або тривалого вливання). Склади для ін'єкції можуть знаходитися в стандартній лікарській формі (наприклад, в ампулах або в контейнерах для багаторазового прийому) з додаванням консерванту. Композиції можуть знаходитися в

таких формах, як суспензії, розчини або емульсії в масляних або водних розріджувачах і можуть містити допоміжні засоби, такі як суспендуючі, стабілізуючі і/або диспергуючі засоби. Альтернативно, зв'язувальний білок може знаходитися у формі порошку для розведення придатним розріджувачем (наприклад, стерильною водою без пірогенів) перед використанням.

5 Способи за винаходом додатково можуть включати введення композицій, що складаються як депо-препарати. Такі склади тривалої дії можна вводити за допомогою імплантації (наприклад, підшкірно або внутрішньом'язово) або внутрішньом'язової ін'єкції. Таким чином, наприклад, композиції можна складати з використанням придатних полімерних або гідрофобних матеріалів (наприклад, у вигляді емульсії у відповідному маслі) або іонообмінних смол або у вигляді важкорозчинних похідних (наприклад, у вигляді важкорозчинної солі).

10 Способи за винаходом включають введення композицій, що складаються в нейтральній або сольовій формі. Фармацевтично прийнятні солі включають солі, утворені з аніонами, такими як одержувані з соляної, фосфорної, оцтової, щавлевої, винної кислот і т. д., і солі, утворені з катіонами, такими як одержувані з гідроксидів натрію, калію, амонію, кальцію, заліза, ізопропіламіну, триетиламіну, 2-етиламіноетанолу, гістидину, прокаїну і т. д.

15 Як правило, інгредієнти композицій додають роздільно або змішують разом в стандартній лікарській формі, наприклад у вигляді ліофілізованого порошку або безводного концентрату, в герметично запаяному контейнері, такому як ампула або саше, з указанням кількості активного засобу. Якщо способом введення є вливання, композицію можна розподіляти в бутлі для інфузій, що містять стерильну фармацевтичної якості воду або фізіологічний розчин. Якщо способом введення є ін'єкція, можна надавати ампулу стерильної води для ін'єкції або фізіологічний розчин таким чином, що інгредієнти можна змішувати перед введенням.

20 Винахід також стосується одного або декількох зв'язувальних білків, що зв'язують IL-1 α і/або IL-1 β , або фармацевтичної композиції, що містить такі зв'язувальні білки, упакованої в герметично запаяний контейнер, такий як ампула або саше, з указанням кількості засобу. У варіанті здійснення один або декілька зв'язувальних білків, що зв'язуються з IL-1 α і/або IL-1 β , або фармацевтичну композицію, що містить такі зв'язувальні білки, постачають як стерилізований ліофілізований порошок або безводний концентрат в герметично запаяному контейнері і його можна розводити (наприклад, з використанням води або фізіологічного розчину) до придатної концентрації для введення індивідууму для лікування артриту або болю. У варіанті здійснення один або декілька зв'язувальних білків, що зв'язуються з IL-1 α і/або IL-1 β , або фармацевтичну композицію, що містить такі зв'язувальні білки, постачають як стерильний ліофілізований порошок в герметично запаяному контейнері при одиниці дозування 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 зв'язувальні білки або фармацевтичну композицію, що містить такі зв'язувальні білки, необхідно зберігати при температурі від приблизно 2°C до приблизно 8°C в тарі виготовлювача, і зв'язувальні білки або фармацевтичну композицію, що містить такі зв'язувальні білки, необхідно вводити протягом 1 тижня, протягом 5 днів, протягом 72 годин, протягом 48 годин, протягом 24 годин, протягом 12 годин, протягом 6 годин, протягом 5 годин, протягом 3 годин або протягом 1 години після розведення. У альтернативному варіанті здійснення один або декілька зв'язувальних білків, що зв'язуються з IL-1 α і/або IL-1 β , або фармацевтичну композицію, що містить такі зв'язувальні білки, постачають в рідкій формі в герметично запаяному контейнері, вказуючи кількість і концентрацію засобу. У варіанті здійснення рідку форму композиції, що вводиться, постачають в герметично запаяному контейнері при 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 необхідно зберігати при температурі від приблизно 2°C до приблизно 8°C в тарі виготовлювача.

25 Зв'язувальні білки, застосовні в способах і композиціях, представлених в рамках винаходу, можна включати в фармацевтичну композицію, придатну для парентерального введення. У одному з аспектів зв'язувальні білки будуть одержувати у вигляді ін'єктованого розчину, що містить від приблизно 0,1 мг/мл до приблизно 250 мг/мл антитіла. Ін'єктований розчин може складатися з рідкої або ліофілізованої лікарської форми в посудині з безбарвного або жовтого скла, ампулі або попередньо наповненому шприці. Буфер може являти собою від приблизно 1 мМ до приблизно 50 мМ L-гістидин (оптимально від приблизно 5 мМ до приблизно 10 мМ), при рН від приблизно 5,0 до приблизно 7,0 (оптимально приблизно рН 6,0). Інші придатні буфери

включають, як необмежувальні приклади, сукцинат натрію, цитрат натрію, фосфат натрію або фосфат калію. Хлорид натрію можна використовувати для модифікації токсичності розчину при концентрації від приблизно 0 до приблизно 300 мМ (оптимально приблизно 150 мМ для рідкої лікарської форми). У випадку ліофілізованої лікарської форми можна включати кріопротектори, в основному від приблизно 0% до приблизно 10% сахарози (оптимально від приблизно 0,5% до приблизно 1,0%). Інші придатні кріопротектори включають трегалозу і лактозу. У випадку ліофілізованої лікарської форми можна включати об'ємоутворювальні засоби, в основному від приблизно 1% до приблизно 10% маніту (оптимально від приблизно 2% до приблизно 4%). У рідких і ліофілізованих лікарських формах можна використовувати стабілізатори, в основному від приблизно 1 мМ до приблизно 50 мМ L-метіоніну (оптимально від приблизно 5 мМ до приблизно 10 мМ). Інші придатні об'ємоутворювальні засоби включають гліцин, аргінін, можна включати від приблизно 0% до приблизно 0,05% полісорбату-80 (оптимально від приблизно 0,005% до приблизно 0,01%). Додаткові поверхнево-активні речовини включають, як необмежувальні приклади, полісорбат-20 і поверхнево-активні речовини BRIJ.

Композиції, застосовні для лікування остеоартриту або болю за винаходом, можуть знаходитися в різних формах. Вони включають, наприклад, рідкі, напівтверді і тверді лікарські форми, такі як рідкі розчини (наприклад, розчини, що ін'єктуються і вливаються), дисперсії або суспензії, таблетки, пілюлі, порошки, ліпосоми і супозиторії. Конкретна форма залежить від передбачуваного способу введення і терапевтичного призначення. Типові композиції знаходяться у формі розчинів, що ін'єктуються і вливаються, таких як композиції, аналогічні використовуваним для пасивної імунізації людини з використанням антитіл. Спосіб введення є парентеральним (наприклад, внутрішньовенним, підшкірним, інтраперитонеальним, внутрішньом'язовим). У варіанті здійснення антитіло вводять внутрішньовенним вливанням або ін'єкцією. У іншому варіанті здійснення антитіло вводять внутрішньом'язовою або підшкірною ін'єкцією.

Терапевтичні композиції, як правило, повинні бути стерильними і стабільними в умовах виробництва і зберігання. Композицію можна складати у вигляді розчину, мікроемульсії, дисперсії, ліпосоми або іншої впорядкованої структури, придатної для високої концентрації лікарського засобу. Стерильні ін'єктовані розчини можна одержувати включенням активної сполуки (тобто антитіла або його антигензв'язувальної частини) в необхідній кількості у придатному розчиннику з одним або комбінацією вказаних вище інгредієнтів необхідним чином з подальшою стерилізацією фільтрацією. Як правило, дисперсії одержують включенням активної сполуки в стерильний розріджувач, що містить основне дисперсійне середовище і інші необхідні інгредієнти з вказаних вище. У випадку стерильних ліофілізованих порошків для одержання стерильних ін'єктованих розчинів прикладами способів одержання є вакуумне сушіння і сушіння розпиленням, за допомогою яких одержують порошок активного інгредієнта і будь-якого додаткового бажаного інгредієнта з його розчину, раніше стерилізованого фільтрацією. Можна підтримувати відповідну текучість розчину, наприклад, з використанням покриття, такого як лецитин, за допомогою підтримання необхідного розміру частинок у випадку дисперсії і з використанням поверхнево-активних речовин. Можна досягати пролонгованої абсорбції ін'єктованих композицій, включаючи в композицію засіб, що уповільнює абсорбцію, наприклад моностеаратні солі і желатин.

Зв'язувальні білки, застосовні для лікування остеоартриту або болю за винаходом, можна вводити множиною відомих в цій галузі способів, хоч прикладом шляху/способу введення є підшкірна ін'єкція, внутрішньовенна ін'єкція або вливання. Як буде зрозуміло фахівцям в цій галузі, шлях і/або спосіб введення буде варіюватися залежно від бажаних результатів. У деяких варіантах здійснення зв'язувальні білки можна одержувати з носієм, який буде захищати зв'язувальні білки від швидкого вивільнення, таким як склад з контрольованим вивільненням, включаючи імпланти, трансдермальні пластири і мікроінкапсульовані системи доставки. Можна використовувати біодеградовні, біосумісні полімери, такі як етиленвінілацетат, поліангідриди, полігліколева кислота, колаген, складні поліортоєфіри і полімолочна кислота. Багато які способи одержання таких складів запатентовані або, як правило, відомі фахівцям в цій галузі. Див., наприклад, Sustained and Controlled release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed. (Marcel Dekker, Inc., New York, 1978).

У деяких варіантах здійснення зв'язувальні білки, застосовні у винаході, можуть бути такими, що вводяться перорально, наприклад, з інертним розріджувачем або засвоюваним їстівним носієм. Зв'язувальні білки (і, при бажанні, інші інгредієнти) також можна поміщати в тверду або м'яку желатинову капсулу, пресувати в таблетки або напряму включати в раціон індивідуума. Для перорального терапевтичного введення сполуки можна включати з ексципієнтами і використовувати у формі проковтуваних таблеток, букальних таблеток,

пастилок, капсул, еліксирів, суспензій, сиропів, пластинок і т. п. Для введення сполуки за винаходом іншим способом, ніж парентеральне введення, необхідним може бути покриття сполуки або спільне введення сполуки з матеріалом для запобігання її інактивації.

У композиції також можна включати додаткові активні сполуки. У деяких варіантах здійснення зв'язувальний білок (наприклад, антитіло) або його антигензв'язувальну частину, застосовні у винаході, складають спільно і/або вводять спільно з одним або декількома додатковими терапевтичними засобами, застосовними для лікування остеоартриту або болю. Наприклад, зв'язувальний білок, що зв'язується з hIL-1 α і/або hIL-1 β , або його антигензв'язувальні частини можна складати спільно і/або вводити спільно з одним або декількома додатковими антитілами, що зв'язують інші мішені (наприклад, антитіла, що зв'язують інші цитокіни або зв'язують молекули поверхні клітини). Крім того, можна використовувати один або декілька зв'язувальних білків в комбінації з одним або декількома іншими терапевтичними засобами. У таких способах комбінованого лікування переважно можна використовувати менші дози терапевтичних засобів, що вводяться, таким чином, уникаючи можливих токсичностей або ускладнень, асоційованих з різними способами монотерапії.

У деяких варіантах здійснення білки, що зв'язують IL-1 α і/або IL-1 β , або їх зв'язувальну частину з'єднують з відомим в цій галузі розріджувачем, що підвищує час напівжиття. Такі розріджувачі включають, як необмежувальні приклади, Fc-домен, поліетиленгліколь і декстран. Такі розріджувачі описують, наприклад, в патенті США № 6660843.

У конкретному варіанті здійснення молекули нуклеїнової кислоти, що містять нуклеотидні послідовності, кодуючі один або декілька поліпептидів зв'язувального білка, вводять для лікування, профілактики або поліпшення остеоартриту за допомогою генотерапії. Генотерапія належить до терапії, здійснюваної за допомогою введення індивідууму експресованої нуклеїнової кислоти. У цьому варіанті здійснення винаходу за допомогою нуклеїнових кислот одержують кодовані ними зв'язувальні поліпептиди для зв'язувальних білків, що зв'язуються з IL-1 α і/або IL-1 β , і вони опосередковують профілактичний або терапевтичний ефект відносно остеоартриту або болю.

Будь-який зі способів генотерапії, доступних в цій галузі, можна використовувати за даним винаходом. Загальні огляди способів генотерапії див. в 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; Morgan and Anderson (1993) Ann. Rev. Biochem. 62:191-217; і Robinson C. (1993) Trends Biotechnol. 11(5):155. Способи, загальновідомі в галузі технології рекомбінантних ДНК, які можна використовувати, описують в Ausubel et al. (eds.) Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, New York, 1993); і Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual (Stockton Press, New York, 1990). Докладні описи різних способів генотерапії описують в публікації патентної заявки США № 2005/0042664.

Зв'язувальні білки, що зв'язують IL-1 α і/або IL-1 β , можна використовувати окремо або в комбінації з одним або декількома додатковими засобами, застосовними в лікуванні остеоартриту або болю. Наприклад, додатковий засіб може бути терапевтичним засобом, відомим в цій галузі як застосовний для лікування одного або декількох симптомів остеоартриту або для впливу на мішень, іншу, ніж IL-1, асоційовану з болем. Додатковий засіб також може бути засобом, що надає терапевтичній композиції корисну властивість, наприклад засобом, що впливає на в'язкість композиції, яка підлягає введенню індивідууму.

Також потрібно розуміти, що комбінації, які підлягають включенню в цей винахід, є комбінаціями, застосовними для свого передбачуваного призначення. Наведені нижче засоби призначені для ілюстрації цілей, але не для обмеження. Комбінації, що є частиною даного винаходу, можуть представляти зв'язувальні білки, що зв'язують IL-1 α і/або IL-1 β , і щонайменше один додатковий засіб, що забезпечує бажану властивість. Комбінація також може включати декілька додаткових засобів, наприклад два або три додаткових засоби, якщо комбінація є такою, що утворена композиція може виконувати свою передбачувану функцію. Переважні комбінації для лікування остеоартриту або болю включають нестероїдні протизапальні лікарські засоби, також позначувані як НПЗЗ, що включають лікарські засоби, подібні до ібупрофену. Іншими переважними комбінаціями є протизапальні засоби, включаючи кортикостероїди, такі як преднізолон; добре відомі побічні ефекти використання стероїдів можна знижувати або навіть усувати, впливаючи на дозу стероїдів, необхідну при лікуванні пацієнтів, в комбінації зі зв'язувальними білками, що зв'язують IL-1 α і/або IL-1 β . Необмежувальні приклади терапевтичних засобів для застосування в лікуванні індивідуума, страждаючого остеоартритом або болем, можуть включати, як необмежувальні приклади, один або декілька з: будезоніду, епідермального фактора росту, кортикостероїдів, циклоспорину, сульфасалазину, аміносаліцилатів, 6-меркаптопуринів, азатіоприну, метронідазолу, інгібіторів

ліпоксигенази, месалазину, олсалазину, балсалазиду, антиоксидантів, інгібіторів тромбоксану, антагоністів рецептора IL-1, моноклональних антитіл до IL-1 β , моноклональних антитіл до IL-6, факторів росту, інгібіторів еластаз, піридинілімідазольних сполук, антитіл до ФНП, LT, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-18, IL-23, ЕМАР-II, ГМ-КСФ, FGF і PDGF, антитіл до CD2, CD3, CD4, CD8, CD19, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD90 або їх лігандів, метотрексату, циклоспорину, FK506, рапаміцину, мікофеноляту мофетилу, лефлуноміду, НПЗЗ, ібупрофену, преднізолону, інгібіторів фосфодіестерази, агоністів аденозинових рецепторів, антитромботичних засобів, інгібіторів компонентів комплементу, адренергічних засобів, IRAK, NIK, IKK, p38, інгібіторів MAP-кіназ, інгібіторів IL-1 β -перетворювального ферменту, інгібіторів ФНП-перетворювального ферменту, інгібіторів передачі сигналу Т-клітин, інгібіторів металопротеїназ, інгібіторів ангіотензинперетворювального ферменту, розчинних рецепторів цитокіну, розчинного рецептора ФНП p55, розчинного рецептора ФНП p75, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R, протизапальних цитокінів, IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 і TGF β .

Фармацевтичні композиції за винаходом можуть включати "терапевтично ефективну кількість" або "профілактично ефективну кількість" одного або декількох зв'язувальних білків, що зв'язуються з IL-1 α і/або IL-1 β . "Терапевтично ефективна кількість" стосується кількості, ефективної в необхідних дозах і протягом необхідних періодів часу для досягнення бажаного терапевтичного результату. Терапевтично ефективну кількість зв'язувального білка може визначати фахівець в цій галузі і вона може варіювати відповідно до факторів, таких як стан захворювання, вік, стать і маса індивідуума, і здатності зв'язувального білка викликати бажану відповідь у індивідуума. Терапевтично ефективна кількість також є кількістю, при якій будь-які токсичні або шкідливі ефекти зв'язувальних білків або їх частин переважаються терапевтично позитивним впливом. "Профілактично ефективна кількість" стосується кількості, ефективної в необхідних дозах і протягом необхідних періодів часу для досягнення бажаного профілактичного результату, такого як профілактика подальшої дегенерації або втрати суглобового хряща в пошкоджені суглобі при остеоартриті або профілактика дебюту або інтенсифікації болю. Як правило, оскільки профілактичну дозу використовують у індивідуумів до розвитку захворювання або на ранній стадії захворювання, профілактично ефективна кількість буде меншою, ніж терапевтично ефективна кількість.

У варіанті здійснення винахід стосується способу лікування болю у індивідуума, де індивідуум страждає захворюванням або порушенням, асоційованим з накопиченням IL-1. Таке накопичення IL-1 у індивідуума може бути результатом зниженої експресії IL-1 або зниженого метаболізму IL-1. Накопичення IL-1 може відбуватися в крові (включаючи плазму, сироватку) або периферичних тканинах індивідуума.

У варіанті здійснення винахід стосується способу лікування болю у індивідуума, де індивідуум страждає захворюванням або порушенням, асоційованим з накопиченням IL-1.

У варіанті здійснення композиції і способи, представлені в рамках винаходу, можна використовувати для лікування болю у індивідуума, страждаючого захворюванням або порушенням, вибраним з групи, що включає остеоартрит, ревматоїдний артрит, ювенільний хронічний артрит, септичний артрит, артрит Лайма, псоріатичний артрит, реактивний артрит, спондилоартропатію, системний червоний вовчак, хворобу Крона, виразковий коліт, запальне захворювання кишечника, інсулінозалежний цукровий діабет, тиреоїдит, астму, алергічні захворювання, псоріаз, дерматит, склеродермію, реакцію "трансплантат проти хазяїна", відторгнення трансплантата органа, гостре або хронічне імунне захворювання, пов'язане з трансплантацією органа, саркоїдоз, атеросклероз, дисеміноване внутрішньосудинне згортання, синдром Кавасакі, хворобу Грейвса, нефротичний синдром, синдром хронічної втоми, гранулематоз Вегенера, пурпуру Шенлейна-Геноха, мікроскопічний васкуліт нирок, хронічний активний гепатит, увеїт, септичний шок, синдром токсичного шоку, сепсис, кахексію, інфекційні захворювання, паразитичні захворювання, гострий поперечний мієліт, хворобу Хантінгтона, хворобу Паркінсона, хворобу Альцгеймера, інсульт, первинний біліарний цироз, гемолітичну анемію, злоякісні новоутворення, серцеву недостатність, інфаркт міокарда, хворобу Аддісона, спорадичну полігландулярну недостатність типу I, полігландулярну недостатність типу II (синдром Шмідта), гострий респіраторний дистрес-синдром дорослих, алопецію, гніздову алопецію, серонегативну артропатію, артропатію, хворобу Рейтера, псоріатичну артропатію, артропатію при виразковому коліті, ентеропатичний синовіт, Chlamydia-асоційовану артропатію, Yersinia-асоційовану артропатію, Salmonella-асоційовану артропатію, спондилоартропатію, атероматозне захворювання/артеріосклероз, атопічну алергію, бульозні аутоімунні дерматози, звичайну пухирчатку, ексфоліативну пухирчатку, пемфігоїд, IgA-залежний лінійний дерматоз, аутоімунну гемолітичну анемію, гемолітичну анемію з позитивною реакцією Кумбса, набуту перніціозну анемію, ювенільну перніціозну анемію, міалгічний енцефаліт/синдром хронічної

втоми, хронічний кандидоз шкіри і слизових оболонок, гігантоклітинний артеріїт, первинний склерозуючий гепатит, криптогенний аутоімунний гепатит, синдром набутого імунodefіциту, пов'язані з синдромом набутого імунodefіциту захворювання, гепатит В, гепатит С, варіабельний імунodefіцит, що не класифікується (варіабельну гіпогаммаглобулінемію, що не класифікується), дилатаційну кардіоміопатію, жіночу безплідність, недостатність яєчників, передчасну недостатність яєчників, фіброз легень, криптогенний фіброзуючий альвеоліт, постзапальну інтерстиціальну хворобу легень, інтерстиціальний пневмоніт, інтерстиціальну хворобу легень, пов'язану з дифузною хворобою легень, інтерстиціальну хворобу легень, пов'язану зі змішаною хворобою сполучної тканини, інтерстиціальну хворобу легень, пов'язану з системною склеродермією, інтерстиціальну хворобу легень, пов'язану з ревматоїдним артритом, хворобу легень, пов'язану з системним червоним вовчаком, хворобу легень, пов'язану з дерматоміозитом/поліміозитом, хворобу легень, пов'язану з хворобою Шегрена, хворобу легень, пов'язану з анкілозуючим спондилітом, дифузну хворобу легень при васкулітах, хворобу легень, пов'язану з гемосидерозом, лікарську інтерстиціальну хворобу легень, фіброз, променевий фіброз, облітеруючий бронхіоліт, хронічну еозинофільну пневмонію, хворобу легень з лімфоцитарною інфільтрацією, постінфекційну інтерстиціальну хворобу легень, подагричний артрит, аутоімунний гепатит, аутоімунний гепатит типу 1 (класичний аутоімунний або вовчаковий гепатит), аутоімунний гепатит типу 2 (гепатит з антитілами до LKM), аутоімунну гіпоглікемію, резистентність до інсуліну типу В з акантозом, гіпопаратиреоз, гостре імунне захворювання, пов'язане з трансплантацією органів, хронічне імунне захворювання, пов'язане з трансплантацією органів, остеоартроз, первинний склерозуючий холангіт, псоріаз типу 1, псоріаз типу 2, ідіопатичну лейкопенію, аутоімунну нейтропенію, неуточнену нефропатію, гломерулонефрит, мікроскопічний васкуліт нирок, хворобу Лайма, дискоїдний червоний вовчак, ідіопатичну або неуточнену чоловічу безплідність, аутоімунну реакцію на сперму, розсіяний склероз (всі підтипи), симпатичну офтальмію, легенеvu гіпертензію, вторинну відносно хвороби сполучної тканини, синдром Гудпасчера, легенеvu вияв вузликowego періартеріїту, гостру ревматичну пропасницю, ревматоїдний спондиліт, хворобу Стілла, системну склеродермію, синдром Шегрена, синдром Такаясу/артеріїт, аутоімунну тромбоцитопенію, ідіопатичну тромбоцитопенію, аутоімунний тиреоїдит, гіпертиреоз, аутоімунний тиреоїдит (хворобу Хашимото), атрофічний аутоімунний гіпотиреоз, первинну мікседему, факогенний увеїт, первинний васкуліт, вітіліго, гостру печінкову недостатність, хронічні захворювання печінки, алкогольний цироз, алкогольне ураження печінки, холестаза, ідіосинкразичний гепатит, лікарський гепатит, неалкогольний стеатогепатит, алергію, інфекцію стрептококами групи В (GBS), психічні розлади (наприклад, депресію і шизофренію), Th2- і Th1-опосередковані захворювання, гострий і хронічний біль (різні форми болю), злоякісні новоутворення, такі як рак легень, молочної залози, шлунка, сечового міхура, товстого кишечника, підшлункової залози, яєчника, передміхурової залози і прямої кишки і гематопоетичні злоякісні новоутворення (лейкоз і лімфому), абеталіпопротеїнемію, акроціаноз, гострі і хронічні паразитичні або інфекційні процеси, гострий лейкоз, гострий лімфобластний лейкоз (ALL), гострий мієлолейкоз (AML), гостру або хронічну бактеріальну інфекцію, гострий панкреатит, гостру ниркову недостатність, аденокарциноми, передсердні ектопічні ритми, комплекс СНІД-деменція, алкогольний гепатит, алергічний кон'юнктивіт, алергічний контактний дерматит, алергічний риніт, відторгнення алотрансплантата, недостатність альфа-1-антитрипсину, бічний аміотрофічний склероз, анемію, стенокардію, дегенерацію клітин передніх рогів, терапію до CD3, антифосфоліпідний синдром, антирецепторні реакції гіперчутливості, аневризми аорти і периферичні аневризми, розшарування аорти, артеріальну гіпертензію, артеріосклероз, артеріовенозний анастомоз, атаксію, фібриляцію передсердь (тривалу або пароксизмальну), тріпотіння передсердь, атріовентрикулярну блокаду, В-клітинну лімфому, відторгнення кісткового трансплантата, відторгнення трансплантата кісткового мозку (ВМТ), блокаду ніжки пучка Гіса, лімфому Беркітта, опіки, серцеві аритмії, синдром зупинки серця, пухлини серця, кардіоміопатію, запальну відповідь на серцево-легенеvu шунтування, відторгнення трансплантата хряща, дегенерацію кори мозочка, мозочкові порушення, хаотичну або мультифокальну передсердну тахікардію, пов'язані з хіміотерапією порушення, хронічний мієлоцитарний лейкоз (СМЛ), хронічний алкоголізм, хронічні запальні захворювання, хронічний лімфоцитарний лейкоз (СLL), хронічну обструктивну хворобу легень (СOPD), хронічну інтоксикацію саліцилатами, колоректальну карциному, застійну серцеву недостатність, кон'юнктивіт, контактний дерматит, легенеvu серце, ішемічну хворобу легень, хворобу Крейтцфельда-Якоба, культурально-негативний сепсис, кістозний фіброз, порушення, пов'язані з терапією цитокінами, деменцією боксерів, демієлінізуючі захворювання, геморагічну пропасницю денге, дерматит, дерматологічні порушення, діабет, діабетичний артеріосклероз, деменцію з тільцями Леві, дилатаційну застійну кардіоміопатію,

порушення базальних гангліїв, синдром Дауна в зрілому віці, рухові порушення, що викликаються лікарськими засобами, що блокують допамінові рецептори в ЦНС, чутливість до лікарських засобів, екзему, енцефаломієліт, ендокардит, ендокринопатію, епіглотит, інфекцію вірусом Епштейна-Барре, еритро мелалгію, екстрапірамідні і мозочкові порушення, сімейний гемофагоцитарний лімфогістіоцитоз, відторгнення імплантата фетального тимуса, атаксію Фрідрейха, функціональні порушення периферичних артерій, грибовий сепсис, газову гангрену, виразку шлунка, гломерулонефрит, відторгнення трансплантата будь-якого органа або тканини, грамнегативний сепсис, грампозитивний сепсис, гранульоми внаслідок внутрішньоклітинних паразитів, волосатоклітинний лейкоз, хворобу Галлервордена-Шпатца, тиреоїдит Хашимото, поліноз, відторгнення трансплантата серця, гемохроматоз, гемодіаліз, гемолітичний уремичний синдром/тромболітичну тромбоцитопенічну пурпуру, геморагію, гепатит А, аритмії, пов'язані з порушеннями в пучку Гіса, інфекцію ВІЛ/нейропатію при ВІЛ, хворобу Ходжкіна, гіперкінетичні рухові порушення, реакції гіперчутливості, екзогенний алергічний альвеоліт, гіпертонічну хворобу, гіпокінетичні рухові порушення, оцінку функції гіпоталамо-гіпофізарно-наднирковозалозної осі, ідіопатичну хворобу Аддісона, ідіопатичний легеневий фіброз, антитіло-опосередковану цитотоксичність, астеноїю, спінально-м'язову атрофію дітей, запалення аорти, грип А, вплив іонізуючого випромінювання, іридоцикліт/uveїт/оптичний неврит, пошкодження при ішемії/реперфузії, ішемічний інсульт, ювенільний ревматоїдний артрит, ювенільну спінально-м'язову атрофію, саркому Капоші, відторгнення трансплантата нирки, легіонелу, лейшманіоз, проказу, ураження кортикоспінальної системи, ліпедему, відторгнення трансплантата печінки, лімфедему, малярію, злоякісну лімфому, злоякісний гістіоцитоз, злоякісну меланому, менінгіт, менінгококемію, метаболічну мігрень, ідіопатичну мігрень, мультисистемне мітохондріальне порушення, змішану хворобу сполучної тканини, моноклональну гаммопатію, множинну мієлому, мультисистемні дегенерації (синдром Менцеля, Дежерина-Томас, Шая-Дрейджера і Мачадо-Джозефа), міастенію, інфекцію комплексом *Mycobacterium avium* і *Mycobacterium intracellulare*, інфекцію *Mycobacterium tuberculosis*, мієлодиспластичний синдром, інфаркт міокарда, ішемічні порушення міокарда, назофарингеальну карциному, хронічні захворювання легень новонароджених, нефрит, нефроз, нейродегенеративні захворювання, неврогенні м'язові атрофії, нейтропенічну пропасницю, неходжкінську лімфому, оклюзію черевної аорти і її гілок, оклюзуючі захворювання артерій, терапію ОКТЗ®, орхіт/епідідиміт, орхіт/реверсивну вазектомію, органомегалію, остеопороз, відторгнення трансплантата підшлункової залози, карциному підшлункової залози, паранеопластичний синдром/гіперкальціємію при злоякісних новоутвореннях, відторгнення трансплантата паразитовидної залози, запальне захворювання тазових органів, цілорічний риніт, захворювання перикардія, атеросклеротичне ураження периферичних судин, порушення периферичних судин, перитоніт, перніціозну анемію, пневмоцистну пневмонію, пневмонію, синдром POEMS (полінейропатію, органомегалію, ендокринопатію, моноклональну гаммопатію і ураження шкіри), постперфузійний синдром, посткардіотомний синдром, прееклампсію, прогресуючий над'ядерний параліч, первинну легеневу гіпертензію, променеву терапію, феномен Рейно, хворобу Рейно, синдром Рефсума, тахікардію з широкими комплексами QRS, вазоренальну гіпертензію, реперфузійне пошкодження, рестриктивну кардіоміопатію, саркоми, сенільну хорею, сенільну деменцію з тільцями Леві, серонегативні артропатії, шок, серпоподібноклітинну анемію, відторгнення алотрансплантата шкіри, ураження шкіри, відторгнення трансплантата тонкого кишечника, солідні пухлини, специфічні аритмії, спінальну атаксію, спіноцеребелярну дегенерацію сітківки, стрептококовий міозит, структурні пошкодження мозочка, підгострий склерозуючий паненцефаліт, непритомність, сифіліс серцево-судинної системи, системну анафілаксію, синдром системної запальної відповіді, системну форму ювенільного ревматоїдного артрити, Т-клітинний або FAB ALL, телеангієктазію, облітеруючий тромбангіт, тромбоцитопенію, токсичність, трансплантати, травму/геморагію, реакції гіперчутливості типу III, гіперчутливість типу IV, нестабільну стенокардію, уремію, уросепсис, кропивницю, набуті вади серця, варикозне розширення вен, васкуліт, захворювання вен, тромбоз вен, фібриляцію шлуночків, вірусні і грибові інфекції, вірусний енцефаліт/асептичний менінгіт, асоційований з вірусом гемофагоцитарний синдром, синдром Верніке-Корсакова, хворобу Вільсона-Коновалова, відторгнення ксенотрансплантата будь-якого органа або тканини, гострий коронарний синдром, синдром Гієна-Барре, гостру ішемію, хворобу Стілла дорослих, гніздову алопецію, анафілаксію, антифосфоліпідний синдром, апластичну анемію, артеріосклероз, атопічну екзему, атопічний дерматит, аутоімунний дерматит, аутоімунне порушення, пов'язане зі стрептококовою інфекцією, аутоімунну ентеропатію, аутоімунну втрату слуху, аутоімунний лімфопроліферативний синдром (ALPS), аутоімунний міокардит, аутоімунну передчасну недостатність яєчників, блефарит, бронхоектатичну хворобу, бульозний пемфігоїд, серцево-

судинне захворювання, катастрофічний антифосфоліпідний синдром, глютену хворобу, шийний спондиліоз, хронічну ішемію, пемфігоїд, що рубцюється, клінічно ізольований синдром (CIS) з ризиком розсіяного склерозу, психічні порушення з початком в дитячому віці, хронічну обструктивну хворобу легень (COPD), дакриїстит, дерматоміозит, діабетичну ретинопатію, грижу міжхребетного диска, пролапс міжхребетного диска, лікарську гемолітичну анемію, ендокардит, ендометріоз, ендодальміт, епісклерит, мультиформну еритему, синдром Стівенса-Джонсона, гестаційний пемфігоїд, синдром Хьюза, ідіопатичну хворобу Паркінсона, ідіопатичну інтерстиціальну пневмонію, IgE-опосередковану алергію, імунну гемолітичну анемію, міозит з тільцями включення, інфекційне запальне захворювання очей, запальне демієлінізуюче захворювання, запальне захворювання серця, запальне захворювання нирок, IPF/UIP, ірит, кератит, сухий кератокон'юнктивіт, хворобу Куссмауля або хворобу Куссмауля-Мейєра, параліч Ландрі, лангергансоклітинний гістіоцитоз, сітчасте ліведо, дегенерацію жовтої плями, мікроскопічний поліангіїт, анкілозуючий спондилоартрит, порушення моторних нейронів, пемфігоїд слизових оболонок, поліорганну недостатність, мієлодиспластичний синдром, міокардит, порушення корінців нервів, нейропатію, не-А не-В гепатит, оптичний неврит, остеоліз, рак яєчників, поліарткулярний ювенільний ревматоїдний артрит, оклюзійну хворобу периферичних артерій (PAOD), хворобу периферичних судин (PVD), хворобу периферичних артерій (PAD), флебіт, вузликовий поліартеріїт (вузликовий періартеріїт), поліхондрит, ревматичну поліміалгію, поліоз, поліарткулярний JRA, синдром поліендокринної недостатності, поліміозит, ревматичну поліміалгію (PMR), постперфузійний синдром, первинний паркінсонізм, рак передміхурової залози і прямої кишки і гематопоетичні злоякісні новоутворення (лейкоз і лімфому), простатит, істинну еритроцитарну аплазію, первинну недостатність кори надниркових залоз, рецидивуючий оптикомієліт, рестеноз, ревматичну хворобу серця, SAPHO (синовіт, акне, пустульоз, гіперостоз і остит), вторинний амілоїдоз, шоківу легеню, склерит, ішіас, вторинну недостатність кори надниркових залоз, пов'язані з діоксидом кремнію захворювання сполучної тканини, дерматоз Снеддона-Уїлкінсона, анкілозуючий спондиліт, синдром Стівенса-Джонсона (SJS), синдром системної запальної відповіді, скроневиї артеріїт, токсоплазмозний ретиніт, синдром Лайєлла, поперечний мієліт, TRAPS (періодичний синдром, асоційований з рецептором 1 типу фактора некрозу пухлини (TNFR)), алергічну реакцію типу 1, діабет типу 2, кропивницю, звичайну інтерстиціальну пневмонію (UIP), васкуліт, весняний кон'юнктивіт, вірусний ретиніт, синдром Фогта-Коянагі-Харади (синдром VKH), вологу дегенерацію жовтої плями і загоєння ран.

Композиції і способи, представлені в рамках винаходу, можна використовувати для лікування болю у індивідуума, страждаючого захворюванням, вибраним з групи, що складається з первинних і метастазуючих злоякісних новоутворень, включаючи карциноми молочної залози, товстого кишечника, прямої кишки, легені, ротоглотки, гортаноглотки, стравоходу, шлунка, підшлункової залози, печінки, жовчного міхура і жовчних проток, тонкого кишечника, сечовивідних шляхів (включаючи нирки, сечовий міхур і уретелій), жіночої статеві системи (включаючи шийку матки, матку і яєчники, а також хоріокарциному і гестаційну трофобластичну хворобу), чоловічої статеві системи (включаючи передміхурову залізу, сім'яні пухирці, яєчка і пухлини статевих клітин), ендокринних залоз (включаючи щитовидну залозу, надниркові залози і гіпофіз) і шкіри, а також гемангіоми, меланоми, саркоми (включаючи виникаючі з кісткової тканини і м'яких тканин, а також саркому Капоші), пухлини головного мозку, нервів, очей і оболонок головного мозку (включаючи астроцитомі, гліоми, гліобластоми, ретинобластоми, невроми, нейробластоми, шваномі і менінгіоми), солідні пухлини, виникаючі з гематопоетичних злоякісних новоутворень, таких як лейкоз і лімфоми (ходжкінські і неходжкінські лімфоми).

Режими дозування можна коректувати для забезпечення оптимальної бажаної відповіді (наприклад, терапевтичної або профілактичної відповіді). Наприклад, можна вводити один боліс, можна вводити декілька окремих доз протягом періоду часу або дозу можна пропорційно знижувати або підвищувати, залежно від терапевтичної ситуації. Особливо переважно складати парентеральні композиції в стандартній лікарській формі для полегшення введення і однорідності доз. У рамках винаходу стандартна лікарська форма належить до фізично окремих одиниць, придатних як однократні дози для підданих лікуванню ссавців; кожна одиниця містить попередньо визначену кількість активної сполуки, обчислювану для одержання бажаного терапевтичного ефекту, разом з необхідним фармацевтичним носієм. Характеристика стандартних лікарських форм за винаходом визначається і напряму залежить від (а) унікальних характеристик зв'язувальних білків, що зв'язуються з IL-1 α і/або IL-1 β , і конкретного терапевтичного або профілактичного ефекту, що досягається, і (b) обмежень, властивих сфері складання таких білків для лікування індивідумів.

Наприклад, необмежувальний діапазон терапевтично або профілактично ефективної кількості зв'язувального білка, застосовної в лікуванні остеоартриту або болю, становить 0,1-20 мг/кг, більш переважно 1-10 мг/кг. Потрібно зазначити, що значення доз можуть варіюватися залежно від типу і тяжкості полегшуваного стану. Також потрібно розуміти, що для конкретного індивідуума конкретні режими дозування з плином часу необхідно коректувати відповідно до потреб індивідуума і професійної думки фахівця, який здійснює введення або керує введенням композицій, і що діапазони доз, наведені в рамках винаходу, є виключно прикладами і не призначені для обмеження обсягу або практичного здійснення заявленої композиції.

Фахівцям в цій галузі буде зрозуміло, що інші придатні модифікації і адаптації способів і композицій за винаходом, представлених в рамках винаходу, є очевидними і їх можна здійснювати з використанням придатних еквівалентів без відхилення від обсягу винаходу або варіантів здійснення, представлених в рамках винаходу. Після докладного опису даного винаходу він буде більш зрозумілим з посиланням на наступні приклади, включені виключно в ілюстративних цілях і не призначені для обмеження винаходу.

ПРИКЛАДИ

Приклад 1. Одержання імуноглобулінового білка з подвійним варіабельним доменом (DVD-Ig)

Молекулу імуноглобуліну з подвійним варіабельним доменом (DVD-Ig) конструюють таким чином, що два різних варіабельних домени легких ланцюгів (VL) з двох різних батьківських mAb з'єднують напряду в тандем або через короткий лінкер способами рекомбінантної ДНК, за якими йде константний домен легкого ланцюга. Аналогічно, важкий ланцюг містить два різних варіабельних домени важкого ланцюга (VH), сполучені напряду в тандем або через короткий лінкер, за якими йде константний домен CH1 і Fc-область. Див. фігуру 1A. Описують конструювання і одержання зв'язувальних білків DVD-Ig з батьківських моноклональних антитіл, включаючи приклади зв'язувального білка DVD-Ig, що зв'язується з IL-1 α і IL-1 β , одержувані з батьківського моноклонального антитіла до IL-1 α і батьківського моноклонального антитіла до IL-1 β . Див., публікацію PCT № WO 2007/024715 A2, і Wu et al. Nature Biotechnol. 25(11):1290-1297 (2007), включених в рамках винаходу як посилання. У рамках винаходу представлена характеристика вибраних моноклональних антитіл до IL-1 α і IL-1 β і їх використання як батьківських моноклональних антитіл для одержання молекул DVD-Ig, що зв'язуються з IL-1 α , і з IL-1 β . Молекули DVD-Ig охарактеризували по можливій терапевтичній активності з використанням відомих моделей ревматоїдного артрити і остеоартриту на тваринах.

Приклад 1.1. Одержання моноклональних антитіл миші до IL-1 α і IL-1 β

Моноклональні антитіла (mAb) до IL-1 α і IL-1 β одержували наступним чином з використанням стандартної гібридомної технології.

Приклад 1.1.A. Імунізація мишей

Очищені рекомбінантні IL-1 α людини і IL-1 β миші (R&D Systems) використовували як імуногени, а також покриваючи антигени в аналізах титруванням і скринінгу ELISA. Дози для імунізації знаходилися в діапазоні від 5,0 до 20,0 мкг/мишу/ін'єкцію для всіх антигенів для первинної і повторної імунізації. Ад'ювант ImmunEasy придбавали в Qiagen (Waltham, MA) і використовували при співвідношенні ад'ювант/антиген 20 мл ад'юванту ImmunEasy на 10,0 мкг антигену. Кожна група підлягаючих імунізації тварин включала п'ять нокаутних по IL-1 α/β мишей, одержаних від Dr. Yoichiro Iwakura (University of Tokyo, Minato-ku, Tokyo, Japan). Мишей імунізували згідно з описуванням нижче режимом дозування. Клітини MRC-5 придбавали в ATCC (Manassas, VA) і використовували для біологічного аналізу IL-1. Набори для ELISA IL-8 людини і контрольні антитіла миші до hIL-1 α і до hIL-1 β (MAB200 і MAB201) придбавали в R&D Systems (Minneapolis, MN).

У короткому викладі, суміш ад'ювант-антиген одержували, спочатку обережно перемішуючи ад'ювант в посудині з використанням центрифуги типу вортекс. Бажану кількість ад'юванту видаляли з посудини і поміщали в автоклавовану мікроцентрифужну пробірку 1,5 мл. Одержували антиген в PBS або фізіологічному розчині з концентрацією в діапазоні 0,5-1,0 мг/мл. Потім додавали обчислювану кількість антигену в мікроцентрифужну пробірку з ад'ювантом і змішували розчин, обережно піпетуючи вгору і вниз 5 разів. Суміш ад'ювант-антиген інкубували при кімнатній температурі протягом 15 хвилин і потім знов змішували, обережно піпетуючи вгору і вниз 5 разів. Розчин ад'ювант-антиген забирали у придатний шприц для ін'єкції тварині. Всього ін'єктували 5-20 мкг антигену в об'ємі 50-100 мкл. Кожну тварину імунізували і потім повторно імунізували від 2 до 3 разів залежно від титру. Тваринам з хорошими титрами вводили кінцеву повторну внутрішньовенну ін'єкцію перед вливанням і одержанням гібридом.

Приклад 1.1.B. Скринінг гібридом

Гібридами, одержувані як описано вище, піддавали скринінгу і визначали титр антитіл з використанням ELISA. Білковими антигенами напряду покривали планшети ELISA для визначення специфічних антитіл з використанням стандартних способів ELISA. У короткому викладі, планшети ELISA покривали 100 мкл rhIL-1 α або rhIL-1 β (1,0 мкг/мл в PBS) протягом ночі при 4°C. Планшети промивали 3 рази з використанням 250 мкл PBS/0,5% Tween 20 і блокували 200 мкл блокувального буфера (2% BSA в PBS з 0,5% Tween 20). Розведені сироватки або супернатант гібридами (100 мкл) додавали в кожну ямку і інкубували при кімнатній температурі протягом 2 годин. Потім планшети промивали три рази PBS/0,5% Tween 20. Для визначення використовували кон'югований з HRP IgG козла проти миші і спостерігали OD при зв'язуванні при 450 нм. Клони гібридом, продукуючи антитіла, що демонструють високу активність специфічного зв'язування при ELISA, субклонували і очищали, і охарактеризували афінність (Biacore) і активність (MRC-5 біологічний аналіз) антитіл наступним чином.

Приклад 1.1.C. Характеристика моноклональних антитіл миші до IL-1 α і IL-1 β

Для характеристикації антитіл, одержуваних за допомогою гібридом, як описано в прикладі 1.1.B, використовували наступні аналізи.

Приклад 1.1.C.1. Поверхневий плазмонний резонанс

У реальному часі зв'язувальні взаємодії між антитілом (антитіло миші до рекомбінантного mIL-1), фіксованим на матриці біосенсора за допомогою IgG козла до миші, і mIL-1 вимірювали за допомогою поверхневого плазмонного резонансу (SPR) з використанням системи Biacore (Biacore AB, Uppsala, Sweden) за інструкціями виробника і стандартними способами. У короткому викладі, mIL-1 розбавляли в рухомому буфері HBS (Biacore AB) і ін'єктували аліквоти 50 мкл на іммобілізовані білкові матриці при швидкості потоку 5 мл/хв. Використовувані концентрації rhIL-1 становили 62,5, 125, 187,5, 250, 375, 500, 750, 1000, 1500 і 2000 нМ. Для визначення константи дисоціації (швидкості зворотної реакції) і константи асоціації (швидкості прямої реакції) використовували програмне забезпечення для оцінки кінетики Biacore (версії 3.1).

Приклад 1.1.C.2. Біологічний аналіз антитіл до IL-1

Лінія клітин MRC-5 являє собою клітинну лінію фібробластів легень людини, продукуючу IL-8 у відповідь на IL-1 α і IL-1 β людини дозозалежним чином (див., Dinarello, Muegge and Durum (2000) Curr. Protocols Immunol. 6:1). Клітини MRC-5 культивували в повному MEM з 10% FBS і вирощували при 37°C в інкубаторі при 5% CO₂. Для визначення нейтралізуючої активності моноклональних антитіл (mAb) до рекомбінантного IL-1 α або IL-1 β людини різні концентрації (0-10 мкг/мл) mAb (50 мкл) додавали в 96-ямковий планшет і попередньо інкубували з 50 мкл rhIL-1 α або rhIL-1 β (10-50 пг/мл) протягом 1 години при 37°C. Збирали супернатанти, розбавляли їх і вимірювали концентрації IL-8 за допомогою ELISA з використанням стандартного набору для ELISA IL-8 (R&D Systems). Активність антитіла визначали по його здатності інгібувати продукцію IL-8 клітинами MRC-5.

На основі даних Biacore і біологічного аналізу MRC-5 визначали ряд антитіл миші до hIL-1 α і до hIL-1 β з високою афінністю і активністю, як показано в таблиці 1 нижче.

Таблиця 1

Одержання і характеристика mAb миші до hIL-1 α/β

Клон mAb №	Специфічність	K _D (M)	IC ₅₀ (M)
3D12.E3	hIL-1 α	1,11 $\times 10^{-9}$	6,70 $\times 10^{-10}$
18F4.2C8	hIL-1 α	5,78 $\times 10^{-10}$	8,90 $\times 10^{-11}$
6H3.1A4.3E11	hIL-1 α	3,54 $\times 10^{-10}$	2,40 $\times 10^{-10}$
13F5.G5	hIL-1 β	2,91 $\times 10^{-10}$	6,00 $\times 10^{-10}$
1B12.4H4	hIL-1 β	2,13 $\times 10^{-10}$	5,30 $\times 10^{-10}$
6B12.4F6	hIL-1 β	5,54 $\times 10^{-10}$	3,20 $\times 10^{-10}$

Приклад 1.1.D. Клонування і секвенування моноклональних антитіл (mAb) миші до IL-1 α і IL-1 β

Клонування і секвенування генів варіабельних областей важкого (VH) і легкого (VL) ланцюгів всіх mAb до IL-1 α/β наведені в таблиці 1 (вище) і одержували додаткові антитіла після виділення і очищення тотальної РНК з кожної гібридомної клітинної лінії з використанням реагенту тризол (Invitrogen) за інструкціями виробника. Ампліфікацію генів VH і VL здійснювали з використанням олігонуклеотидів IgGVH і IgKVL з набору Mouse Ig-Primer Set (Novagen, Madison, WI) з використанням набору для RT-ПЛР в одній пробірці (Qiagen), як запропоновано

виробником. Фрагменти ДНК, одержані при продуктивних ампліфікаціях, клонували у вектор pCR-TOPO (Invitrogen) за інструкціями виробника. Потім численні клони VH і VL секвенували за допомогою дидезоксиспособу термінації ланцюга з використанням секвенатора ABI 3000 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Послідовності всіх генів VL і VH mAb представлені нижче в таблиці 2.

5

Таблиця 2

Моноклональні антитіла миші, здатні зв'язуватися з IL-1 α або IL-1 β людини

Білок	Ідентифікаційний номер послідовності	Послідовність
		12345678901234567890
VH 3D12.E3	SEQ ID NO:89	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKAS GYTFERNYGMNWVKQAPGKDLKRM AWINTYTGESTYADDFKGRFAFSLE TSASTAYLQINNLIKNEATATYFCAR GIYYYGSSYAMDYWGQGTSTVTVSS
VL 3D12.E3	SEQ ID NO:90	niqmtqttslsaslgdrvtiscrasqdisnclnwyq qkpdgtvkliyytsrlhsgvpsrfsgsgsgtdyslti snleqediatiyfcqqgkltlpyafgggkcleinr
VH 18F4.2C8	SEQ ID NO:91	evqlqqsgaelvkpgasvklscasglnikdymh wlkqrpeqglewigridpangnakypdrlgkatit adtssntaylqlssltseavvycargdgnfhfdy wgqgttlvtss
VL 18F4.2C8	SEQ ID NO:92	divmtqsqrfmstsvgdrsvtckasqnvgtia wyqqkpggspraliysasyrgvprftgsgsgt dftltisnvqsvdlaeyfcqqytrypltfgggkcleikr
VH 6H3.1A4.3E11	SEQ ID NO:93	qvqlqqsgaelvrpgasvklscasgytfttywm nwwkqrpeqglewigridpydsetlysqfkdtailt vdkssstaymlssltseavvycarygfdywg qgttlvtss
VL 6H3.1A4.3E11	SEQ ID NO:94	qivltqspalmsaspgekvmtcsasssvnymy wyqqkprsspkpwiyltsnlasgvparsfgsgsgt sysltissmeaadaatyccqwnsnpytfgggkcleikr
VH 13F5.G5	SEQ ID NO:95	qvqlqqsgaelvrpgssvklscasgyafssyw mnwvkqrpgqglewigqiypgdgdtynngkfkg katltadkssstsymqlsgltseavvycvrfptg ndyyamdywgqgtstvtss
VL 13F5.G5	SEQ ID NO:96	nivltqspaslavlsgqratiscrasesvdsygnsy mhwyqqkpggppklliylasnlsgvparfsgsg srtdftltidpveadaatyccqnnedpftfgsgtk leikr
VH 1B12.4H4	SEQ ID NO:97	qvhlikesgpglvapsqslsitctvsgfsltdygvswi rpppgkglewlgliwgggdyynspklsrksirkdn sksqvflkmnslqtdtavyycakqrtlwgdydlyg mdywgqgtstvtss
VL 1B12.4H4	SEQ ID NO:98	ettvtqspaslsmaigekvtircitstdidvdmnwy qqkpgeppkllisqgntlrpgvpsrfsssgsgtdfvf ienmlsedvadyyclqsdnlpftfgagtkleikr
VH 6B12.4F6	SEQ ID NO:99	evqlqqsgpelvktgtsvklscasgysftgyymh wvrqshgkslewigyiscyngftsypnkfkgkatft vdtssstaiyqsrtsedavvycarsdygndy wgqgttlvtss
VL 6B12.4F6	SEQ ID NO:100	qivltqspaimasaspgekvititsasssvsymhw fqkpgasplwiystnlasgvparsfgsgsgts ysltvsrmeaadaatyccqqrstypftfggkclei kr

Приклад 1.2. Одержання і характеристика химерних антитіл миші-людини

Всі описувані вище mAb перетворювали в химерні антитіла (з константною областю людини) і експресували, очищали і охарактеризували для підтвердження активності. Також антитіла використовували як контролю для подальшого аналізу зв'язувального білка DVD-Ig. Для перетворення 3D12.E3 в химерну форму 3D12.E3-VL ампліфікували за допомогою ПЛР з використанням праймерів P1 і P2; при цьому ген С_к людини (у векторі pBOS, одержаному для внутрішнього користування, Abbott Bioresearch Center, Worcester, MA) ампліфікували з використанням праймерів P3 і P4. Обидві реакції ПЛР здійснювали згідно зі стандартними способами ПЛР. Два продукти ПЛР виділяли з гелю і використовували разом як матрицю, що перекривається, для подальшої ПЛР з перекриванням з використанням праймерів P1 і P4, з використанням стандартних умов ПЛР. Кінцевий продукт ПЛР химерний легкий ланцюг 3D12.E3-VL-hC_к субклонували в експресуючий вектор ссавців pEF6 TOPO (Invitrogen) TOPO-клонуванням за інструкціями виробника. У таблиці 3 представлені послідовності кожного з праймерів для ПЛР, використовуваних в цьому способі.

Таблиця 3

Праймери для ПЛР

P1: 5' ATG GTG TCC ACA GCT CAG TTC C 3'	SEQ ID NO:101
P2: 5' GC AGC CAC CGT ACG CCG GTT TAT TTC CAG 3'	SEQ ID NO:102
P3: 5' CGT ACG GTG GCT GCA CCA TCT GTC 3'	SEQ ID NO:103
P4: 5' TCA ACA CTC TCC CCT GTT GAA GC 3'	SEQ ID NO:104

Для перетворення важкого ланцюга 3D12.E3 в химерну форму 3D12.E3-VH ампліфікували за допомогою ПЛР з використанням праймерів P5 і P6; при цьому ген С_{у1} людини (у векторі pBOS, одержаному для внутрішнього користування в ABC) ампліфікували з використанням праймерів P7 і P8. Обидві реакції ПЛР здійснювали згідно зі стандартними способами ПЛР. Два продукти ПЛР виділяли з гелю і використовували разом як матрицю, що перекривається, для подальшої ПЛР з перекриванням з використанням праймерів P5 і P8, з використанням стандартних умов ПЛР. Кінцевий продукт ПЛР химерний легкий ланцюг 3D12.E3-VH-hC_{у1} субклонували в експресуючий вектор ссавців pcDNA3.1 TOPO (Invitrogen) за інструкціями виробника. У таблиці 4 представлені послідовності кожного з праймерів для ПЛР, використовуваних в цьому способі.

Таблиця 4

Праймери для ПЛР

P5: 5' ATG GCT TGG GTG TGG ACC TTG C 3'	SEQ ID NO:105
P6: 5' GGG CCC TTG GTC GAC GCT GAG GAG ACG GTG ACT GAG G 3'	SEQ ID NO:106
P7: 5' GCG TCG ACC AAG GGC CCA TCG GTC TTC C 3'	SEQ ID NO:107
P8: 5' TC ATT TAC CCG GAG ACA GGG AGA GGC 3'	SEQ ID NO:108

Аналогічно, одержували химерну 13F5.G5-VH-С_{у1} з використанням праймерів P21/P22 (у випадку VH) і P7/P8 (у випадку hC_{у1}) і клонували у вектор pcDNA3.1 TOPO, і одержували химерну 13F5.G5-VL-С_к з використанням праймерів P23/P24 (у випадку VL) і P3/P4 (у випадку hC_к) і клонували у вектор pEF6 TOPO. У таблиці 5 представлені послідовності кожного з праймерів для ПЛР, використовуваних в цьому способі.

Таблиця 5

Праймери для ПЛР

P21: 5' ATA GAA TGG AGC TGG GTT TTC CTC 3'	SEQ ID NO:109
P22: 5' GGG CCC TTG GTC GAC GC TGA GGA GAC GGT GAC TGA 3'	SEQ ID NO:110
P23: 5' ATG GTC CTC ATG TCC TTG CTG TTC 3'	SEQ ID NO:111
P24: 5' GC AGC CAC CGT ACG CCG TTT TAT TTC CAG CTT TG 3'	SEQ ID NO:112

Для експресії химерних антитіл 13F5.G5-VL-Ск і 13F5.G5-VH-Сy1 коекспресували в клітинах COS з використанням ліпофектаміну (Invitrogen) протягом 72 годин, збирали середовище і виділяли IgG за допомогою хроматографії з протеїном А. Аналогічно, коекспресували 13F5.G5-VL-Ск і 13F5.G5-VH-Сy1 в COS з використанням ліпофектаміну (Invitrogen) протягом 72 годин, збирали середовище і виділяли IgG за допомогою хроматографії з протеїном А. Обидва очищених химерних Ab охарактеризували за допомогою Біасcore і біологічного аналізу MRC-5 для підтвердження активності. Результати показали, що ці химерні Ab демонстрували афінність і активність, аналогічні таким у вихідних mAb миші.

Приклад 1.3. Конструювання, експресія і очищення молекули імуноглобуліну з подвійним варіабельним доменом (DVD-Ig) до IL-1 α / β

Конструкція, використовувана для одержання зв'язувального білка DVD-Ig, здатного зв'язуватися з hIL-1 α і hIL-1 β , представлена на фігурі 1B. У короткому викладі, батьківські mAb, включаючи два високоафінних антитіла миші, до hIL-1 α (клон 3D12.E3) і до hIL-1 β (клон 13F5.G5), одержували імунізацією мишей Balb/c з використанням рекомбінантного білка IL-1 α (rhIL-1 α) і рекомбінантного білка IL-1 β (rhIL-1 β), відповідно. Гени VL/VH двох цих клонів гібридом виділяли за допомогою RT-ПЛР з використанням набору Mouse Ig Primer (Novagen, Madison, WI). Гени VL/VH спочатку перетворювали в химерні антитіла (з константними областями людини) для підтвердження активності. Для одержання зв'язувального білка DVD1-Ig VH і VL 13F5.G5 напряду піддавали злиттю з N-кінцем VH і VL 3D12.E3, відповідно (як показано на фігурі 1B). Зв'язувальний білок DVD2-Ig конструювали аналогічно, за тим винятком, що він містить лінкер між двома варіабельними доменами і в легкому ланцюзі (послідовність лінкера являє собою ADAAP), і у важкому ланцюзі (послідовність лінкера являє собою AKTTPP). Ці послідовності вибирали з послідовностей N-кінців Ск і CH1 миші. Ці послідовності лінкерів, вибрані з N-кінців Ск і CH1 миші, є природним продовженням варіабельних доменів і мають гнучку конформацію без значних вторинних структур за результатами аналізу декількох структур кристалів Fab. Детально способи клонування за допомогою ПЛР описані нижче.

Приклад 1.3.A. Молекулярне клонування зв'язувального білка DVD1-Ig до hIL-1 α / β

13F5.G5-VH ампліфікували за допомогою ПЛР з використанням праймерів P21 і P25. 3D12.E3-VH-hCy1 ампліфікували з використанням праймерів P14 і P8. Обидві реакції ПЛР здійснювали згідно зі стандартними способами ПЛР. Два продукти ПЛР виділяли з гелю і використовували разом як матрицю, що перекривається, для подальшої ПЛР з перекриванням з використанням праймерів P21 і P8, з використанням стандартних умов ПЛР. Кінцевий продукт ПЛР важкий ланцюг DVD1-Ig до hIL-1 α / β DVD1-VH-hCy1 субклонували в експресуючий вектор ссавців pcDNA3.1 TOPO (Invitrogen) за інструкціями виробника. У таблиці 6 представлені послідовності праймерів для ПЛР, використовуваних в цьому способі.

Таблиця 6

Праймери для ПЛР

P14: 5' cag atc cag ttg gtg cag tct gg 3'	SEQ ID NO:113
P25: 5' CAC CAA CTG GAT CTG TGA GGA GAC GGT GAC TGA GG 3'	SEQ ID NO:114

Для одержання легкого ланцюга DVD1-Ig до hIL-1 α / β , 13F5.G5-VL ампліфікували за допомогою ПЛР з використанням праймерів P23 і P26; при цьому 3D12.E3-VL-hCк ампліфікували з використанням праймерів P16 і P4. Обидві реакції ПЛР здійснювали згідно зі стандартними способами ПЛР. Два продукти ПЛР виділяли з гелю і використовували разом як матрицю, що перекривається, для подальшої ПЛР з перекриванням з використанням праймерів P23 і P4, з використанням стандартних умов ПЛР. Кінцевий продукт ПЛР легкий ланцюг DVD1-Ig до hIL-1 α / β DVD1-VL-hCк субклонували в експресуючий вектор ссавців pEF6 TOPO (Invitrogen) за інструкціями виробника. У таблиці 7 представлені послідовності кожного з праймерів для ПЛР, використовуваних в цьому способі.

Таблиця 7

Праймери для ПЛР

P16: 5' AAT ATC CAG ATG ACA CAG ACT ACA TCC 3'	SEQ ID NO:115
P26: 5' GTGT CAT CTG GAT ATT CCG TTT TAT TTC CAG CTT TG 3'	SEQ ID NO:116

Приклад 1.3.В. Молекулярне клонування DVD2-Ig до hIL-1 α / β

13F5.G5-VH ампліфікували за допомогою ПЛР з використанням праймерів P21 і P17. 3D12.E3-VH-hC γ 1 ампліфікували з використанням праймерів P18 і P8. Обидві реакції ПЛР здійснювали згідно зі стандартними способами ПЛР. Два продукти ПЛР виділяли з гелю і використовували разом як матрицю, що перекривається, для подальшої ПЛР з перекриванням з використанням праймерів P21 і P8, з використанням стандартних умов ПЛР. Кінцевий продукт ПЛР важкий ланцюг DVD2-Ig до hIL-1 α / β DVD2-VH-hC γ 1 субклонували в експресуючий вектор ссавців pcDNA3.1 TOPO (Invitrogen) за інструкціями виробника. У таблиці 8 представлені послідовності кожного з праймерів для ПЛР, використовуваних в цьому способі.

Таблиця 8

Праймери для ПЛР

P17: 5' tgg ggg tgt cgt ttt ggc tga gg 3'	SEQ ID NO:117
P18: 5' GCC AAA ACG ACA CCC CCA CAG ATC CAG TTG GTG CAG 3'	SEQ ID NO:118

Для одержання легкого ланцюга DVD2-Ig до hIL-1 α / β , 13F5.G5-VL ампліфікували за допомогою ПЛР з використанням праймерів P23 і P19. 3D12.E3-VL-hC κ ампліфікували з використанням праймерів P20 і P4. Обидві реакції ПЛР здійснювали згідно зі стандартними способами ПЛР. Два продукти ПЛР виділяли з гелю і використовували разом як матрицю, що перекривається, для подальшої ПЛР з перекриванням з використанням праймерів P23 і P4, з використанням стандартних умов ПЛР. Кінцевий продукт ПЛР легкий ланцюг DVD2-Ig до hIL-1 α / β DVD2-VL-hC κ субклонували в експресуючий вектор ссавців pEF6 TOPO (Invitrogen) за інструкціями виробника. У таблиці 9 представлені послідовності кожного з праймерів для ПЛР, використовуваних в цьому способі.

Таблиця 9

Праймери для ПЛР

P19: 5' TGG TGC AGC ATC AGC CCG TTT TAT TTC 3'	SEQ ID NO:119
P20: 5' GCT GAT GCT GCA CCA AAT ATC CAG ATG ACA CAG 3'	SEQ ID NO:120

Кінцеві послідовності hIL-1 α / β DVD1-Ig і hIL-1 α / β DVD2-Ig описують в таблиці 10.

Таблиця 10

Амінокислотна послідовність зв'язувального білка
DVD1-Ig до hIL-1 α / β і DVD2-Ig до hIL-1 α / β

Білок	Ідентифікатор послідовності	Послідовність
Область білка		12345678901234567890
Варіабельна область важкого ланцюга DVD-Ig hIL-1 α / β DVD1-Ig	SEQ ID NO:121	QVQLQQSGAELVRPGSSVKISKASGY AFSSYWMNWVKQRPGQGLEWIGQIYP GDGDTNNGKFKGKATLTADKSSSTSY MQLSGLTSEDSAMYFCVRFPTGNDYYA MDYWGGQGTSTVSSQIQLVQSGPELKK PGETVKISKASGYTFRNYGMNWVKQA PGKDLKRMWINTYTGSTYADDFKGR FAFSLETSASTAYLQINNPKNEDTATYFC ARGIYYYGSSYAMDYWGGQGTSTVSS
VH 13F5.G5	SEQ ID NO:95	QVQLQQSGAELVRPGSSVKISKASGY AFSSYWMNWVKQRPGQGLEWIGQIYP GDGDTNNGKFKGKATLTADKSSSTSY MQLSGLTSEDSAMYFCVRFPTGNDYYA MDYWGGQGTSTVSS
Лінкер		NONE

Білок	Ідентифікатор послідовності	Послідовність
Область білка		12345678901234567890
3D12.E3 VH	SEQ ID NO:89	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYT FRNYGMNWVKQAPGKDLKRMWINTY TGESTYADDFKGRFAFSLETSASTAYLQI NNLKNEDTATYFCARGIYYYGSSYAMDY WGQGTSVTVSS
CH	SEQ ID NO:122	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
Варіабельна область легкого ланцюга DVD-Ig hIL-1 α /βDVD1-Ig	SEQ ID NO:123	NIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESV DSYGNSYMHWYQQKPGQPPKLLIYLAS NLESGVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEA DDAATYYCQQNNEDPFTFGSGTKLEIKR NIQMTQTTSSLSASLGDRVITISCRASQDI SNCLNHWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHSG VPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATY FCQQGKTLPYAFGGGTKLEINRR
13F5.G5 VL	SEQ ID NO:96	NIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESV DSYGNSYMHWYQQKPGQPPKLLIYLAS NLESGVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEA DDAATYYCQQNNEDPFTFGSGTKLEIKR
Лінкер		NONE
3D12.E3 VL	SEQ ID NO:90	NIQMTQTTSSLSASLGDRVITISCRASQDI SNCLNHWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHSG VPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATY FCQQGKTLPYAFGGGTKLEINR
CL	SEQ ID NO:124	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
Варіабельна область важкого ланцюга DVD-Ig hIL-1 α /βDVD2-Ig	SEQ ID NO:125	QVQLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGY AFSSYWMNWVKQRPQGQLEWIGQIYP GDGDTNNGKFKGKATLTADKSSSTSY MQLSGLTSEDSAMYFCVRFPFGNDYYA MDYWGGGTSTVTVSSAKTTPPQIQLVQS GPELKKPGETVKISCKASGYTFRNYGMN WVKQAPGKDLKRMWINTYTGSTYAD DFKGRFAFSLETSASTAYLQINNKNEDT ATYFCARGIYYYGSSYAMDYWGQGTSTV TVSS
13F5.G5 VH	SEQ ID NO:95	QVQLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGY AFSSYWMNWVKQRPQGQLEWIGQIYP GDGDTNNGKFKGKATLTADKSSSTSY MQLSGLTSEDSAMYFCVRFPFGNDYYA MDYWGGGTSTVTVSS
Лінкер	SEQ ID NO:75	AKTTPP

Білок	Ідентифікатор послідовності	Послідовність
Область білка		12345678901234567890
3D12.E3 VH	SEQ ID NO:89	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYT FRNYGMNWVKQAPGKDLKRMWINTY TGESTYADDFKGRFAFSLETSASTAYLQI NNLKNEDTATYFCARGIYYYGSSYAMDY WGQGTSVTVSS
CH	SEQ ID NO:122	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
Варіабельна область легкого ланцюга DVD-Ig hIL-1 α / β DVD2-Ig	SEQ ID NO:126	NIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESV DSYGNSYMHWYQQKPGQPPKLLIYLAS NLESGVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEA DDAATYYCQQNNEDPFTFGSGTKLEIKR ADAAPNIQMTQTTSSLSASLGDRVTISC RASQDISNCLNWYQQKPDGTVKLLIYYT SRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLE QEDIATYFCQQGKTLPYAFGGGKLEIN R
13F5.G5 VL	SEQ ID NO:96	NIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESV DSYGNSYMHWYQQKPGQPPKLLIYLAS NLESGVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEA DDAATYYCQQNNEDPFTFGSGTKLEIKR
Лінкер	SEQ ID NO:69	ADAAP
3D12.E3 VL	SEQ ID NO:90	NIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDI SNCLNWYQQKPDGTVKLLIYYT VPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATY FCQQGKTLPYAFGGGKLEINR
CL	SEQ ID NO:124	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Приклад 1.3.С. Експресія і очищення зв'язувального білка DVD1-Ig до hIL-1 α / β

Важкий і легкий ланцюги кожної конструкції субклонували у вектори pcDNA3.1 TOPO і pEF6 TOPO (Invitrogen Inc.), відповідно, і секвенували для забезпечення точності. Плазмідні, кодуєчі важкі і легкі ланцюги кожної конструкції, транзитивно експресували з використанням реагентів ліпофектаміну 2000 і 293fectin, відповідно, в клітинах COS, а також ембріональних клітинах нирки людини 293 (American Type Culture Collection, Manassas, VA). Середовища для культивування клітин збирали через 72 години після транзитornoї трансфекції і очищали антитіла з використанням хроматографії з протеїном A (Pierce, Rockford, IL) за інструкціями виробника. Антитіла аналізували за допомогою SDS-PAGE і кількісно аналізували за допомогою A280 і BCA (Pierce, Rockford, IL). У таблиці 11 показано, що рівні експресії DVD1-Ig до hIL-1 α / β і DVD2-Ig до hIL-1 α / β порівнянні з такими для химерних антитіл, свідчаючи про те, що зв'язувальний білок DVD-Ig можна ефективно експресувати в клітинах ссавців.

Аналіз експресії і молекулярної маси зв'язувального білка DVD-Ig до hIL-1 α/β

	Рівень експресії (нг/мл)		Молекулярна маса (Дальтони)		
	COS	Freestyle 293	Легкий ланцюг	Важкий ланцюг	Повнорозмірний
Негативний контроль	0	0			
3D12.E3-Ch	2788	3886	23696	49914	147220
13F5.G5-Ch	3260	3562	24084	49518	147204
DVD1-Ig	2988	3300	35797 (35790)	64380 (64371)	200346 (200521)
DVD2-Ig	2433	3486	36222 (36220)	64976 (64973)	202354 (202573)

Молекулярну масу легкого ланцюга, важкого ланцюга і повнорозмірного зв'язувального білка DVD1-Ig і зв'язувального білка DVD2-Ig визначали експериментально за допомогою мас-спектрометрії, як показано в дужках.

Приклад 1.4. Мас-спектрометрія і аналіз SEC зв'язувального білка DVD-Ig до hIL-1 α/β

Для вимірювання молекулярної маси (MW) легких і важких ланцюгів зв'язувального білка DVD-Ig 10 мкл молекули DVD-Ig (0,8 мкг/мкл) відновлювали розчином 1,0М DTT (5 мкл). Білкову колонку PLRP-S, 8-мк, 4000A, і 1×150 мм (Michrom BioResource, Auburn, MA) використовували для розділення важких і легких ланцюгів молекули DVD-Ig. Систему для капілярної ВЕРХ Agilent HP1100 (Agilent Technologies Inc., Palo Alto, CA) використовували з мас-спектрометром QSTAR (Applied Biosystems, Foster City, CA). Клапан Valco встановлювали на 10 хвилин для перемикання потоку зі стоку на MS для висолювання зразка. Буфер А являв собою 0,02% TFA, 0,08% FA, 0,1% ACN і 99,8% H₂O для ВЕРХ. Буфер В містив 0,02% TFA, 0,08% FA, 0,1% H₂O для ВЕРХ і 99,8% ACN. Швидкість потоку при ВЕРХ становила 50 мкл/хв. і об'єм ін'єкції зразка становив 8,0 мл. Температуру колонкового термостата встановлювали на 60°C і градієнт розділення складав: 5%B протягом 5 хвилин; від 5%B до 65%B протягом 35 хвилин; від 65%B до 95%B протягом інших 5 хвилин, і від 95%B до 5%B протягом 5 хвилин. Здійснювали сканування TOFMS від 800 до 2500 а.о.м. при 3600 циклах. Для визначення MW повнорозмірного зв'язувального білка DVD-Ig використовували картридж Protein MicroTrap (Michrom BioResource, Auburn, MA) для висолювання зразка. Градієнт ВЕРХ складав: 5%B протягом 5 хвилин; від 5%B до 95%B протягом 1 хвилини, і від 95%B до 5%B протягом інших 4 хвилин. Здійснювали сканування QSTAR TOFMS від 2000 до 3500 а.о.м. при 899 циклах. Всі вихідні дані MS аналізували з використанням програмного забезпечення Analyst QS (Applied Biosystems). Для аналізу SEC зв'язувального білка DVD-Ig очищений зв'язувальний білок DVD-Ig і химерні Ab в PBS наносили на колонку Superose 6 10/300 G2, 300×10 мм (Amersham Bioscience, Piscataway, NJ). Інструмент для ВЕРХ моделі 10A (Shimadzu, Columbia, MD) використовували для SEC. Всі білки визначали з використанням УФ-детекції при 280 нм і 214 нм. Елюція була ізократичною при швидкості потоку 0,5 мл/хв. Для визначення стабільності зразки в діапазоні концентрацій 0,2-0,4 мг/мл в PBS піддавали 3 циклам заморожування-розморожування при температурі від -80°C до 25°C або інкубували при 4°C, 25°C або 40°C протягом 4 тижнів і 8 тижнів з подальшим аналізом SEC.

Зв'язувальний білок DVD-Ig і химерні антитіла очищали за допомогою хроматографії з протеїном А. Вихід при очищенні (3-5 мг/л) відповідав кількісному аналізу hIgG в середовищі для експресії для кожного білка. Композицію і чистоту очищених зв'язувальних білків DVD-Ig і химерних антитіл аналізували за допомогою SDS-PAGE у відновних і невідновних умовах. У невідновних умовах кожний з чотирьох білків мігрував у вигляді однієї смуги. Білки DVD-Ig демонстрували більшу молекулярну масу, ніж химерні антитіла, як і очікували. У невідновних умовах кожний з чотирьох білків приводив до утворення двох смуг - однієї важкого ланцюга і однієї легкого ланцюга. Знов, важкі і легкі ланцюги зв'язувальних білків DVD-Ig були більшими за розміром, ніж химерні антитіла. SDS-PAGE показав, що кожний зв'язувальний білок DVD-Ig експресується у вигляді єдиної молекули, і важкі і легкі ланцюги ефективно сполучаються попарно з утворенням IgG-подібної молекули. Розміри важких і легких ланцюгів, а також повнорозмірний білок з двох молекул DVD-Ig відповідали їх молекулярній масі, обчислюваній на основі амінокислотних послідовностей (див. таблицю 11).

Для визначення точної молекулярної маси зв'язувальних білків DVD-Ig використовували мас-спектрометрію. Як показано в таблиці 1, визначена експериментально молекулярна маса

кожного зв'язувального білка DVD-Ig, включаючи легкий ланцюг, важкий ланцюг і повнорозмірний білок, добре узгоджується з прогнозованим значенням. Для подальшого дослідження фізичних властивостей зв'язувального білка DVD-Ig в розчині використовували ексклюзійну хроматографію (SEC) для аналізу кожного білка. І химерні Ab, і зв'язувальний білок DVD2-Ig демонстрували один пік, що свідчить про фізичну гомогенність у вигляді мономерних білків. Химерне Ab 3D12.E3 демонструвало менший фізичний розмір, ніж химерне Ab 13F5.G5, що свідчить про те, що химерне Ab 3D12.E3 приймає більш компакту глобулярну форму. Зв'язувальний білок DVD1-Ig демонстрував основний пік, а також плечовий пік праворуч, дозволяючи передбачати, що частина зв'язувального білка DVD1-Ig можливо знаходиться в агрегованій формі в умовах конкретного буфера.

Приклад 1.5. Аналіз стабільності in vitro зв'язувальних білків DVD-Ig до hIL-1 α/β

Фізичну стабільність DVD-Ig тестували наступним чином. Очищені антитіла в діапазоні концентрації 0,2-0,4 мг/мл в PBS піддавали 3 циклам заморожування-розморожування при температурі від -80°C до 25°C або інкубували при 4°C, 25°C або 40°C протягом 4 тижнів і 8 тижнів з подальшим аналізом з використанням ексклюзійної хроматографії (SEC) (див. таблицю 12).

Таблиця 12

Аналіз стабільності in vitro DVD-Ig до hIL-1 α/β з використанням SEC

	3D12.E3-Ch			13F5.G5-Ch			DVD1-Ig			DVD2-Ig		
	Agg	Ab	Frgm	Agg	Ab	Frgm	Agg	Ab	Frgm	Agg	Ab	Frgm
3×Freeze-Thaw	1,72	98,28	0,00	13,0	87,0	0,0	46,50	53,50	0,00	0,0	100,0	0,0
4°C @ 4 Wks	0,85	99,15	0,00	4,2	95,8	0,0	42,43	56,63	0,94	0,0	100,0	0,0
25°C @ 4 Wks	1,29	98,71	0,00	0,0	100,0	0,0	45,66	54,34	0,00	0,0	100,0	0,0
40°C @ 4 Wks	1,65	98,35	0,00	20,3	78,1	1,6	36,70	59,42	3,88	0,0	100,0	0,0
4°C @ 8 Wks	5,35	90,33	4,32	2,2	97,8	0,0	38,18	56,91	4,91	0,0	100,0	0,0
25°C @ 8 Wks	1,11	60,55	38,34	1,4	97,5	1,0	24,42	67,39	8,19	0,0	100,0	0,0
40°C @ 8 Wks	4,74	81,47	13,79	34,6	65,4	0,0	20,55	67,16	12,29	0,0	100,0	0,0

Міри агрегації і фрагментації представлені в процентних частках, в той час як процентні частки Ab представляють інтактну молекулу.

Agg: агрегати;

Ab: інтактне антитіло;

Frgm: фрагменти.

Обидва химерних антитіла демонстрували незначні міри агрегації і фрагментації, нормальної для впорядкованої молекули IgG. Зв'язувальний білок DVD1-Ig демонстрував деяку агрегацію при SEC після очищення. При аналізі стабільності зв'язувальний білок DVD1-Ig також демонстрував агрегацію в PBS в різних умовах; однак, процентна частка агрегованої форми зв'язувального білка DVD1-Ig не підвищувалася при тривалому зберіганні або при більш високих температурах. Процентна частка фрагментованої форми зв'язувального білка DVD1-Ig знаходилася в нормальному діапазоні, аналогічно химерному Ab 3D12.E3. Навпаки, зв'язувальний білок DVD2-Ig демонстрував виняткову стабільність. У випадку зв'язувального білка DVD2-Ig не визначали ні агрегацію, ні фрагментацію у всіх тестованих умовах, і 100 % зв'язувального білка DVD2-Ig зберігалася у вигляді інтактної мономерної молекули.

Приклад 1.6. Визначення афінності зв'язування антигену зв'язувальними білками DVD-Ig до hIL-1 α/β

Кінетику зв'язування молекул DVD-Ig з rhIL-1 α і rhIL-1 β визначали за допомогою вимірювань на основі поверхневого плазмонного резонансу на інструменті Biacore 3000 (Biacore AB, Uppsala, Sweden) з використанням HBS-EP (10 mM HEPES, pH 7,4, 150 mM NaCl, 3 mM ЕДТО і 0,005% поверхнево-активної речовини P20) при 25°C. Всі хімічні речовини одержували від

Biacore AB (Uppsala, Sweden) або в іншому випадку з різних джерел, представлених в рамках винаходу. Приблизно, 5000 RU Fcγ-фрагмента специфічного поліклонального антитіла козла проти IgG людини (Pierce Biotechnology Inc, Rockford, IL), розбавленого 10 mM ацетату натрію (pH 4,5), напряду іммобілізували на дослідницькому біосенсорному чипі CM5 з використанням стандартного набору для приєднання по аміногрупі за інструкціями і способами виробника при 25 мг/мл. Молекули, що не прореагували, на поверхні біосенсора блокували етаноламіном. Модифіковану карбоксиметилдекстраном поверхню в проточних кюветах 2 і 4 використовували як реакційну поверхню. Немодифікований карбоксиметилдекстран без антитіл козла проти IgG людини в проточних кюветах 1 і 3 використовували як референсну поверхню. Для кінетичного аналізу рівняння швидкості, одержані з моделі зв'язування Ленгмюра 1:1, апроксимували одночасно для фаз асоціації і дисоціації для всіх десяти ін'єкцій (з використанням аналізу глобальної апроксимації) з використанням програмного забезпечення Bioevaluation 4.0.1. Очищені зразки DVD-Ig розбавляли в HEPES-забуференому фізіологічному розчині для захоплення на покритих антитілами козла до Fc IgG людини специфічних реакційних поверхнях і ін'єктували на реакційні матриці при швидкості потоку 5 мл/хв. Константи швидкості асоціації k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$) і дисоціації k_{off} (s^{-1}) визначали при постійній швидкості потоку 25 мл/хв. Константи швидкості одержували за допомогою вимірювань кінетики зв'язування при десяти різних концентраціях антигену в діапазоні від 1,25 до 1000 nM. Потім рівноважну константу дисоціації (M) реакції між молекулою DVD-Ig і rhIL-1α/β обчислювали з кінетичних констант швидкості за наступною формулою: $K_D = k_{off}/k_{on}$. Також одночасно аліквоти зразків rhIL-1α/β ін'єктували на порожню референсну поверхню і реакційну поверхню CM для запису і віднімання будь-якого фонового неспецифічного зв'язування для усунення переважання зміни показника заломлення і шумового сигналу при ін'єкції. Поверхні відновлювали за допомогою двох послідовних ін'єкцій 25 мл 10 mM гліцину (pH 1,5) при швидкості потоку 5 мл/хв. Поверхні з іммобілізованим антитілом до Fc повністю відновлювали і вони зберігали свою повну здатність до захоплення протягом двадцяти циклів. Уявний показник стехіометрії фіксованого комплексу DVD-Ig-rhIL-1α/β обчислювали в насичуючих умовах зв'язування (стійкій рівновазі) з використанням наступної формули:

$$\text{Показник стехіометрії} = \frac{\text{Відповідь rhIL-1}\alpha/\beta \text{ (RU)}}{\text{Відповідь DVD (RU)}} \times \frac{\text{DVD-Ig (MW)}}{\text{rhIL-1}\alpha/\beta \text{ (MW)}}$$

Визначені за допомогою аналізу Biacore химерні антитіла мали кінетику зв'язування і афінності до IL-1, аналогічні вихідним гібридомним моноклональним антитілам, що свідчить про те, що виділяли правильні послідовності VL/VH (таблиця 13). Загальні параметри зв'язування з hIL-1α для двох зв'язувальних білків DVD-Ig були схожими, при цьому афінності зв'язувальних білків DVD-Ig складали тільки в 2-3 рази менше, ніж для химерного антитіла 3D12.E3. Афінність зв'язування з hIL-1β для зв'язувального білка DVD2-Ig складала трохи менше, ніж для химерного антитіла 13F5.G5, але в 3 рази вище, ніж для зв'язувального білка DVD1-Ig. Афінність двох зв'язувальних білків DVD-Ig до hIL-1 в порівнянні з афінністю химерних антитіл до hIL-1 була схожою, на що вказує оцінка стехіометрії взаємодії з IL-1. Обидва химерних антитіла, будучи бівалентними моноспецифічними, зв'язувалися з IL-1α і IL-1β при аналізі Biacore з показником стехіометрії 1,6 і 1,7, відповідно. Це характерно для IgG внаслідок міжмолекулярних перешкод, коли антитіла щільно іммобілізують на біосенсорному чипі Biacore, що приводить до показника стехіометрії в діапазоні від 1,5 до 2,0. Показники стехіометрії обох зв'язувальних білків DVD-Ig для hIL-1α і hIL-1β були схожими з такими для двох химерних антитіл, що свідчить про те, що обидва зв'язувальних білки DVD-Ig мали бівалентну здатність до зв'язування кожного антигену.

Таблиця 13

Функціональна характеристика білків, що зв'язуються з IL-1

Білок, що зв'язує IL-1	Антиген	k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	K_D (M)	Показник стехіометрії	Активність IC_{50} (M)
3D13.E3	hIL-1 α	$6,43 \times 10^{+5}$	$7,13 \times 10^{-4}$	$1,11 \times 10^{-9}$	2,0	$6,70 \times 10^{-10}$
3D12.E3-Ch	hIL-1 α	$4,12 \times 10^{+5}$	$5,52 \times 10^{-4}$	$1,34 \times 10^{-9}$	1,6	$7,00 \times 10^{-10}$
DVD1-Ig	hIL-1 α	$3,70 \times 10^{+4}$	$1,05 \times 10^{-4}$	$2,83 \times 10^{-9}$	1,8	$2,30 \times 10^{-9}$
DVD2-Ig	hIL-1 α	$7,35 \times 10^{+4}$	$2,52 \times 10^{-4}$	$3,42 \times 10^{-9}$	2,0	$2,90 \times 10^{-9}$
13F5.G5	hIL-1 β	$2,13 \times 10^{+6}$	$6,21 \times 10^{-4}$	$2,91 \times 10^{-10}$	1,8	$6,00 \times 10^{-10}$
13F5.G5-Ch	hIL-1 β	$1,41 \times 10^{+6}$	$6,54 \times 10^{-4}$	$4,62 \times 10^{-10}$	1,7	$5,30 \times 10^{-10}$
DVD1-Ig	hIL-1 β	$6,09 \times 10^{+5}$	$1,59 \times 10^{-3}$	$2,60 \times 10^{-9}$	1,5	$3,10 \times 10^{-9}$
DVD2-Ig	hIL-1 β	$1,19 \times 10^{+6}$	$9,50 \times 10^{-4}$	$7,98 \times 10^{-10}$	1,8	$1,60 \times 10^{-9}$

Афінність і показник стехіометрії вимірювали за допомогою Biacore; активність (IC_{50}) визначали за допомогою біологічного аналізу MRC-5; Ch = химерне антитіло.

Крім того, зв'язування антигену тетравалентним зв'язувальним білком DVD-Ig з подвійною специфічністю також аналізували за допомогою Biacore (таблиця 14). Зв'язувальний білок DVD-Ig спочатку фіксували за допомогою антитіла козла до Fc людини на біосенсорному чипі Biacore, ін'єктували перший антиген і спостерігали сигнал зв'язування. Зв'язувальний білок DVD-Ig насичували першим антигеном, потім ін'єктували другий антиген і спостерігали другий сигнал. Цього досягали, спочатку ін'єктуючи IL-1 β , потім IL-1 α , або спочатку ін'єктуючи IL-1 α , а потім IL-1 β у випадку зв'язувального білка DVD2-Ig. У будь-якому випадку визначали активність подвійного зв'язування. Аналогічні результати одержували для зв'язувального білка DVD1-Ig. Таким чином, кожний зв'язувальний білок DVD-Ig здатний зв'язуватися з обома антигенами одночасно як тетравалентна молекула з подвійною специфічністю. Як показано в таблиці 14, показник стехіометрії для обох зв'язувальних білків DVD-Ig до першого антигену, hIL-1 α або hIL-1 β , складав більше 1,5, аналогічно показнику для моноспецифічного бівалентного зв'язування. Після ін'єкції другого антигену, в той час як зв'язувальний білок DVD-Ig займав перший антиген, показник стехіометрії обох зв'язувальних білків DVD-Ig до другого антигену (тобто hIL-1 α або hIL-1 β) складав від 1,0 до 1,3. Таким чином, зв'язувальний білок DVD-Ig здатний зв'язуватися з двома молекулами IL-1 α і двома молекулами IL-1 β . Зв'язувальний білок DVD-Ig спочатку фіксували за допомогою антитіла козла до Fc людини на біосенсорному чипі Biacore, ін'єктували перший антиген і спостерігали сигнал зв'язування, а потім ін'єктували другий антиген.

Таблиця 14

Стехіометричний аналіз зв'язувального білка DVD-Ig до hIL-1 α/β в тетравалентному зв'язуванні з подвійною специфічністю з IL-1 α/β

Фіксований зв'язувальний білок	Одиниця відповіді		Показник стехіометрії	
	1-й антиген	2-й антиген	hIL-1 α :DVD-Ig	hIL-1 β :DVD-Ig
DVD1-Ig: 932	hIL-1 α : 190	hIL-1 β : 75	2,3	1,0
DVD1-Ig: 1092	hIL-1 β : 141	hIL-1 α : 107	1,1	1,5
DVD2-Ig: 1324	hIL-1 α : 209	hIL-1 β : 137	1,8	1,3
DVD2-Ig: 1184	hIL-1 β : 159	hIL-1 α : 131	1,2	1,6

Приклад 1.7. Визначення функціональної гомогенності молекул DVD-Ig

Оскільки зв'язувальний білок DVD2-Ig очищали за допомогою хроматографії з протеїном А замість мішень-специфічної афінної хроматографії, будь-які потенційно неправильно згорнені і/або неспівпадаючі домени VL/VH, якщо присутні, можна оцінювати за допомогою дослідження зв'язування з двома різними антигенами. Такий аналіз зв'язування здійснювали за допомогою

ексклюзивної рідинної хроматографії (SEC). Зв'язувальний білок DVD2-Ig окремо або після 120-хвилинного періоду інкубації при 37°C з IL-1 α , IL-1 β або з IL-1 α і IL-1 β в рівному молярному співвідношенні наносили на колонку. Кожний з антигенів також окремо пропускали через колонку як контроль. Результати SEC показали, що зв'язувальний білок DVD2-Ig здатний зв'язуватися з IL-1 α і IL-1 β в розчині, і таке зв'язування приводило до зсуву сигналу при SEC, свідчаючи про підвищення динамічного розміру зв'язувального білка DVD2-Ig, коли він знаходиться в комплексі з будь-яким антигеном. Зсув сигналу зв'язувального білка DVD2-Ig становив 100%, тобто він не був частковим, що дозволяє передбачати, що молекули DVD2-Ig здатні зв'язуватися з антигеном. У присутності і IL-1 α , і IL-1 β спостерігали додатковий і повний зсув сигналу зв'язувального білка DVD2-Ig, що свідчить про те, що всі молекули DVD2-Ig здатні зв'язуватися з обома антигенами однаково. Цей експеримент показав, що зв'язувальний білок DVD-Ig експресувався як функціонально гомогенний білок. Це має важливі наслідки, оскільки показує, що зв'язувальний білок DVD-Ig можна одержувати як єдину гомогенну функціональну молекулу, відмінну від описуваних раніше біспецифічних, поліспецифічних і полівалентних імунглобуліноподібних молекул і молекул на основі імунглобулінів.

Приклад 1.8. Визначення біологічної активності зв'язувальних білків DVD-Ig

Біологічну активність DVD-Ig вимірювали з використанням біологічного аналізу MRC-5. Лінія клітин MRC-5 є лінією клітин фібробластів легені людини, продукуючих IL-8 у відповідь на IL-1 α і IL-1 β людини дозозалежним чином. Клітини MRC-5 одержували з ATCC і культивували в повному MEM з 10% FBS при 37°C в інкубаторі при 5% CO₂. Для визначення нейтралізуючої активності DVD-Ig проти IL-1 α або IL-1 β людини 50 мкл антитіла (від 1 \times 10⁻⁷ до 1 \times 10⁻¹² М) в MEM/10%FBS додавали в 96-ямковий планшет і попередньо інкубували з 50 мкл hIL-1 α або hIL-1 β (200 пг/мл) протягом 1 години при 37°C, 5% CO₂. Потім у всі ямки додавали клітини MRC-5 в концентрації 1 \times 10⁵/мл (100 мкл) і інкубували планшети протягом ночі при 37°C в інкубаторі при 5% CO₂. Збирали супернатанти і вимірювали продукцію IL-8 людини за допомогою стандартної ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN). Нейтралізуючу активність зв'язувального білка DVD-Ig визначали по його здатності інгібувати продукцію IL-8.

Як представлено в таблиці 13, обидва зв'язувальних білки DVD-Ig здатні нейтралізувати hIL-1 α і hIL-1 β . Згідно з афінністю зв'язування з hIL-1 α , нейтралізуючі активності зв'язувального білка DVD1-Ig і зв'язувального білка DVD2-Ig до hIL-1 α також були схожими, тобто в 3 рази менше, ніж у химерних антитіл (див. таблицю 13). Згідно зі своєю афінністю зв'язування з hIL-1 β , нейтралізуюча активність зв'язувального білка DVD2-Ig до hIL-1 β була небагато меншою, ніж у химерного Ab 13F5.G5, але в 3 рази вище, ніж у зв'язувального білка DVD1-Ig. Загалом, не спостерігали значущого зниження біологічної активності молекул DVD-Ig в порівнянні з вихідними моноклональними антитілами.

Для визначення того, чи здатний зв'язувальний білок DVD-Ig інгібувати продукцію IL-8 в присутності і IL-1 α , і IL-1 β , рівні кількості hIL-1 α і hIL-1 β додавали в одну і ту ж систему культивування аналізу MRC-5. І зв'язувальний білок DVD1-Ig, і зв'язувальний білок DVD2-Ig здатні інгібувати синтез IL-8 клітинами MRC-5 в присутності і IL-1 α , і IL-1 β , з активностями, аналогічними таким в моноаналізах, в яких був присутній тільки один цитокін (таблиця 13). У цьому аналізі, де були присутніми IL-1 α і IL-1 β , активність подвійного інгібування зв'язувальним білком DVD2-Ig (1,2 нМ) була більш високою, ніж у зв'язувального білка DVD1-Ig (2,2 нМ).

Приклад 2. Аналіз розміру лінкера і орієнтації варіабельного домену в зв'язувальних білках DVD-Ig

Конструювали додаткові молекули DVD-Ig з різними парами батьківських mAb, як представлено в таблиці 15. Для кожної пари mAb одержували чотири різних конструкції DVD-Ig: 2 з коротким лінкером і 2 з довгим лінкером, кожну з двома різними орієнтаціями доменів: a-b-C (альфа-бета-константний домен) і b-a-C (бета-альфа-константний домен). Послідовності лінкера одержували з N-кінцевої послідовності домену C κ або C μ 1 людини таким чином: короткий лінкер: легкий ланцюг: TVAAP (SEQ ID NO:71); важкий ланцюг: ASTKGP (SEQ ID NO:79); і довгий лінкер: легкий ланцюг: TVAAPSVFIFPP (SEQ ID NO:72); важкий ланцюг: ASTKGPSVFPLAP (SEQ ID NO:80).

Всі конструкції важкого і легкого ланцюгів субклонували в експресуючий вектор pBOS і експресували в клітинах COS або клітинах Freestyle 293.

Для конструювання нових клонів DVD-Ig варіабельні домени двох mAb і легкого ланцюга, і важкого ланцюга спочатку з'єднували в тандем з використанням ПЛР з перекриванням, як описано для DVD1-Ig до hIL-1 α / β і DVD2-Ig до hIL-1 α / β . Потім з'єднані фрагменти субклонували у вектор pBOS з використанням гомологічної рекомбінації. У короткому викладі, вектори лінеаризували за допомогою рестрикції (2 мкг вектора pBOS-hC κ розщеплювали з використанням FspAI і BsiWI в буфері O+, і 2 мкг вектора pBOS-hC μ розщеплювали з

використанням FspAI і Sall в буфері O+). Розщеплені зразки піддавали електрофорезу в 1% агарозному гелі, і фрагмент кістяка очищали в 50 мкл води. Для гомологічної рекомбінації і трансформації компетентні клітини DH5α розморожували на льоду і змішували з 20-50 нг з'єднаного продукту ПЛР і 20-50 нг лінеаризованого вектора (на кожні 50 мкл клітин DH5α).

- 5 Суміш обережно змішували і інкубували на льоду протягом 45 хвилин з подальшим тепловим шоком при 42°C протягом 1 хвилини. Потім додавали 100 мкл середовища SOC і інкубували при 37°C протягом 1 години. Трансформовану культуру інокулювали на планшетах з середовищем LB/агаром, що містять ампіцилін, і інкубували при 37°C протягом 18-20 годин. Виділяли бактеріальні клони, з яких виділяли ДНК і піддавали її аналізу секвенуванням. Кінцеві
- 10 клони з перевіреною послідовністю котрансфекували (зіставляючи HV і LC однієї пари антитіл) в клітинах COS або 293 для експресії і очищення антитіл, як описано вище.

- Характеристики очищених білків DVD-Ig наведені в таблиці 16. У лівій частині таблиці 16 представлені специфічність, афінність зв'язування і активність нейтралізації 2 пар mAb, використовуваних для конструювання нових молекул DVD-Ig до hIL-1α/β. Антитіла 18F4.2C8 і 1B12.4H4 (див. Приклад 1.1.D) використовували для конструювання DVD3a-Ig до hIL-1α/β, DVD4a-Ig до hIL-1α/β, DVD3b-Ig до hIL-1α/β і DVD4b-Ig до hIL-1α/β. DVD3a-Ig до hIL-1α/β і DVD4a-Ig до hIL-1α/β знаходилися в орієнтації a-b-C з коротким і довгим лінкером, відповідно. DVD3b-Ig до hIL-1α/β і DVD4b-Ig до hIL-1α/β знаходилися в орієнтації b-a-C з коротким і довгим лінкером, відповідно. Антитіла 6H3.1A4 і 6B12.4F6 використовували для конструювання DVD5a-Ig до hIL-1α/β, DVD6a-Ig до hIL-1α/β, DVD5b-Ig до hIL-1α/β і DVD6b-Ig до hIL-1α/β. DVD5a-Ig до hIL-1α/β і DVD6a-Ig до hIL-1α/β знаходилися в орієнтації a-b-C з коротким і довгим лінкером, відповідно. DVD5b-Ig до hIL-1α/β і DVD6b-Ig до hIL-1α/β знаходилися в орієнтації b-a-C з коротким і довгим лінкером, відповідно. Молекулярне клонування цих додаткових зв'язувальних білків DVD-Ig до hIL-1α/β здійснювали з використанням способу, описаного вище для DVD1-Ig до hIL-1α/β (див. приклад 1.3), з використанням ПЛР з перекриванням. Амінокислотні послідовності цих додаткових зв'язувальних білків DVD-Ig до hIL-1α/β представлені в таблиці 15.

Таблиця 15

Амінокислотна послідовність важкого ланцюга і легкого ланцюга шести білків DVD-Ig, здатних зв'язуватися з IL-1α і IL-1β

Білок	Ідентифікатор послідовності	Послідовність
Область білка		12345678901234567890
Варіабельна область важкого ланцюга DVD-Ig hIL-1α/β DVD3a-Ig	SEQ ID NO:127	evqlqqsgaelvkpgasvklscstasglnikdymhwkqrpeqglewigridp angnakydprflgkatitadtssntaylqlssltsestavyycargdgnfhfdyw gggttlvtssastkqpqvhklesgpglvapsqslsitctvsgfsltdygvswirqp pgkglewlgliwgggdyynsplksrslrkdnsksqvfllkmnslqtdtavvy cakqrtlwgdyldygmgywgqgtsvtvss
18F4.2C8 VH	SEQ ID NO:91	evqlqqsgaelvkpgasvklscstasglnikdymhwkqrpeqglewigridp angnakydprflgkatitadtssntaylqlssltsestavyycargdgnfhfdyw gggttlvtvss
Лінкер	SEQ ID NO:79	ASTKGP
1B12.4H4 VH	SEQ ID NO:97	QVHLKESGPGLVAPSQSL SITCTVSGFSLTDYGVSWIR QPPGKGLEWLGLIWGGGDTYYNSPLKSRSLRDKNSK SQVFLKMNSLQTDDTAVYYCAKQRTLWGYDLYGMDY WGQGTSTVTVSS
CH	SEQ ID NO:122	astkgpsvfplapsskstsggtaalgclvkdyppepvtvswngaltsgvhtfp avllqssglyslssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkkvepkscdktht cppcpapellggpsvflfpkpkdtlmisrtpevtcvvdvshedpevkfnwy vdgvevhnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpa piektiskakgqprepqvytlppsreemtknqvsltlclvkgfypsdiavewes ngqpennyyktppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhleahnh ytqkslsispkg

Блок	Ідентифікатор послідовності	Послідовність
Область білка		12345678901234567890
Варіабельна область легкого ланцюга DVD-Ig hIL-1 α / β DVD3a-Ig	SEQ ID NO:128	divmtqsqrfmstsvgdrsvtckasqnvgtniawyqqkpgqspraliysas yrysgvpdrftgsgsgtdftltisnvqsvdlaeyfcqqytrypltfgggkcleikrty <u>aapettvtqspaslsmaigekvtircitstdidvdmnwyqqkpggeppkllisqg</u> ntrlpgvpsrfsssgsgtdfvfiienmlsedvadyyclqsdnlpltfgagtklelkr r
18F4.2C8 VL	SEQ ID NO:92	DIVMTQSQRFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNIAWYQ QKPGQSPRALIYSASYRYSGVPDRFTGSGSGTDFTLT ISNVQSVDLAEYFCQQYTRYPLTFGGGKLEIKR
Лінкер	SEQ ID NO:71	tvaap
1B12.4H4 VL	SEQ ID NO:98	ETTVTQSPASLSMAIGEKVTIRCITSTDIDVDMNWyQQK PGEPKLLISQGNLRLPGVPSRFSSSGSGTDFVFIENM LSEDVADYYCLQSDNLPLTFGAGTKLELKR
CL	SEQ ID NO:124	tvaapsvfifppsdeqlksgtasvcllnnfypreakvqwkvdnalqsgnsq svteqskdstyslsstltlskadyekhkvyacevthqglsspvtksfnrgec
Варіабельна область важкого ланцюга DVD-Ig hIL-1 α / β DVD3b-Ig	SEQ ID NO:129	qvhklesgpglvapsqslsitctvsgfsltdygvswirpppgkglewlgliwgg gdyynsplksrslsirkdnsksgvflkmnslqtdtavyycaqrtlwgdylyg mdywgqgtsvtvss <u>astk</u> gpevqlqsgaelvkpgasvklscstasglnikdt ymhwkqrpegglewigrdpangnakydprflgkatitadtssntaylqlsslt sedtavyycargdgnfhfdywgqgttlvss
1B12.4H4 VH	SEQ ID NO:97	QVHLKESGPGLVAPSQSL SITCTVSGFSLTDYGVSWIR QPPGKGLEWLGLIWGGGDTYYNSPLKSRLSIRKDNSK SQVFLKMNSLQTD DTA VYYCAQRTLWGYDLYGMDY WGQGTSTVTVSS
Лінкер	SEQ ID NO:79	ASTKGP
18F4.2C8 VH	SEQ ID NO:91	evqlqqsgaelvkpgasvklscstasglnikdtyhmhwkqrpegglewigrdp angnakydprflgkatitadtssntaylqlsslt sedtavyycargdgnfhfdyw gggttlvss
CH	SEQ ID NO:122	astkgpsvfplapsskstsggtaalgclvkdyppepvtvswngaltsgvhtfp avqlssglyslssvvtvpssslgtqyicvnhkpstnkvdkkvepkscdktht cppcpapellggpsvfifppkpkdtlmisrtpevtcvvvdshedpevkfnwy vdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeyckckvsnkalpa piektiskakgqprepvytlppsreemtknqvslclvkgfypsdiavewes ngqpennykttppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealnhh ytqkslspsgk
Варіабельна область легкого ланцюга DVD-Ig hIL-1 α / β DVD3b-Ig	SEQ ID NO:130	Ettvtqspaslsmaigekvtircitstdidvdmnwyqqkpggeppkllisqgntr pgvpsrfsssgsgtdfvfiienmlsedvadyyclqsdnlpltfgagtklelkrty <u>apdivmtqsqrfmstsvgdrsvtckasqnvgtniawyqqkpgqspraliys</u> asyrysgvpdrftgsgsgtdftltisnvqsvdlaeyfcqqytrypltfgggkcleikr
1B12.4H4 VL	SEQ ID NO:98	ETTVTQSPASLSMAIGEKVTIRCITSTDIDVDMNWyQQK PGEPKLLISQGNLRLPGVPSRFSSSGSGTDFVFIENM LSEDVADYYCLQSDNLPLTFGAGTKLELKR
Лінкер	SEQ ID NO:71	tvaap
18F4.2C8 VL	SEQ ID NO:92	DIVMTQSQRFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNIAWYQ QKPGQSPRALIYSASYRYSGVPDRFTGSGSGTDFTLT ISNVQSVDLAEYFCQQYTRYPLTFGGGKLEIKR
CL	SEQ ID NO:124	tvaapsvfifppsdeqlksgtasvcllnnfypreakvqwkvdnalqsgnsq svteqskdstyslsstltlskadyekhkvyacevthqglsspvtksfnrgec
Варіабельна область важкого ланцюга DVD-Ig hIL-1 α / β DVD4a-Ig	SEQ ID NO:131	evqlqqsgaelvkpgasvklscstasglnikdtyhmhwkqrpegglewigrdp angnakydprflgkatitadtssntaylqlsslt sedtavyycargdgnfhfdyw gggttlvss <u>astk</u> gpsvfplapqvhklesgpglvapsqslsitctvsgfsltdy gvswirpppgkglewlgliwgggdyynsplksrslsirkdnsksgvflkmnslq tdtavyycaqrtlwgdylygmdywgqgtsvtvss
18F4.2C8 VH	SEQ ID NO:91	evqlqqsgaelvkpgasvklscstasglnikdtyhmhwkqrpegglewigrdp angnakydprflgkatitadtssntaylqlsslt sedtavyycargdgnfhfdyw gggttlvss
Лінкер	SEQ ID NO:80	<u>astk</u> gpsvfplap

Блок	Ідентифікатор послідовності	Послідовність
Область білка		12345678901234567890
1B12.4H4 VH	SEQ ID NO:97	QVHLKESGPGLVAPSQSL SITCTVSGFSLTDYGVSWIR QPPGKGLEWLGLIWGGGDTYYNSPLKSRLSIRKDNSK SQVFLKMNSLQTDDTAVYYCAKQRTLWGYDLYGMDY WGQGTSTVTVSS
CH	SEQ ID NO:122	astkgpsvfplapsskstsggtaalgclvkdypfpvptvswngaltsgvhtfp avlqssglyslssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkkvepkscdktht cppcpapellggpsvflfpkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwy vdgvevhnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeyckvsnkalpa piektiskakgqprepvytlppsreemtknqvsltlcvkgfypsdiavewes ngqpennykttppvldsdsfflyskltvdkrsrqgnvfscsvmhealnhh ytqkslsispkgk
Варіабельна область легкого ланцюга DVD-Ig hIL-1α/β DVD4a-Ig	SEQ ID NO:132	divmtqsqrfmstsvgdrsvtckasqnvgtniawyqqkpgqspraliysas yrysgvpdrftgsgsgtdftltisnvqsvdlaeyfcqytrypltfgggtkleikrTv aapsvfifppettvtqspaslsmaigekvtircitstdidvdmnwyqqkpggp pkllisqgntlrpgvpsrfsssgsgtdfvfienmlsedvadyyclsdnpltfga gtkleikr
18F4.2C8 VL	SEQ ID NO:92	DIVMTQSQRFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNIAWYQ QKPGQSPRALIYSASYRYSGVPDRFTGSGSGTDFTLTI SNVQSVDLAEYFCQYTRYPLTFGGGTKEIKR
Лінкер	SEQ ID NO:72	Tvaapsvfifpp
1B12.4H4 VL	SEQ ID NO:98	ETTVTQSPASLSMAIGEKVTIRCITSTDIDVDMNWWYQQK PGEPPKLLISQGNLTPGVPSRFSSSGSGTDFVFIIENM LSEDVADYYCLQSDNLPLTFGAGTKLEIKR
CL	SEQ ID NO:124	tvaapsvfifppsdeqlksgtasvvcclnnfyreakvqwkvdnalqsgnsqe svteqdkdstyslsstltlskadyekkhvyacevthqglsspvtksfnrgec
Варіабельна область важкого ланцюга DVD-Ig hIL-1α/β DVD4b-Ig	SEQ ID NO:133	qvhklesgpglvapsqslsitctvsgfsltdygvswirpppgkglewlgliwgg gdttyynsplksrslsirkdnskssqvlkmnslqtdtavyycaqrtlwgydlyg mdywgqgtsvtvssastkgpsvfplapevqlqqsgaelvkpgasvklscata sglnikdtyhmwlkqrpeqglewigrdpangnakypdrlfgkatitadtsnt aylqlssltseavyyccargdggnfhfdywgqgtltvss
1B12.4H4 VH	SEQ ID NO:97	QVHLKESGPGLVAPSQSL SITCTVSGFSLTDYGVSWIR QPPGKGLEWLGLIWGGGDTYYNSPLKSRLSIRKDNSK SQVFLKMNSLQTDDTAVYYCAKQRTLWGYDLYGMDY WGQGTSTVTVSS
Лінкер	SEQ ID NO:80	astkgpsvfplap
18F4.2C8 VH	SEQ ID NO:91	evqlqqsgaelvkpgasvklscataglnikdtyhmwlkqrpeqglewigrdp angnakypdrlfgkatitadtsntaylqlssltseavyyccargdggnfhfdy wgqgtltvss
CH	SEQ ID NO:122	astkgpsvfplapsskstsggtaalgclvkdypfpvptvswngaltsgvhtfp avlqssglyslssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkkvepkscdktht cppcpapellggpsvflfpkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwy vdgvevhnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeyckvsnkalpa piektiskakgqprepvytlppsreemtknqvsltlcvkgfypsdiavewes ngqpennykttppvldsdsfflyskltvdkrsrqgnvfscsvmhealnhh ytqkslsispkgk
Варіабельна область легкого ланцюга DVD-Ig hIL-1α/β DVD4b-Ig	SEQ ID NO:134	ettvtqspaslsmaigekvtircitstdidvdmnwyqqkpggeppkllisqgntlr pgvpsrfsssgsgtdfvfienmlsedvadyyclsdnpltfaggtkleikrTva apsvfifppdivmtqsqrfmstsvgdrsvtckasqnvgtniawyqqkpgqs praliysasyrysgvpdrftgsgsgtdftltisnvqsvdlaeyfcqytrypltfgg gtkleikr
1B12.4H4 VL	SEQ ID NO:98	ETTVTQSPASLSMAIGEKVTIRCITSTDIDVDMNWWYQQK PGEPPKLLISQGNLTPGVPSRFSSSGSGTDFVFIIENM LSEDVADYYCLQSDNLPLTFGAGTKLEIKR
Лінкер	SEQ ID NO:72	Tvaapsvfifpp
18F4.2C8 VL	SEQ ID NO:92	DIVMTQSQRFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNIAWYQ QKPGQSPRALIYSASYRYSGVPDRFTGSGSGTDFTLTI SNVQSVDLAEYFCQYTRYPLTFGGGTKEIKR

Блок	Ідентифікатор послідовності	Послідовність
Область білка		12345678901234567890
CL	SEQ ID NO:124	tvaapsvfifppsdeqlksgtasvvcllnnfybreakvqwkvdnalqsgnsqe svteqdsdkdstylsstitliskadyekkhvyacevthqglsspvtksfnrgec
Варіабельна область важкого ланцюга DVD-Ig hIL-1α/β DVD5a-Ig	SEQ ID NO:135	qvqlqqpgaelvrpgasvklscasgytfttywmnwvkqrpeqglewigrd pydsetlysqkfkdtailtdkssstaymqslsstedsavvyccarygfdywgq gttlvtssastkqpevqlqqsgpelvktgtsvkisckasgysftgyymhwvrqs hgkslewigyiscyngftsypnkfkkgkatftvdtssstayiqfsltsedsavvycc arsdyygtdnywgqgttlvtss
6H3.1A4.3E11 VH	SEQ ID NO:93	qvqlqqpgaelvrpgasvklscasgytfttywmnwvkqrpeqglewigrd pydsetlysqkfkdtailtdkssstaymqslsstedsavvyccarygfdywgq gttlvtss
Лінкер	SEQ ID NO:79	ASTKGP
6B12.4F6 VH	SEQ ID NO:99	evqlqqsgpelvktgtsvkisckasgysftgyymhwvrqshgkslewigyis cyngftsypnkfkkgkatftvdtssstayiqfsltsedsavvyccarsdyygtdny wgqgttlvtss
CH	SEQ ID NO:122	astkgpsvflapsskstsggtaalgclvkdyppepvtvswngaltsgvhtfp avllqssglyslssvvtvpssslgtqtyicvnvhkpsntkvdkkvepkscdktht cppcpapellggpsvflfpkpkdtlmisrtpetvcvvdvshedpevkfnwy vdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeyckvsnkalpa piektiskakgqprepvytlppsreemtknqvsltlclvgfypsdiavewes ngqpennyktppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealnhh ytqkslslspgk
Варіабельна область легкого ланцюга DVD-Ig hIL-1α/β DVD5a-Ig	SEQ ID NO:136	qivltqspalmsaspgekvmtcsasssvnymywyqqkprsspkwiylts nlasgvparfsgsgsytstissmeaadaatyccqwwnsnpytfgggtkl emkrvaapqivltqspalmsaspgekvmtcsasssvsymhwfqkpgas pklwiystnlasgvparfsgsgsytstlvsrmeaadaatyccqqrstypyt fgggtkleikr
6H3.1A4.3E11 VL	SEQ ID NO:94	QIVLTQSPALMSASPGEKVTMTCSASSSVNYMYWYQQ KPRSSPKWIYLTSLNLAGVPARFSGSGSGTSYSLTIS SMEAEDAATYYCQQWNSNPYTFGGGTKLEMKR
Лінкер	SEQ ID NO:71	Tvaap
6B12.4F6 VL	SEQ ID NO:100	QIVLTQSPAISASPGEKVTITCSASSSVSYMHWFQQK PGASPKLWIYSTSLNLAGVPARFSGSGSGTSYSLTVSR MEAEDAATYYCQQRSTYPYTFGGGTKLEIKR
CL	SEQ ID NO:124	tvaapsvfifppsdeqlksgtasvvcllnnfybreakvqwkvdnalqsgnsqe svteqdsdkdstylsstitliskadyekkhvyacevthqglsspvtksfnrgec
Варіабельна область важкого ланцюга DVD-Ig hIL-1α/β DVD5b-Ig	SEQ ID NO:137	evqlqqsgpelvktgtsvkisckasgysftgyymhwvrqshgkslewigyis cyngftsypnkfkkgkatftvdtssstayiqfsltsedsavvyccarsdyygtdny wgqgttlvtssastkqpevqlqqpgaelvrpgasvklscasgytfttywmn wvkqrpeqglewigrdpydsetlysqkfkdtailtdkssstaymqslssted savvyccarygfdywgqgttlvtss
6B12.4F6 VH	SEQ ID NO:99	evqlqqsgpelvktgtsvkisckasgysftgyymhwvrqshgkslewigyis cyngftsypnkfkkgkatftvdtssstayiqfsltsedsavvyccarsdyygtdny wgqgttlvtss
Лінкер	SEQ ID NO:79	ASTKGP
6H3.1A4.3E11 VH	SEQ ID NO:93	qvqlqqpgaelvrpgasvklscasgytfttywmnwvkqrpeqglewigrd pydsetlysqkfkdtailtdkssstaymqslsstedsavvyccarygfdywgq gttlvtss
CH	SEQ ID NO:122	astkgpsvflapsskstsggtaalgclvkdyppepvtvswngaltsgvhtfp avllqssglyslssvvtvpssslgtqtyicvnvhkpsntkvdkkvepkscdktht cppcpapellggpsvflfpkpkdtlmisrtpetvcvvdvshedpevkfnwy vdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeyckvsnkalpa piektiskakgqprepvytlppsreemtknqvsltlclvgfypsdiavewes ngqpennyktppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealnhh ytqkslslspgk

Блок	Ідентифікатор послідовності	Послідовність
Область білка		12345678901234567890
Варіабельна область легкого ланцюга DVD-Ig hIL-1α/β DVD5b-Ig	SEQ ID NO:138	qivltqspaimsaspgkevltitcsasssvsymhfwqqkpgaspklwiystn lasgvparfsgsgsgtsysltvsrmeaadaatyccqqrstypytfgggtkleikr <u>tvaap</u> qivltqspalmsaspgekvmtcsasssvnymywyqqkprsspkp wiyiltlnlasgvparfsgsgsgtsysltissmeaadaatyccqwnsnpytfg ggtklemkr
6B12.4F6 VL	SEQ ID NO:100	QIVLTQSPAIMASAPGEKVTITCSASSSVSYMHWFQKK PGASPKLWIYSTNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTVSR MEAEDAATYYCQQRSTYPYTFGGGKLEIKR
Лінкер	SEQ ID NO:71	<u>Tvaap</u>
6H3.1A4.3E11 VL	SEQ ID NO:94	QIVLTQSPALMSASPGEKVTMTCSASSSVNYMYWYQQ KPRSSPKPWIYLTNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTIS SMEAEDAATYYCQQWNSNPYTFGGGKLEMKR
CL	SEQ ID NO:124	tvaapsvfifppsdeqlksgtasvvcclnnfypreakvqwkvdnalqsgnsq esvteqdskdstyslsstltlskadyekhkvyacevthqglsspvtksfnrgec
Варіабельна область важкого ланцюга DVD-Ig hIL-1α/β DVD6a-Ig	SEQ ID NO:139	qvqlqqpgaelvrpgasvklscasgytfttywmnwvkqrpeqglewigrd pydsetlysqkfkdtailtdkssstaymqsltsedsavyycarygfdywgq gttltvss <u>astkgpsvfplap</u> evqlqqsgpelvktgtsvkisckasgysftgyym hwwrqshgkslewigyiscyngftsynpkfkgkatftvdtssstayiqfsltsed savyycarsdydygndywgqgttltvss
6H3.1A4.3E11 VH	SEQ ID NO:93	qvqlqqpgaelvrpgasvklscasgytfttywmnwvkqrpeqglewigrd pydsetlysqkfkdtailtdkssstaymqsltsedsavyycarygfdywgq gttltvss
Лінкер	SEQ ID NO:80	<u>astkgpsvfplap</u>
6B12.4F6 VH	SEQ ID NO:99	evqlqqsgpelvktgtsvkisckasgysftgyymhwwrqshgkslewigyis cyngftsynpkfkgkatftvdtssstayiqfsltsedsavyycarsdydygndy wgqgttltvss
CH	SEQ ID NO:122	astkgpsvfplapsskstsggtaalgclvkdyppepvtvswngaltsgvhtfp avlqssglyslssvvtvpssslgtqtyicvnvhkpsntkvdkkvepkscdktht cppcpapellggpsvflfpkpkdtlmisrtpevtcvvvdshedpevkfnwy vdgvvehnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeyckckvsnkappa piektiskakgqprepvytlppsreemtknqvsltlclvgfypsdiavewes ngqpennyktppvldsdsfflyskltvdkrsrwqqgnvfscsvmhealnhn ytqkslsispkg
Варіабельна область легкого ланцюга DVD-Ig hIL-1α/β DVD6a-Ig	SEQ ID NO:140	qivltqspalmsaspgekvmtcsasssvnymywyqqkprsspkpwiytlts nlasgvparfsgsgsgtsysltissmeaadaatyccqwnsnpytfgggtkl emkrt <u>tvaapsvfifpp</u> qivltqspaimsaspgkevltitcsasssvsymhfwq kqpgaspklwiystnlasgvparfsgsgsgtsysltvsrmeaadaatycc qqrstypytfgggtkleikr
6H3.1A4.3E11 VL	SEQ ID NO:94	QIVLTQSPALMSASPGEKVTMTCSASSSVNYMYWYQQ KPRSSPKPWIYLTNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTIS SMEAEDAATYYCQQWNSNPYTFGGGKLEMKR
Лінкер	SEQ ID NO:72	<u>tvaapsvfifpp</u>
6B12.4F6 VL	SEQ ID NO:100	QIVLTQSPAIMASAPGEKVTITCSASSSVSYMHWFQKK PGASPKLWIYSTNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTVSR MEAEDAATYYCQQRSTYPYTFGGGKLEIKR
CL	SEQ ID NO:124	rvaapsvfifppsdeqlksgtasvvcclnnfypreakvqwkvdnalqsgnsq esvteqdskdstyslsstltlskadyekhkvyacevthqglsspvtksfnrgec
Варіабельна область важкого ланцюга DVD-Ig hIL-1α/β DVD6b-Ig	SEQ ID NO:141	evqlqqsgpelvktgtsvkisckasgysftgyymhwwrqshgkslewigyis cyngftsynpkfkgkatftvdtssstayiqfsltsedsavyycarsdydygndy wgqgttltvss <u>astkgpsvfplap</u> qvqlqqpgaelvrpgasvklscasgytftt ywmnwvkqrpeqglewigrdpydsetlysqkfkdtailtdkssstaymqsls ltsedsavyycarygfdywgqgttltvss
6B12.4F6 VH	SEQ ID NO:99	evqlqqsgpelvktgtsvkisckasgysftgyymhwwrqshgkslewigyis cyngftsynpkfkgkatftvdtssstayiqfsltsedsavyycarsdydygndy wgqgttltvss
Лінкер	SEQ ID NO:80	<u>astkgpsvfplap</u>

Блок	Ідентифікатор послідовності	Послідовність
Область білка		12345678901234567890
6H3.1A4.3E11 VH	SEQ ID NO:93	qvqlqqpgaelvrpgasvklscasgyfttywmnwvkqrpeqglewigrdpydsetlysqqfkdaitvdkssstaymqslsstdsavyycarygfdywgqgtltlvss
CH	SEQ ID NO:122	astkgpsvfplapsskstsggtaalgclvdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgtqtyicvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtcppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeyckvsnkalpaiektiskakgqprepqvylppsreemtknqvsltlvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealnhnytqkslsispkg
Варіабельна область легкого ланцюга DVD-Ig hIL-1α/β DVD6b-Ig	SEQ ID NO:142	qivltqspaimsaspgkevttitcsasssvsymhfwqkpgaspklwiystnlasgvparsgsgsgtsysltvsrmeaadaatyccqrstypytfgggtkleikrtvaapsvfifppqivltqspalmsaspgkevttitcsasssvnymywyqqkrsspkpwiyltsnlasgvparsgsgsgtsysltssmeaadaatyccqwnsnpytfgggtklemkrr
6B12.4F6 VL	SEQ ID NO:100	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTITCSASSSVSYMHWFQKKPGASPKLWIYSTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTVSRMEAEADAATYYCQQRSTYPYTFGGGKLEIKR
Лінкер	SEQ ID NO:72	tvaapsvfifpp
6H3.1A4.3E11 VL	SEQ ID NO:94	QIVLTQSPALMSASPGEKVTMTCSASSSVNYMYWYQQKPRSSPKWIYLTSLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISMEAEADAATYYCQQWNSNPYTFGGGKLEMKR
CL	SEQ ID NO:124	tvaapsvfifppsdeqlksgtasvcllnnfypreakvqwkvdnalqsgnsqesvteqdkdstyslsstltlskadyekhkvyacevthqglsspvtksfnrgec

Характеристики нових конструкцій DVD-Ig представлені в таблиці 16. Афіність (K_D) і біологічну активність (IC_{50}) визначали за допомогою аналізу Biacore і біологічного аналізу MRC-5, відповідно. Аналіз за допомогою SDS-PAGE всіх нових білків DVD-Ig показав нормальні профілі міграції у відновних і невідновних умовах, аналогічно регулярному антитілу і DVD1/2-Ig.

Таблиця 16

Характеристика нових молекул DVD-Ig, одержаних з нових пар mAb

mAb							Афіність (K_D) М		Активність (IC_{50}) М	
	Специфічність	K_d (М)	IC_{50} (М)	DVD	Орієнтація	Лінкер	IL-1α	IL-1β	IL-1α	IL-1β
				DVD3a	a-b-C	короткий	$8,37 \times 10^{-10}$	$6,37 \times 10^{-8}$	$7,50 \times 10^{-10}$	NA
18F4.2C8	rhIL-1α	$5,95 \times 10^{-10}$	$3,30 \times 10^{-10}$	DVD4a	a-b-C	довгий	$7,01 \times 10^{-10}$	$9,30 \times 10^{-10}$	$3,50 \times 10^{-10}$	$1,00 \times 10^{-8}$
1B12.4H4	rhIL-1β	$2,61 \times 10^{-10}$	$6,00 \times 10^{-10}$	DVD3b	b-a-C	короткий	$1,24 \times 10^{-9}$	$1,90 \times 10^{-10}$	$7,00 \times 10^{-10}$	$4,00 \times 10^{-10}$
				DVD4b	b-a-C	довгий	$5,60 \times 10^{-10}$	$1,28 \times 10^{-10}$	$3,50 \times 10^{-10}$	$5,00 \times 10^{-10}$
				DVD5a	a-b-C	короткий	$5,08 \times 10^{-10}$	$1,25 \times 10^{-8}$	$2,60 \times 10^{-9}$	$1,90 \times 10^{-8}$
6H3.1A4	rhIL-1α	$3,54 \times 10^{-10}$	$2,40 \times 10^{-10}$	DVD6a	a-b-C	довгий	$1,06 \times 10^{-9}$	$2,09 \times 10^{-9}$	$2,30 \times 10^{-9}$	$7,00 \times 10^{-8}$
6B12.4F6	rhIL-1β	$5,54 \times 10^{-10}$	$4,00 \times 10^{-10}$	DVD5b	b-a-C	короткий	$1,32 \times 10^{-8}$	$6,71 \times 10^{-10}$	$3,30 \times 10^{-9}$	$2,50 \times 10^{-10}$
				DVD6b	b-a-C	довгий	$8,20 \times 10^{-10}$	$6,97 \times 10^{-10}$	$1,00 \times 10^{-9}$	$7,50 \times 10^{-10}$

mAb = моноклональне антитіло; NA = нейтралізуюча активність не визначена.

Функціональна характеристика нових молекул DVD-Ig показала, що при будь-якій орієнтації молекули DVD-Ig з довгим лінкером діяли краще, ніж молекули з коротким лінкером, відносно зв'язування і нейтралізації обох антигенів. Що стосується молекул DVD-Ig з довгими лінкерами, молекули з орієнтацією b-a-C показали хороше зв'язування і нейтралізацію обох антигенів, в той час як молекули DVD-Ig з орієнтацією a-b-C показали хороше зв'язування і нейтралізацію IL-1 α і знижене зв'язування і нейтралізацію IL-1 β (наприклад, DVD4b в порівнянні з DVD4a). Молекула DVD-Ig, DVD4b, зв'язувалася з IL-1 α і IL-1 β і нейтралізувала їх з субнаномольною активністю і повністю зберігала зв'язувальні і нейтралізуючі властивості батьківських mAb.

Приклад 3. Одержання молекул DVD-Ig до mIL-1 α/β

Для дослідження ключових питань, що стосуються фармакокінетики, ефективності in vivo, проникнення в тканину і імуногенності молекул DVD-Ig, конструювали молекули DVD-Ig миші до IL-1 α/β миші, як описано нижче.

Приклад 3.1. Конструювання молекул DVD-Ig до mIL-1 α/β

Молекули DVD-Ig миші до IL-1 α/β миші конструювали з використанням двох моноклональних антитіл миші до IL-1 α/β миші (9H10 і 10G11), одержаних з миші з подвійним нокаутом по IL-1 α/β . Моноклональні антитіла миші до IL-1 α миші і моноклональні антитіла миші до IL-1 β миші (mAb) одержували імунізацією мишей з подвійним нокаутом по IL-1 α/β з використанням IL-1 α миші або IL-1 β миші, відповідно. Вибирали одне mAb миші до IL-1 α миші (клон 9H10) і одне mAb миші до IL-1 β миші (клон 10G11) і використовували для одержання молекул DVD-Ig до mIL-1 α/β . Тестували різні розміри лінкера і різні орієнтації доменів. Кінцеву функціональну молекулу DVD-Ig до mIL-1 α/β конструювали в орієнтації V(до mIL-1 β)-лінкер-V(до mIL-1 α)-константна область миші (C γ 2a і C κ). Способи клонування, експресії і очищення аналогічні таким для зв'язувального білка DVD-Ig до hIL-1 α/β . Клонування зв'язувального білка DVD-Ig до mIL-1 α/β здійснювали з використанням аналогічної ПЛР з перекриванням і гомологічної рекомбінації, як описано для DVD3-Ig до hIL-1 α/β . Послідовності зв'язувальних білків DVD-Ig до mIL-1 α/β представлені нижче в таблиці 17.

Таблиця 17

Амінокислотна послідовність зв'язувального білка DVD-Ig до mIL-1 α/β

Блок	Ідентифікатор послідовності	Послідовність
Область білка		12345678901234567890
Варіабельна область важкого ланцюга DVD-Ig до mIL-1 α/β	SEQ ID NO:143	EVQLQQSGPELVKPGTSVKMSCKTSGYTFTSYVMH WVKQKPGQGLEWIGYIIPYNDNTKYNEKFKGKATLT SDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARRNEYGGSS FFDYWGQGTTTLTVSSAKTTAPSVYPLAPQVILKESG PGILQPSQTLSTLCSFSGFSLSTYGTAVNWIRQPSG KGLEWLAQIGSDDRKLYNPFLKSRITLSEDTNSQV FLKITSVD EDSATYYCANGVMEYWGLGTSVTVSS
10G11 VH	SEQ ID NO:144	EVQLQQSGPELVKPGTSVKMSCKTSGYTFTSYVMH WVKQKPGQGLEWIGYIIPYNDNTKYNEKFKGKATLT SDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARRNEYGGSS FFDYWGQGTTTLTVSS
Лінкер	SEQ ID NO:78	AKTTAPSVYPLAP
9H10 VH	SEQ ID NO:145	QVILKESGPGILQPSQTLSTLCSFSGFSLSTYGTAVN WIRQPSGKGLEWLAQIGSDDRKLYNPFLKSRITLSE DTNSQVFLKITSVDTEDSATYYCANGVMEYWGLG TSVTVSS
CH	SEQ ID NO:146	AKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEP VTLTWNQSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTS STWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCP PCKCAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMLSPIVTCVV VDVSEDDPDVQISWFWNNVEVHTAQTQTHREDYNS TLRVVSALPIQHQQDWMSGKEFKCKVNNKDLPIPIER TISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMT

Блок	Ідентифікатор послідовності	Послідовність
Область білка		12345678901234567890
		KKQVTLTCMVTDMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNT EPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVH EGLHNHHTTKSFSRTPGK
Варіабельна область легкого ланцюга DVD-Ig до mIL-1α/β	SEQ ID NO:147	DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRGSGILHNYLVWY QQKQGKSPQLLVYSAKILADGVPSRFGSGSGTQY SLKINSLQPEDFGSYQCQHFWSPTFTFGSGTKLEIK RADAAPTVSIFPPSIVMTQTPKFLVLSAGDRVITICK ASQSVNHDVAWYQQMPGQSPKLLIYFASNRYTGVP DRFTGSGYGTDFTFITISTVQAEDLAVYFCQQDYSSP YTFGGGKLEIKR
10G11 VL	SEQ ID NO:148	DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRGSGILHNYLVWY QQKQGKSPQLLVYSAKILADGVPSRFGSGSGTQY SLKINSLQPEDFGSYQCQHFWSPTFTFGSGTKLEIK R
Лінкер	SEQ ID NO:70	ADAAPTVSIFPP
9H10 VL	SEQ ID NO:149	SIVMTQTPKFLVLSAGDRVITICKASQSVNHDVAWY QQMPGQSPKLLIYFASNRYTGVPDRFTGSGYGTDF TFTISTVQAEDLAVYFCQQDYSSPYTFGGGKLEIK R
CL	SEQ ID NO:150	ADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDIN VKWKIDGSEKNGVLNSWTDQDSKDYSTMSSTLT LTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC

Зв'язувальні білки DVD-Ig миші до mIL-1α/β зберігали афінність/активність *in vitro* і до IL-1α миші (mIL-1α), і до IL-1β миші (mIL-1β). У таблиці 18 представлена характеристика mAb 9H10 (до mIL-1α), 10G11 (до mIL-1β) і зв'язувальних білків DVD-Ig до mIL-1α/β.

5

Таблиця 18

Характеристика mDVD4-Ig

	Антиген	K _D (M)	IC ₅₀ (M)
9H10	mIL-1α	1,73×10 ⁻¹⁰	2,00×10 ⁻¹⁰
10G11	mIL-1β	2,30×10 ⁻¹⁰	3,70×10 ⁻¹⁰
mIL-1α/βDVD-Ig	mIL-1α	7,66×10 ⁻¹⁰	2,00×10 ⁻⁹
	mIL-1β	6,94×10 ⁻¹⁰	8,00×10 ⁻¹⁰

Приклад 3.2. Активність *in vivo* зв'язувальних білків DVD-Ig до mIL-1α/β в моделі ревматоїдного артриту

Терапевтичні ефекти DVD4-Ig до IL-1α, DVD4-Ig до IL-1β, комбінованих DVD4-Ig до IL-1α/до IL-1β і DVD4-Ig миші до IL-1α/β оцінювали на моделі індукованого колагеном артриту миші, добре відомій в цій галузі. У короткому викладі, самців миші DBA-1 імунізували в основу хвоста з використанням бичачого колагену II типу в CFA. Мишей повторно імунізували інтраперитонеально (i.p.) з використанням зимозану в день 21. Після початку захворювання в день 24-27 вибирали мишей і ділили на окремі групи по 10 мишей в кожній. Середні бали при оцінці артриту в контрольній групі і в протицитокиновій групі були порівнянними на початку лікування. Для нейтралізації IL-1 мишам через день інтраперитонеально ін'єктували 1-3 мг/кг mAb до IL-1α, mAb до IL-1β, комбінації mAb до IL-1α і до IL-1β або DVD4-Ig миші до IL-1α/β. Мишей обережно обстежували три рази на тиждень на зовнішні артритичні зміни в периферичних суглобах і визначали бали активності захворювання.

Блокада IL-1 терапевтичним способом ефективно знижувала тяжкість артриту, при цьому антитіло до IL-1β демонструвало більшу ефективність (24% зниження середніх балів при оцінці артриту в порівнянні з контрольною групою), ніж антитіло до IL-1α (10% зниження). Спостерігали адитивний ефект між антитілами до IL-1α і до IL-1β із 40% зниженням середніх балів при оцінці артриту у мишей, підданих лікуванню і mAb до IL-1α, і mAb до IL-1β. Несподівано, при одному і тому ж рівні дози лікування зв'язувальним білком mDVD-Ig демонструвало 47% зниження середніх балів при оцінці артриту, що свідчить про терапевтичну ефективність *in vivo*

зв'язувального білка mDVD-Ig. Аналогічну ефективність також спостерігали при вимірюваннях опухання суглоба в цій моделі на тваринах.

Приклад 3.3. Активність *in vivo* зв'язувального білка DVD-Ig миші до IL-1 α / β в моделі остеоартриту

Представлене вище дослідження показало, що блокада і IL-1 α , і IL-1 β з використанням комбінації антитіл до IL-1 α і IL-1 β миші, а також зв'язувальних білків DVD-Ig миші до IL-1 α / β миші була значно більш ефективною, ніж одне будь-яке антитіло окремо в моделі індукованого колагеном артрити миші (CIA) для ревматоїдного артрити (див., також, Wu et al. Nature Biotech. 25(11):1290-1297 (2007)). Ефективність терапії до IL-1 при остеоартриті (OA) досліджували на двох моделях OA на тваринах, тобто моделі нестабільності суглоба ("JEM") і дестабілізації медіального меніска ("DMM") на мишах.

Приклад 3.3.1. Активність *in vivo* моноклональних антитіл миші до IL-1 α миші і до IL-1 β миші на остеоартритичній моделі нестабільності суглоба (JIM) у миші

Приклад 3.3.1.A. Дизайн дослідження

Дизайн дослідження активності *in vivo* молекули DVD-Ig до mIL-1 α / β на остеоартритичній моделі нестабільності суглоба (JIM) у мишей представлений в таблиці 19. Всі групи включали 25 мишей ($n = 25$), що важать приблизно 30 грамів (BW = 30 г). Дослідження закінчували через 21 день. Самців мишей Swiss Webster (25/групу/момент часу) віком по два з половиною місяця, що утримуються по 5/клітку, анестезували з використанням анестезію ізофлураном. Наносили травму передньої хрестоподібної зв'язки (ACL) на праве і ліве коліно в день 0, намагаючись викликати пошкодження OA. Інтраперитонеальне (i.p.) введення інгібуючих IL-1 антитіл до IL-1 α (9H10) і IL-1 β (10G11) окремо і в комбінації починали в день нанесення травми ACL і продовжували кожного 4-ого дня (q4d) протягом 20 днів. Розріджувачем у випадку контролю без лікування був PBS. Збирали праве і ліве коліно в день 21, проводили оцінку в балах і охарактеризували гістологічні зміни. Дані аналізували з використанням тільки тих суглобів, які мали проліферативні відповіді, що свідчать про успішну стимуляцію нестабільності. Проліферативну відповідь/нестабільність оцінювали в 0-3 бали і в кінцевому аналізі використовували тільки нестабільні суглоби (бали 1, 2 або 3). Проводили оцінку в балах дегенерації медіального і латерального стегнового і великогомілкового хряща на тяжкість дегенерації хряща по шкалі 0-5 балів. Через чотири дні після введення останньої дози антитіла, у всіх тварин з кожної групи забирали кров для збирання сироватки. Маса тіла записували щотижня. У останній день тваринам (10 тваринам в групах 1, 2, 3, 4) вводили дозу зимозану А і забирали кров через 4 години (в кінці) для аналізу IL-6 (IL-1/ФНП-залежного) в сироватці. Тварин умертвляли в день 21 і збирали праве і ліве коліно в формалін.

Таблиця 19

Дизайн дослідження на остеоартритичній моделі нестабільності суглоба у тварин

Група лікування	Сполука	Шлях введення	Режим дозування
Група 1	Розріджувач 1 (PBS)	i.p.	Q4D (2 рази на тиждень)
Група 2	Антитіло до IL-1 α (9H10)	i.p.	Q4D (2 рази на тиждень)
Група 3	Антитіло до IL-1 β (10G11)	i.p.	Q4D (2 рази на тиждень)
Група 4	Антитіло до IL-1 α (9H10) і антитіло до IL-1 β (10G11)	i.p.	Q4D (2 рази на тиждень)

Приклад 3.3.1.B. Підготовка і аналіз тканини

Підготовка тканини. Після 2-3 днів в декальцифікуючому фіксаторі (Surgipath Decalifier, Surgipath Medical Ind., Inc., Richmond VA) обидва колінних суглоби відділяли від сторонньої тканини, заливали препарат у фронтальній площині і одержували зрізи. Брали один зріз від кожної тварини (2 суглоби/блок) приблизно в середній точці фронтальної площини. Всі зрізи мали товщину 8 мкм, і їх забарвлювали толуїдиновим синім. Мікроскопічні препарати досліджував сертифікований ветеринарний патолог, що не знав про позначення досліджуваних груп, і виставляв бали згідно з представленим нижче способом. Статистичний аналіз здійснювали з використанням Microsoft Excel, і він включав 2-сторонній t-критерій Стьюдента з порівнянням всіх досліджуваних груп з контрольною групою з використанням 95% довірчого інтервалу.

Гістологічна оцінка в балах суглобів. Проводили оцінку в балах дегенерації медіального і латерального стегнового і великогомілкового хряща на тяжкість дегенерації хряща з використанням наступної системи: глибина/міра втрати хондроцитів і протеогліканів з розростанням волокнистої сполучної тканини:

5 1 = поверхневе пошкодження, тангенціальний шар колагену відсутній на протязі 50% або більше поверхні зони або до 10% втрата протеогліканів і/або хондроцитів при фокальному або дифузному розподілі в зоні;

2 = втрата матриксу поширюється у верхню 1/4 на протязі 50% або більше області зони або до 25% втрата протеогліканів і/або хондроцитів при фокальному або дифузному розподілі в зоні;

10 3 = втрата матриксу поширюється у верхню 1/2 товщини хряща на протязі 50% або більше зони або до 50% втрата протеогліканів і/або хондроцитів при фокальному або дифузному розподілі в зоні;

15 4 = втрата матриксу поширюється через 3/4 товщини хряща на протязі 50% або більше зони або до 75% втрата протеогліканів і/або хондроцитів при фокальному або дифузному розподілі в зоні;

5 = втрата матриксу поширюється через всю товщину хряща на протязі 50% або більше зони або до 100% втрата протеогліканів і/або хондроцитів при фокальному або дифузному розподілі в зоні.

20 Приписували бали з урахуванням зонального (внутрішнього, середнього і зовнішнього) розподілу пошкоджень і бали (0-5) для кожного третього підсумовували для кожної області суглоба і потім для цілого суглоба.

Остеофіти (при оцінці найбільші на великогомілковій або стегновій поверхні) вимірювали з використанням цифрового програмного забезпечення (NIS-Elements версії 3.0).

25 Оцінка остеофіта = 1, 2 або 3 для невеликого, середнього або великого залежно від розміру:
невеликі остеофіти = 1 (до 150 мкм),
середні остеофіти = 2 (151-300 мкм),
великі остеофіти = 3 (>301 мкм).

30 Синовіальну реакцію описували і охарактеризували відносно типу запалення, і її міру, якщо була присутньою, не включали в оцінку в балах.

Визначали середнє \pm SE для кожного з різних параметрів для кожної тварини і підсумовували для одержання загальних балів оцінки суглоба.

35 Суглоби з гістологічними доказами стимуляції нестабільності визначали по присутності проліферативних змін в медіальній синовіальній оболонці і колатеральних зв'язках. Крім того, записували бали нестабільності для кожного суглоба згідно з наступними критеріями:

0 = відсутність нестабільності,

1 = слабка нестабільність (проліферативні зміни в зв'язках і крайових зонах від мінімальних до слабких),

2 = помірна нестабільність (помірні проліферативні зміни в зв'язках і крайових зонах),

40 3 = важка нестабільність (важкі проліферативні зміни в зв'язках і крайових зонах).

Результати. У кінцевому аналізі даних використовували тільки нестабільні суглоби з балами 1, 2 або 3 (або 2, 3). У кінцевому результаті дані аналізували швидше з урахуванням загальної кількості пошкоджених суглобів, ніж з урахуванням хворих тварин. Результати дослідження свідчать про те, що суглоби тварин, підданих лікуванню з використанням моноклональних антитіл до IL-1 α або IL-1 β , демонстрували дегенерацію хряща, аналогічну спостережуваній в оброблених розріджувачем контрольних суглобах. Однак, комбіноване лікування mAb миші до IL-1 α миші (9H10) і mAb миші до IL-1 β миші (10G11) значущо знижувало бали дегенерації медіального великогомілкового хряща. На фігурі 2 показані гістограми балів дегенерації хряща в суглобах тварин в різних досліджуваних групах.

50 Приклад 3.3.2. Активність *in vivo* зв'язувального білка DVD-Ig до mIL-1 α/β в остеоартритичній моделі нестабільності суглоба (JIM) у миші

Остеоартритичну модель нестабільності суглоба, як описано вище в прикладі 3.3.1, також використовували для порівняння ефективності терапії до IL-1, забезпечуваної комбінацією моноклонального антитіла миші до mIL-1 α (9H10) і моноклонального антитіла миші до mIL-1 β (10G11), з ефективністю зв'язувального білка DVD-Ig до mIL-1 α/β , одержуваного з двох моноклональних антитіл.

Приклад 3.3.2.A. Дизайн дослідження

60 Дизайн цього дослідження був аналогічним описуваному вище в прикладі 3.3.1. Самців мишей Swiss Webster (25/групу/момент часу) віком два з половиною місяця, що утримуються по 5/клітку, анестезували з використанням анестезію ізофлураном, кліпували область правого і

лівого коліна і готували для внутрішньосуглобової травми хрестоподібних зв'язок в день 0. Введення доз (почате в день 0, і.р.) здійснювали однократно кожні 4 дні (Q4D) і умертвляли тварин в день 21 (для групи 2). Введення доз (почате в день 0, і.р.) здійснювали три рази на тиждень, умертвляли тварин в день 21 (для груп 1, 3 і 4). Через чотири дні після останньої дози антитіла у всіх тварин з кожної групи забирали кров для збирання сироватки. Щотижня записували масу тіла. У останній день тваринам (10 тваринам в групах 1, 2, 3, 4) вводили дозу зимозану А і забирали кров через 4 години (в кінці) для аналізу IL-6 (IL-1/ФНП-залежного) в сироватці. Тварин піддавали евтаназії в день 21 і правий і лівий колінні суглоби збирали в формалін. Див. дизайн дослідження в таблиці нижче.

Таблиця 20

Дизайн дослідження на остеоартритичній моделі нестабільності суглоба на тваринах

Досліджувана група	Сполука	Шлях введення	Режим дозування	Рівень дози (мг/кг)
Група 1	Розріджувач 1 (PBS)	і.р.	3 рази на тиждень	6,7 мл/кг
Група 2	Антитіло до IL-1α (9H10) і антитіло до IL-1β (10G11)	і.р.	Q4D (3 рази на тиждень)	Антитіло до IL-1α в дозі 6 мг/кг (180 мкг/мишу) і антитіло до IL-1β в дозі 6 мг/кг (180 мкг/мишу)
Група 3	DVD-Ig до mIL-1α/β	і.р.	3 рази на тиждень	12 мг/кг (500 мкг/мишу)
Група 4	DVD-Ig до mIL-1α/β	і.р.	3 рази на тиждень	6 мг/кг (250 мкг/мишу)

Приклад 3.3.2.В. Підготовка і аналіз тканини

Підготовку тканини і гістологічну оцінку в балах суглобових хрящів суглобів тварин в різних досліджуваних групах здійснювали, як описано вище в прикладі 3.3.1.

Результати. Результати свідчать про те, що лікування мишей зв'язувальним білком DVD-Ig 10G11-9H10 до mIL-1α/β значущо інгібує прогресування остеоартриту ($p < 0,05$ в порівнянні з розріджувачем) з ефективністю, порівнянною з комбінацією батьківських mAb 9H10 і 10G11. На фігурі 3 показані гістограми балів дегенерації хряща в суглобах тварин в різних досліджуваних групах. Як показано на фігурі 3, результати лікування 6 або 12 мг/кг зв'язувального білка DVD-Ig були аналогічними по своїй ефективності відносно профілактики остеоартритичних пошкоджень. (Лікування з використанням 3 мг/кг зв'язувального білка DVD-Ig не надавало ефекту на дегенерацію хряща, і результати були аналогічними результатам для суглобів, оброблених розріджувачем. Див. приклад 3.3.3. нижче.) Результати цього дослідження свідчили про те, що лікування комбінацією моноклональних антитіл до IL-1α і до IL-1β або зв'язувальним білком DVD-Ig до IL-1α/β надавало значний позитивний вплив на гістопатологічні параметри на моделі остеоартриту миші.

Приклад 3.3.3. Проспективне дослідження на остеоартритичній моделі нестабільності суглоба для порівняння лікування моноклональним антитілом до IL-1β і іншими зв'язувальними білками

Проспективне дослідження здійснювали з використанням остеоартритичної моделі нестабільності суглоба для більш точного визначення, чи може мати місце достовірний ефект на бали дегенерації медіального великогомілкового хряща у тварин, підданих лікуванню моноклональним антитілом до IL-1β окремо, в порівнянні з іншими способами лікування. Ефект лікування моноклональним антитілом до IL-1β оцінювали в 21 день дослідження.

Приклад 3.3.3.А. Дизайн дослідження

Дизайн дослідження був аналогічним описуваному вище в прикладі 3.3.1.

Дизайн дослідження на остеоартритичній моделі нестабільності суглоба на тваринах в день 21

Досліджувана група	Сполука	Шлях введення	Режим дозування	Рівень дози (мг/кг)
Група 1	Розріджувач 1 (PBS)	i.p.	Q4D	6,7 мл/кг
Група 2	Антитіло до IL-1 α (9H10) і антитіло до IL-1 β (10G11)	i.p.	Q4D	Антитіло до IL-1 α в дозі 6 мг/кг (180 мкг/мишу) і антитіло до IL-1 β в дозі 6 мг/кг (180 мкг/мишу)
Група 3	Антитіло до IL-1 β (10G11)	i.p.	Q4D	12 мг/кг (360 мкг/мишу)
Група 4	Антитіло до IL-1 β (10G11)	i.p.	Q4D	6 мг/кг (180 мкг/мишу)
Група 5	Антитіло до IL-1 β (10G11)	i.p.	Q4D	3 мг/кг (90 мкг/миша)

Приклад 3.3.3.B. Підготовка і аналіз тканини

Підготовку тканини і гістологічну оцінку в балах суглобових хрящів з суглобів тварин в різних досліджуваних групах здійснювали, як описано вище в прикладі 3.3.1.

Результати. Як показано на фігурі 4, результати підтверджували дані попередніх досліджень, в яких аналогічні позитивні ефекти лікування відмічали при використанні комбінації моноклональних антитіл до IL-1 α і до IL-1 β , і лікування моноклональним антитілом до IL-1 β окремо не було ефективним в профілактиці дегенерації хряща при будь-якій тестованій дозі.

Приклад 3.3.4. Індукована зимозаном продукція інтерлейкіну-6 (IL-6) в дослідженні на моделі нестабільності суглоба

У дослідженні на ОА-моделі нестабільності суглоба для дослідження фармакодинамічних параметрів для визначення, чи є моноклональні антитіла до IL-1 α і до IL-1 β , а також зв'язувальний білок DVD-Ig до mIL-1 α/β функціональними і здатними нейтралізувати IL-1 α і IL-1 β in vivo, вимірювали індуковану зимозаном (IL-1 α - і IL-1 β -залежну) продукцію інтерлейкіну-6 (IL-6).

У короткому викладі, в день 21 дослідження моделі зимозан суспендували в розріджувачі PBS і поміщали в киплячу воду на півгодини, потім дозволяли охолоджуватися перед використанням. Потім мишам ін'єктували i.p. 50 мг/кг зимозану в суспензії (добре змішаній перед ін'єкцією) в 0,5 мл PBS. Потім мишам випускали кров через 4 години після ін'єкції зимозану. Збирали сироватки для вимірювань IL-6.

Результати. Як показано на фігурі 5, комбінація моноклонального антитіла до IL-1 α (6 мг/кг) і моноклонального антитіла до IL-1 β (6 мг/кг), а також зв'язувальний білок DVD-Ig до mIL-1 α/β (в концентрації 6 мг/кг або 12 мг/кг) значно нейтралізували індуковану зимозаном продукцію IL-6 в порівнянні з контрольними тваринами, яким вводили розріджувач. Таким чином, антитіла виявляли функціональну активність in vivo.

Приклад 3.3.5. Ефект лікування інгібуючими цитокіни антитілами на остеоартрит, індукований моделлю дестабілізації медіального меніска (DMM), у мишей SV129

Для дослідження ефекту активності антитіл до IL-1 α і до IL-1 β на уповільнення прогресування дегенерації хряща при остеоартриті також використовували альтернативну модель на тваринах. Остеоартритична модель дестабілізації медіального меніска (DMM) миші є менш інвазивною і запальною, ніж модель JIM (див. вище), і приводить до пошкоджень, головним чином, центральної області, що несе вагове навантаження, медіального великогомілкового плато і медіального виростка стегнової кістки. Тяжкість і локалізація пошкоджень після DMM більше відповідають одна одній в порівнянні з JIM.

Приклад 3.3.5.A. Дизайн дослідження

Самців мишей SV129, що важать приблизно 30 грамів, які утримуються по 5/клітку, анестезували в день 0 з використанням суміші кетамін/ксилазин, що вводиться інтраперитонеально (i.p.), і потім медіальну колатеральну зв'язку піддавали відділенню тупим шляхом і розтинали для відгинання меніска відносно стегнової кістки. Порожнину суглоба ушивали вікриловим швом 8-0. Шкіру з'єднували клеєм для ран. У випадку хибного хірургічного втручання, робили вертикальний розріз шкіри медіально відносно коліна і відкривали капсулу

- суглоба. Капсулу ушивали вікриловим швом 8-0 і шкіру з'єднували клеєм для ран. Потім групи тварин піддавали лікуванню інтраперитонеальними (і.р.) ін'єкціями антитіла або розріджувача згідно з дизайном дослідження, представленим в таблиці нижче. Двох наївних мишей, підібраних по статі, віку і лінії, також включали в дослідження. Тварин піддавали евтаназії після 8 тижнів лікування і збирали колінні суглоби в 10% нейтральний забуферений формалін.

Таблиця 22

Дизайн дослідження при використанні остеоартритичної моделі дестабілізації медіального меніска (DMM)

Досліджувана група	Сполука	Кількість тварин (n)	Доза, шлях і режим	Час умертвіння тварин
A	Хибна (немає)	5	немає	8 тижнів
B	Розріджувач (PBS)	10	і.р., 3 рази на тиждень	8 тижнів
C	mAb до IL-1 α і mAb до IL-1 β	11	180 мкг/мишу для кожного антитіла, і.р., кожного 4-ого дня	8 тижнів
D	DVD-Ig до mIL-1 α/β	10	250 мкг/мишу, і.р., 3 рази на тиждень	8 тижнів

Приклад 3.3.5.В. Дослідження тканин

- Фіксовані формаліном зразки декальцифікували і одержували середовища зразків у фронтальній площині по 15 послідовних зрізів кожний. Кожний зріз становив приблизно 6 мкм в товщину, і послідовні зрізи відділяли на 70 мкм. Всі мікроскопічні препарати забарвлювали толуїдиновим синім (T. Blue). Сертифікований ветеринарний патолог оцінював зрізи способом Chambers (Chambers et al. (2001) Arthritis Rheum, 44:1455-65) на дегенерацію хряща (див. нижче). Проводили оцінку в балах 0-6 по шкалі, представлений в таблиці нижче, для кожної з чотирьох поверхонь хряща, медіальний виросток стегнової кістки (MFC), медіальне великогомілкове плато (MTP), латеральний виросток стегнової кістки (LFC) і латеральне великогомілкове плато (LTP).

Таблиця 23

Система оцінки в балах Chambers для дегенерації хряща

Міра	Остеоартритичне пошкодження
0	Відсутність пошкодження
1	Шорстка суглобова поверхня і невеликі розростання сполучної тканини
2	Розростання сполучної тканини нижче безпосередньо поверхневого шару (зона 2) і деяка втрата поверхневої пластинки
3	Втрата поверхневої пластинки і розростання сполучної тканини, поширюване в кальцифікований хрящ
4	Значні розростання сполучної тканини і ерозія хряща до субхондральної кістки
5	Значні розростання сполучної тканини і ерозія хряща до 80%
6	Втрата хряща до 80%

- Статистичний аналіз здійснювали з використанням програмного забезпечення GraphPad Prism версії 4.03 з використанням критерію Уїтні.

Приклад 3.3.5.С. Результати

- Як показано на фігурі 6, комбіноване лікування з використанням моноклонального антитіла до IL-1 α миші (9H10, 6 мг/кг) і моноклонального антитіла до IL-1 β миші (10G11, 6 мг/кг) або з використанням зв'язувального білка DVD-Ig до IL-1 α/β (6 мг/кг) значущо знижувало дегенерацію хряща в остеоартритичній моделі DMM миші.

Приклад 3.3.6. Титрування антитіл до IL-1 α і антитіл до IL-1 β у мишей в остеоартритичній моделі дестабілізації медіального меніска (DMM) (8-тижневе дослідження)

- Проводили 8-тижневе дослідження ефектів на дегенерацію хряща у відповідь на різні дози моноклонального антитіла до mIL-1 α (mAb 9H10) і моноклонального антитіла до mIL-1 β (mAb

10G11) окремо або в комбінації і зв'язувального білка DVD-Ig до mIL-1 α / β 10G11-9H10 в остеоартритичній моделі DMM.

Приклад 3.3.6.A. Дизайн дослідження

Самців мишей SV129 масою приблизно 30 грамів, що утримуються по 5/клітку, анестезували в День 0 з використанням суміші кетамін/ксилазин, що вводиться інтраперитонеально (і.р.), і потім медіальну колатеральну зв'язку піддавали тупому відділенню і розтинали для відгинання меніска відносно стегнової кістки. Порожнину суглоба ушивали вікриловим швом 8-0. Шкіру з'єднували клеєм для ран. У випадку хибного хірургічного втручання, вертикальний розріз шкіри робили медіально відносно коліна і відкривали капсулу суглоба. Капсулу ушивали вікриловим швом 8-0 і шкіру з'єднували клеєм для ран. Потім групи тварин піддавали лікуванню інтраперитонеальними (і.р.) ін'єкціями моноклонального антитіла до mIL-1 α , до mIL-1 β (окремо або в комбінації), зв'язувальним білком DVD-Ig до mIL-1 α / β або розріджувачем, згідно з дизайном дослідження, представленим в таблиці нижче (таблиця 24). Тварин піддавали евтаназії через 8 тижнів лікування і збирали колінні суглоби в 10% нейтральний забуферений формалін.

Таблиця 24

Дизайн дослідження для тестування різних способів лікування в остеоартритичній моделі DMM

Досліджувана група	Сполука	Кількість тварин (n)	Доза, шлях і режим	Час умертвіння тварин
A	Хибна (немає)	5	немає	8 тижнів
B	Розріджувач (PBS)	10 (9)	і.р., 3 рази на тиждень	8 тижнів
C	Антитіло до IL-1 α (9H10)	10 (5)	180 мкг/мишу, і.р., кожного 4-ого дня	8 тижнів
D	Антитіло до IL-1 β (10G11)	10 (8)	180 мкг/мишу, і.р., кожного 4-ого дня	8 тижнів
E	Антитіло до IL-1 α (9H10) + антитіло до IL-1 β (10G11)	10 (8)	180 мкг/мишу для кожного антитіла, і.р., кожного 4-ого дня	8 тижнів
F	DVD-Ig до mIL-1 α / β	10 (9)	62,5 мкг/мишу, і.р., 3 рази на тиждень	8 тижнів
G	DVD-Ig до mIL-1 α / β	10	125 мкг/мишу, і.р., 3 рази на тиждень	8 тижнів
H	DVD-Ig до mIL-1 α / β	10	250 мкг/мишу, і.р., 3 рази на тиждень	8 тижнів

Числа в дужках в колонці 3 наведеної вище таблиці (кількість тварин) являють собою точну кількість тварин, включених в набір даних. Короткий опис критеріїв виключення представлений нижче.

Група B. Тільки 9 тварин включали в групу B. Одну тварину виключали з набору даних, оскільки при гістологічному дослідженні медіальний меніск був інтактним і, по суті, не спостерігали остеоартритичних змін.

Група C. Тільки 5 тварин включали в групу C. П'ять тварин виключали з набору даних, оскільки при гістологічному дослідженні медіальний меніск був, головним чином, інтактним і спостерігали невелику остеоартритичну зміну.

Група D. Тільки 8 тварин включали в групу D. Мікроскопічні препарати для однієї тварини були відсутні. Іншу тварину виключали з набору даних, оскільки при гістологічному дослідженні медіальний меніск був, головним чином, інтактним і спостерігали невелику остеоартритичну зміну.

Група E. Тільки 8 тварин включали в групу E. Двох тварин виключали, оскільки дані для них вважали статистичними викидами.

Група F. Тільки 9 тварин включали в групу F. Одну тварину виключали з набору даних, оскільки при гістологічному дослідженні медіальний меніск був інтактним і, по суті, не спостерігали остеоартритичних змін.

Приклад 3.3.6.B. Підготовка і аналіз тканини

Одержували тканини і проводили оцінку в балах, як описано вище в прикладі 3.3.5.

Приклад 3.3.6.C. Результати

Результати представлені на фігурі 7. Аналогічно результатам, одержаним на остеоартритичній моделі нестабільності суглоба (JIM) (див. вище), лікування моноклональним антитілом до IL-1 α (9H10) або моноклональним антитілом до IL-1 β (10G11) окремо приводило до зниження дегенерації хряща, відмінності якого зі спостережуваним при використанні розріджувача у випадку контрольних суглобів не були статистично значущими. Однак, комбіноване лікування з використанням моноклональних антитіл або зв'язувального білка DVD-Ig до IL-1 α / β (за винятком DVD-Ig до IL-1 α / β при 1,5 мг/кг) значущо знижувало середню суму балів по шкалі Chambers (що свідчить про загальну дегенерацію хряща) і середній максимум балів по шкалі Chambers (найбільш пошкоджена область в суглобі). Статистично значущий ефект дози спостерігали для середньої суми балів по шкалі Chambers в досліджуваних групах DVD-Ig до mIL-1 α / β . Таким чином, в цьому дослідженні 8 тижнів лікування з використанням моноклонального антитіла до mIL-1 α і моноклонального антитіла до mIL-1 β (6 мг/кг, кожного) і з використанням зв'язувального білка DVD-Ig до mIL-1 α / β (при дозі 3 і 6 мг/кг) знижувало прогресування дегенерації хряща, індуковане в остеоартритичній моделі DMM.

Приклад 3.3.7. Ефекти лікування антитілами до IL-1 α і до IL-1 β і низькомолекулярними сполуками на дегенерацію хряща у тварин в остеоартритичній моделі дестабілізації медіального меніска (DMM)

Показано, що доксициклін запобігає дегенерації хряща в остеоартритичній моделі DMM (Effects of Disease-modifying Osteoarthritis Drugs in an in vivo Animal Model ISilva et al., Univ. Mass. Med. School, Worcester, MA, USA, Trans ORS 2009 - необхідне повне цитування), а також в клінічному випробуванні на людях (Brandt et al. (2005) Arthrit. Rheum. 52(7):2015-2025). В цьому дослідженні ефект лікування тварин на моделі DMM з використанням доксицикліну порівнювали з ефектом лікування тварин з використанням комбінації моноклональних антитіл до IL-1 α і до IL-1 β .

Приклад 3.3.7.A. Дизайн дослідження

Медіальну колатеральну зв'язку самців мишей SV129 масою приблизно 30 грамів піддавали тупому відділенню і розтинали її для відгинання меніска відносно стегнової кістки. Порожнину суглоба ушивали вікриловим швом 8-0. Шкіру з'єднували клеєм для ран. У випадку хибних хірургічних втручань робили вертикальний розріз шкіри медіально відносно коліна і відкривали капсулу суглоба. Капсулу ушивали вікриловим швом 8-0 і з'єднували шкіру клеєм для ран. Потім групи тварин піддавали лікуванню перорально (р.о.) або за допомогою інтраперитонеальних (і.р.) ін'єкцій розріджувача або лікарських засобів згідно з дизайном дослідження, представленим в таблиці нижче. У дослідження також включали трьох наївних мишей, придатних по статі, віку і лінії. Тварин піддавали евтаназії через 4 тижні лікування і збирали колінні суглоби в 10% нейтральний забуферений формалін.

Таблиця 25

Дизайн дослідження для тестування різних способів лікування антитілами до IL-1 і лікування доксицикліном в остеоартритичній моделі DMM

Досліджувана група	Сполука	Кількість тварин (n)	Доза, шлях і режим	Час умертвіння тварин
A	Хибна (немає)	3	немає	4 тижні
B	Розріджувач (0,02% Tween 80/0,5% HPMS)	10	р.о., BID	4 тижні
C	Доксициклін	10	30 мг/кг, р.о., BID	4 тижні
D	Антитіло до IL-1 α (9H10) + антитіло до IL-1 β (10G11)	10	180 мкг/мишу для кожного антитіла, і.р. кожного 4-ого дня	4 тижні

Приклад 3.3.7.B. Підготовка і аналіз тканини

Одержували тканини і проводили оцінку в балах, як описано вище в прикладі 3.3.5.

Приклад 3.3.7.C. Результати

Результати представлені на фігурі 8. В умовах дослідження 4 тижнів лікування з використанням комбінації моноклональних антитіл до IL-1 α і до IL-1 β в дозі 180 мкг/мишу кожне приводило до значного зниження остеоартритичних змін, індукованих дестабілізацією медіального меніска у самців мишей SV129. Середня сума балів по шкалі Chambers і середні максимальні бали по шкалі Chambers значно знижувалися, і середня загальна сума балів по

шкалі Chambers значно знижувалася внаслідок цього комбінованого лікування в порівнянні з контрольною групою при використанні розріджувача. Лікування доксицикліном при дозі 30 мг/кг також приводило до аналогічного терапевтичного ефекту, але комбіноване лікування антитілами було більш ефективним.

5 Приклад 4. Ефективність терапії до IL-1 α / β при лікуванні болю

З використанням моделі DMM також одержували вимірюваний біль у мишей. Нещодавно, Malfait et al. (див., Malfait et al. (2010) Osteoarthritis Cartilage, 18:572-580) показали стійке зниження порога відсмикування кінцівки (свідчення механічного алодинічного болю) в задніх кінцівках після DMM, але не після "хибної" операції. Ефективність терапії до IL-1 α / β досліджували на моделі DMM на тваринах. Як показано в цій серії досліджень, миші з хірургічним втручанням DMM виявляли алодинію вже в день 7 після хірургічного втручання і демонстрували зниження порога відсмикування кінцівки до дня 35.

Потенціал терапії до IL-1 в зниженні болю тестували на моделі OA DMM миші відносно механічної алодинії. Введення доз комбінації mAb до IL-1 α і до IL-1 β починали в день хірургічного втручання і повторювали двічі на тиждень протягом 5 тижнів. Тварин піддавали лікуванню розріджувачем PBS окремо, з IgG-ізотипічним контролем або з комбінацією mAb до IL-1 α і до IL-1 β (при дозі 6 мг/кг для кожного mAb). Тварин щотижня тестували на поріг відсмикування кінцівки. Іпсилатеральна (піддана хірургічному втручання) кінцівка в групах, підданих лікуванню PBS або IgG-ізотипічним контролем, виявляла алодинію (була хворобливою) в порівнянні з контралатеральною (не підданою хірургічному втручання) кінцівкою або в порівнянні з тваринами, підданими "хибній" операції. Див. фігуру 9. Навпаки, група, піддана лікуванню комбінацією mAb до IL-1 α і до IL-1 β , демонструвала значно більш високий поріг відсмикування кінцівки, що свідчить про зниження розвитку алодинії (болю) в порівнянні з групами, підданими лікуванню розріджувачем PBS або IgG-ізотипічним контролем на тижні 5 (день 35). Див. фігуру 10. Це зниження болю спостерігали вже на тижні 1 після лікування (дані не представлені).

Для оцінки ефекту терапії IL-1 при розвиненому болю тварин в групі IgG-контролю з розвиненим OA і механічною алодинією піддавали лікуванню в день 35 з використанням комбінації моноклональних антитіл до IL-1 α і до IL-1 β і тестували поріг відсмикування кінцівки через 24 години (день 36). Дані показали, що комбіноване лікування mAb до IL-1 α і до IL-1 β реверсувало алодинію (знижувало біль при OA) у тварин з розвиненим захворюванням. Ці дані свідчать про те, що терапія до IL-1 забезпечує анальгезуючий ефект незалежно від потенційного, модифікуючого захворювання ефекту. Див. фігуру 11.

35 Приклад 5. Подальше дослідження ефективності комбінованого лікування до IL-1 α / β при лікуванні болю

Додатково оцінювали потенціал терапії до IL-1 для зниження болю моделі OA DMM миші (див. вище) відносно механічної алодинії. Введення доз комбінації mAb до IL-1 α і до IL-1 β починали в день хірургічного втручання і повторювали двічі на тиждень протягом 4 тижнів. Тварин після DMM піддавали лікуванню з використанням тільки розріджувача PBS, mAb до IL-1 α (6 мг/кг), mAb до IL-1 β (6 мг/кг) або комбінації mAb до IL-1 α mAb (6 мг/кг) і до IL-1 β (6 мг/кг), що вводяться інтраперитонеально (і.р.) двічі на тиждень протягом чотирьох тижнів. Тварин тестували на алодинію в день 28. Іпсилатеральні (піддані хірургічному втручання) кінцівки в групах, підданих лікуванню розріджувачем, виявляли алодинію (були хворобливими) в порівнянні з контралатеральною (не підданою хірургічному втручання) кінцівкою або в порівнянні з тваринами, підданими "хибній" операції. Див. фігуру 12. Аналогічно, кінцівки в групі, підданій лікуванню mAb до IL-1 α або до IL-1 β окремо, виявляли алодинію (були хворобливими). Навпаки, група, піддана лікуванню комбінацією mAb до IL-1 α і до IL-1 β , демонструвала значно більш високий поріг відсмикування кінцівки, що свідчить про зниження розвитку алодинії (болю) в порівнянні з групами, підданими лікуванню розріджувачем (фігура 12).

50 Приклад 6. Дозозалежна ефективність комбінованого лікування до IL-1 α / β при лікуванні болю

Введення тваринам в моделі DMM миші доз комбінації mAb до IL-1 α і до IL-1 β починали в день хірургічного втручання і повторювали двічі на тиждень протягом чотирьох тижнів. Тварин піддавали лікуванню тільки розріджувачем PBS або комбінацією mAb до IL-1 α і mAb до IL-1 β , що вводяться інтраперитонеально (і.р.) кожні чотири дні протягом чотирьох тижнів в концентрації 1 мг/кг, в концентрації 3 мг/кг або в концентрації 6 мг/кг. У день 28 тварин тестували на поріг відсмикування кінцівки. Іпсилатеральні (піддані хірургічному втручання) кінцівки в групах, підданих лікуванню розріджувачем, демонстрували значне зниження порога відсмикування кінцівки, що свідчить про алодинію (біль) в порівнянні з контралатеральною (не підданою хірургічному втручання) кінцівкою або в порівнянні з тваринами, підданими "хибній"

операції (фігура 13). Навпаки, група, піддана лікуванню комбінацією mAb до IL-1 α і до IL-1 β , демонструвала дозозалежне підвищення порога відсмикування кінцівки, що свідчить про зниження розвитку алодинії (болю) в порівнянні з групами, підданими лікуванню розріджувачем (фігура 13).

5 Приклад 7. Комбіноване лікування до IL-1 α / β при розвиненому болю

Для оцінки ефекту комбінованого лікування до IL-1 α / β при розвиненому болю, тварин в моделі DMM миші з розвиненим ОА і механічною алодинією піддавали лікуванню в день 27 з використанням комбінації mAb до IL-1 α і mAb до IL-1 β , що вводяться інтраперитонеально (i.p.) в концентрації 1 мг/кг, в концентрації 3 мг/кг або в концентрації 6 мг/кг за 24 години до тестування на алодинію в день 28. Результати представлені на фігурі 14. Дані демонстрували, що комбіноване лікування mAb до IL-1 α і до IL-1 β реверсувало механічну алодинію (знижувало біль при ОА) у тварин з розвиненим захворюванням дозозалежним чином (фігура 14).

10 Приклад 8. Антигіпералгезичний ефект комбінованого лікування до IL-1 α / β

Для оцінки того, чи викликає нейтралізація IL-1 α і IL-1 β антиноцицептивні ефекти в умовах запального болю, mAb до IL-1 α і до IL-1 β оцінювали на здатність реверсувати розвинений біль в кінцівці миші на моделі індукованого карагеном ноцицептивного болю.

Ефективність mAb до IL-1 α і до IL-1 β оцінювали при введенні окремо або в комбінації на моделі індукованого карагеном болю у миші (фігура 15). Через 30 годин після внутрішньопідошовної ін'єкції карагену: 900 мкг mAb до IL-1 α , mAb до IL-1 β або їх комбінації вводили різним групам мишей. Тестування термічною гіпералгезією здійснювали через 48 і 96 годин після введення карагену. Як показано в попередньому дослідженні, доза комбінації 900 мкг значно знижувала термічну гіпералгезію (кінцівка, в яку вводили карагенан - 8,11 \pm 0,62 сек. в порівнянні з 4,98 \pm 0,34 сек. в групі PBS через 48 годин, $p < 0,01$, фігура 15A; кінцівка, в яку вводили карагенан 7,62 \pm 0,45 сек. в порівнянні з 4,45 \pm 0,55 сек. в групі PBS через 96 годин, $p < 0,01$, фігура 15B). Антиноцицептивний ефект в групі, якій вводили 900 мкг комбінації, становив 53 \pm 7% через 48 годин і 82 \pm 11% через 96 годин. Група позитивного контролю диклофенаку (нестероїдного протизапального анальгетика) знов виявляла значне зниження термічної гіпералгезії ($p < 0,01$ для обох моментів часу). Навпаки, не спостерігали значного антиноцицептивного ефекту в обох моментах часу при введенні mAb до IL-1 α і до IL-1 β окремо, що свідчить про необхідність одночасної нейтралізації IL-1 α і IL-1 β для антиноцицептивної ефективності в моделі індукованого карагеном запального болю у мишей.

30 Приклад 9. Дозозалежний антигіпералгезичний ефект комбінованого лікування до IL-1 α / β

Як показано на фігурі 16, внутрішньопідошовна ін'єкція карагену у мишей (самиць BALB/c) приводила до тривалої термічної гіпералгезії, про що свідчить зниження затримки відсмикування кінцівки у відповідь на стимуляцію променистим теплом (тестування здійснювали через 48 і 96 годин після ін'єкції карагену; $p < 0,01$ для непошкодженого контролю в порівнянні з кінцівками, в які вводили карагенан, в групі, якій вводили розріджувач PBS, в обох моментах часу). Різні групи тварин піддавали лікуванню розріджувачем або комбінацією mAb до IL-1 α і до IL-1 β (100, 300 або 900 мкг/мишу кожного mAb) через 30 годин після ін'єкції карагену. Спостерігали дозозалежний ефект, при цьому доза 900 мкг комбінації mAb до IL-1 α і до IL-1 β значно знижувала термічну гіпералгезію (кінцівка, в яку вводили карагенан - 3,23 \pm 0,34 сек. в групі PBS в порівнянні з 7,88 \pm 0,93 сек. в групах, яким вводили 900 мкг, через 48 годин, $p < 0,01$, фігура 16A; кінцівка, в яку вводили карагенан - 4,45 \pm 0,55 сек. в групі PBS в порівнянні з 7,62 \pm 0,45 сек. в групах, яким вводили 900 мкг, через 96 годин, $p < 0,01$, фігура 16B). Антиноцицептивний ефект в групі, якій вводили 900 мкг, становив 70 \pm 9% через 48 годин і 62 \pm 4% через 96 годин. Нестероїдний протизапальний анальгетик диклофенак (30 мг/кг) включали в дослідження як позитивний контроль, і він підвищував середню затримку відсмикування кінцівки у випадку пошкодженої кінцівки до 7,01 \pm 0,58 сек. через 48 годин і 7,48 \pm 0,34 сек. через 96 годин при введенні р.о. за 60 хвилин перед тестуванням ($p < 0,01$ в обох моментах часу). У групах IgG-контролю і низької дози mAb 100 мкг термічна гіпералгезія не знижувалася в будь-який момент часу. mAb і диклофенак не змінювали значення затримки відсмикування кінцівки у випадку контрольної непошкодженої кінцівки.

50 Приклад 10. Ефективність комбінованого лікування до IL-1 α / β в моделі болю CFA

Модель запального болю, індукованого CFA (повним ад'ювантом Фрейнда), використовували для тестування того, чи буде комбінація mAb до IL-1 α і до IL-1 β мати ефективність до механічної алодинії. Таким чином, механічну алодинію оцінювали з використанням мононитки фон Фрея у тварин (самиць мишей BALB/c) через 48 годин після внутрішньопідошовних ін'єкцій CFA. Як показано на фігурі 17A, внутрішньопідошовна ін'єкція CFA викликає стійку механічну алодинію, про що свідчить знижений поріг відсмикування кінцівки в кінцівці, в яку ін'єктували CFA, підданій лікуванню тільки розріджувачем PBS

($0,052 \pm 0,028$ г в порівнянні з $0,860 \pm 0,090$ г в контралатеральній непошкодженій кінцівці, $p < 0,01$). Окремі групи тварин піддавали лікуванню IgG-ізотипічним контролем або комбінацією mAb до IL-1 α і до IL-1 β (900 мкг/мишу кожного mAb) через 30 годин після ін'єкції CFA. Група, піддана лікуванню mAb, демонструвала значне зниження механічної алодинії ($0,419 \pm 0,101$ г, $p < 0,01$ в порівнянні з розріджувачем PBS, фігура 17A). Величина ефективності (% MPE) становила $65,51 \pm 12,35\%$ (фігура 17B). Протизапальний анальгетик диклофенак, використовуваний як позитивний контроль (30 мг/кг, за 1 годину до лікування), також знижував механічну алодинію, підвищуючи поріг відсмикування кінцівки ($0,359 \pm 0,088$ г, $p < 0,01$ в порівнянні з розріджувачем PBS) з %MPE $64,51 \pm 10,20\%$.

Приклад 11. Ефективність комбінованого лікування до IL-1 α/β при нейропатичному болю

На моделі лігатури спінального нерва L5/L6 (SNL) у мишей (самців CD1) досліджували, чи буде комбіноване лікування mAb до IL-1 α і до IL-1 β мати ефективність в умовах нейропатичного болю. Тестування здійснювали через шість днів після хірургічного втручання SNL, через 24 і 72 години після цього тварин піддавали лікуванню комбінацією mAb (900 мкг/мишу кожного mAb). Спостерігали механічну алодинію у мишей, підданих лікуванню тільки розріджувачем PBS після хірургічного втручання SNL, про що свідчить знижений поріг відсмикування кінцівки у відповідь на стимуляцію монониткою фон Фрея ($0,073 \pm 0,032$ г в порівнянні з $0,735 \pm 0,109$ г для контралатеральної кінцівки через 24 години, фігура 18A; $0,128 \pm 0,048$ г в порівнянні з $0,732 \pm 0,132$ г для контралатеральної кінцівки через 72 години, фігура 18B; $p < 0,01$ в обох моментах часу). Група, піддана лікуванню mAb, демонструвала значне зниження механічної алодинії в обох моментах часу ($0,477 \pm 0,131$ г, $p < 0,01$ в порівнянні з розріджувачем PBS через 24 години, фігура 18A; $0,527 \pm 0,111$ г, $p < 0,01$ в порівнянні з розріджувачем PBS через 72 години, фігура 18B). Величина ефективності (% MPE) становила $72,20 \pm 14,39\%$ через 24 години і $80,62 \pm 12,33\%$ через 72 години (фігура 19). Позитивний контроль габапентин (100 мг/кг, за 1 годину до лікування) був повністю ефективним в зниженні механічної алодинії, значно підвищуючи поріг відсмикування кінцівки ($0,858 \pm 0,077$ г через 24 години і $1,138 \pm 0,096$ г через 72 години, $p < 0,01$ в порівнянні з розріджувачем PBS в обох моментах часу). Навпаки, група IgG-контролю не демонструвала якого-небудь ефекту на механічну алодинію в обох моментах часу.

Висновки лікування болю

Результати досліджень болю, представлених в рамках винаходу, свідчать про те, що комбіноване лікування до IL-1 за винаходом є ефективним як лікування будь-якої форми болю і не тільки болю, асоційованого з остеоартритом. Таке комбіноване лікування до IL-1 α/β можна використовувати для лікування болю у індивідуума, страждаючого будь-яким типом болю, включаючи, як необмежувальні приклади, алодинію, гіпералгезію і комбінацію алодинії і гіпералгезії. Можна проводити комбіноване лікування до IL-1 α/β для індивідуума за допомогою введення індивідууму комбінації (наприклад, у вигляді суміші, при одночасному введенні або послідовному введенні) зв'язувальних білків до IL-1 α і до IL-1 β , такої як комбінація моноклональних антитіл до IL-1 α і до IL-1 β , або за допомогою введення індивідууму білка, що зв'язується і з IL-1 α , і з IL-1 β , такого як біспецифічне антитіло або зв'язувальний білок DVD-Ig до IL-1 α/β , що зв'язується і з IL-1 α , і з IL-1 β .

Включення як посилання

Зміст всіх наведених посилань (включаючи літературні джерела, патенти, патентні заявки і веб-сайти), які могли бути процитовані протягом всієї цієї заявки, таким чином, визначено включають як посилання в повному обсязі, як і посилання, цитовані в них. У практичному здійсненні даного винаходу застосовують, якщо не указано інакше, загальноприйняті способи фармації, імунології, молекулярної біології і клітинної біології, добре відомі в цій галузі.

Еквіваленти

Винахід можна здійснювати в інших конкретних формах без відхилення від його суті або важливих властивостей. Наведені вище варіанти здійснення, таким чином, необхідно розглядати як у всіх відношеннях ілюстративні і необмежуючі винахід, представлений в рамках опису. Таким чином, обсяг винаходу швидше наведений в формулі винаходу, а не представлено у вищевказаній формі, і всі зміни, що знаходяться в межах значення і діапазону еквівалентності формули винаходу, таким чином, необхідно включати в рамки винаходу.

СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Abbott Laboratories
KAMATH, Rajesh V.

<120> Лікування остеоартриту і болю

<130> AET-122.1 PCT (10918W001)

<140> PCT/US2012/024356
<141> 2012-02-08

<150> US 61/440,853
<151> 2011-02-08

<160> 151

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 271
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ala Lys Val Pro Asp Met Phe Glu Asp Leu Lys Asn Cys Tyr Ser
1 5 10 15

Glu Asn Glu Glu Asp Ser Ser Ser Ile Asp His Leu Ser Leu Asn Gln
20 25 30

Lys Ser Phe Tyr His Val Ser Tyr Gly Pro Leu His Glu Gly Cys Met
35 40 45

Asp Gln Ser Val Ser Leu Ser Ile Ser Glu Thr Ser Lys Thr Ser Lys
50 55 60

Leu Thr Phe Lys Glu Ser Met Val Val Val Ala Thr Asn Gly Lys Val
65 70 75 80

Leu Lys Lys Arg Arg Leu Ser Leu Ser Gln Ser Ile Thr Asp Asp Asp
85 90 95

Leu Glu Ala Ile Ala Asn Asp Ser Glu Glu Glu Ile Ile Lys Pro Arg
100 105 110

Ser Ala Pro Phe Ser Phe Leu Ser Asn Val Lys Tyr Asn Phe Met Arg
115 120 125

Ile Ile Lys Tyr Glu Phe Ile Leu Asn Asp Ala Leu Asn Gln Ser Ile
130 135 140

Ile Arg Ala Asn Asp Gln Tyr Leu Thr Ala Ala Ala Leu His Asn Leu
145 150 155 160

```

Asp Glu Ala Val Lys Phe Asp Met Gly Ala Tyr Lys Ser Ser Lys Asp
      165                      170                      175

Asp Ala Lys Ile Thr Val Ile Leu Arg Ile Ser Lys Thr Gln Leu Tyr
      180                      185                      190

Val Thr Ala Gln Asp Glu Asp Gln Pro Val Leu Leu Lys Glu Met Pro
      195                      200                      205

Glu Ile Pro Lys Thr Ile Thr Gly Ser Glu Thr Asn Leu Leu Phe Phe
      210                      215                      220

Trp Glu Thr His Gly Thr Lys Asn Tyr Phe Thr Ser Val Ala His Pro
      225                      230                      235                      240

Asn Leu Phe Ile Ala Thr Lys Gln Asp Tyr Trp Val Cys Leu Ala Gly
      245                      250                      255

Gly Pro Pro Ser Ile Thr Asp Phe Gln Ile Leu Glu Asn Gln Ala
      260                      265                      270

<210>  2
<211> 153
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400>  2

Ala Pro Val Arg Ser Leu Asn Cys Thr Leu Arg Asp Ser Gln Gln Lys
  1                      5                      10                      15

Ser Leu Val Met Ser Gly Pro Tyr Glu Leu Lys Ala Leu His Leu Gln
      20                      25                      30

Gly Gln Asp Met Glu Gln Gln Val Val Phe Ser Met Ser Phe Val Gln
      35                      40                      45

Gly Glu Glu Ser Asn Asp Lys Ile Pro Val Ala Leu Gly Leu Lys Glu
      50                      55                      60

Lys Asn Leu Tyr Leu Ser Cys Val Leu Lys Asp Asp Lys Pro Thr Leu
      65                      70                      75                      80

Gln Leu Glu Ser Val Asp Pro Lys Asn Tyr Pro Lys Lys Lys Met Glu
      85                      90                      95

Lys Arg Phe Val Phe Asn Lys Ile Glu Ile Asn Asn Lys Leu Glu Phe
      100                      105                      110

```

Glu Ser Ala Gln Phe Pro Asn Trp Tyr Ile Ser Thr Ser Gln Ala Glu
115 120 125

Asn Met Pro Val Phe Leu Gly Gly Thr Lys Gly Gly Gln Asp Ile Thr
130 135 140

Asp Phe Thr Met Gln Phe Val Ser Ser
145 150

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

<400> 3

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> 4
<211> 330
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

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> 5
<211> 106
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

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> 6
<211> 105
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

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> 7
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> Xaa може бути будь-якою амінокислотою

<400> 7

Phe Gly Xaa Gly
1

<210> 8
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

Leu Glu Trp Ile Gly
1 5

<210> 9
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9

Trp Gly Trp Gly
1

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

<400> 10

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser
20 25 30

<210> 11

<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 11

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala
1 5 10

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

<400> 12

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
1 5 10 15

Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 13
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 14
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14

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

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

<210> 15
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 15

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 16
<211> 32

```

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val Val Leu Thr
1          5          10          15

Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
          20          25          30

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

<400> 17

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
1          5          10

<210> 18
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 18

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

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

<210> 19
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 19

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
1          5          10

<210> 20
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln
1          5          10          15

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

```

<210> 21
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 21

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 22
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 22

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

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

<210> 23
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 23

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

<210> 24
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 24

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

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

<210> 25
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 25

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 26
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 26

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

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

<210> 27
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 27

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
 1 5 10

<210> 28
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 28

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
 1 5 10 15

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

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

<400> 29

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 30
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 30

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

	20	25	30
--	----	----	----

<210> 31
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 31

Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	Gly
1			5						10				

<210> 32
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 32

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> 33
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 33

Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser
1			5						10	

<210> 34
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 34

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> 35
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 35

Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	Gly
1			5						10				

<210> 36
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 36

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> 37
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 37

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 38
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 38

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys
 20

<210> 39
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 39

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 40
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 40

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

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

<210> 41
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 41

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 42
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 42

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
20

<210> 43
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 43

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 44
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 44

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr
1 5 10 15

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

<210> 45
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 45

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 46
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 46

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> 47
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 47

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 48
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 48

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> 49
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 49

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 50
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 50

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 51
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 51

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 52
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 52

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> 53
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 53

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 54
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 54

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> 55
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 55

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 56

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 56

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

<210> 57

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 57

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 58

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 58

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 59

<211> 16

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> послідовність пептидного лінкера

<400> 59

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

<210> 60

<211> 17

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> послідовність пептидного лінкера

<400> 60

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

Val

<210> 61

<211> 9

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> послідовність пептидного лінкера

<400> 61

Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Gly Gly
1 5

<210> 62

<211> 10

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> послідовність пептидного лінкера

<400> 62

Ser Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Gly Gly
1 5 10

<210> 63

<211> 6

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> послідовність пептидного лінкера

<400> 63

Ser Ala Lys Thr Thr Pro
1 5

<210> 64

<211> 6

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> послідовність пептидного лінкера

<400> 64

Arg Ala Asp Ala Ala Pro

1 5

<210> 65
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> послідовність пептидного лінкера

<400> 65

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser
 1 5

<210> 66
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> послідовність пептидного лінкера

<400> 66

Arg Ala Asp Ala Ala Ala Ala Gly Gly Pro Gly Ser
 1 5 10

<210> 67
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> послідовність пептидного лінкера

<400> 67

Arg Ala Asp Ala Ala Ala Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 20 25

<210> 68
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> послідовність пептидного лінкера

<400> 68

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

Arg Val

<210> 69
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> послідовність пептидного лінкера

<400> 69

Ala Asp Ala Ala Pro
 1 5

<210> 70
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> послідовність пептидного лінкера

<400> 70

Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro
 1 5 10

<210> 71
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> послідовність пептидного лінкера

<400> 71

Thr Val Ala Ala Pro
 1 5

<210> 72
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> послідовність пептидного лінкера

<400> 72

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 1 5 10

<210> 73
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

```

<220>
<223> послідовність пептидного лінкера

<400> 73

Gln Pro Lys Ala Ala Pro
1                5

<210> 74
<211> 13
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> послідовність пептидного лінкера

<400> 74

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro
1                5                10

<210> 75
<211> 6
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> послідовність пептидного лінкера

<400> 75

Ala Lys Thr Thr Pro Pro
1                5

<210> 76
<211> 13
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> послідовність пептидного лінкера

<400> 76

Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Thr Pro Leu Ala Pro
1                5                10

<210> 77
<211> 6
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> послідовність пептидного лінкера

<400> 77

Ala Lys Thr Thr Ala Pro
1                5

```

```

<210> 78
<211> 13
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> послідовність пептидного лінкера

<400> 78

Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro
1          5          10

<210> 79
<211> 6
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> послідовність пептидного лінкера

<400> 79

Ala Ser Thr Lys Gly Pro
1          5

<210> 80
<211> 13
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> послідовність пептидного лінкера

<400> 80

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

<210> 81
<211> 9
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> послідовність пептидного лінкера

<400> 81

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1          5

<210> 82
<211> 15
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> послідовність пептидного лінкера

```

<400> 82

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 83

<211> 15

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> послідовність пептидного лінкера

<400> 83

Gly Glu Asn Lys Val Glu Tyr Ala Pro Ala Leu Met Ala Leu Ser
1 5 10 15

<210> 84

<211> 15

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> послідовність пептидного лінкера

<400> 84

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

<210> 85

<211> 15

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> послідовність пептидного лінкера

<400> 85

Gly His Glu Ala Ala Ala Val Met Gln Val Gln Tyr Pro Ala Ser
1 5 10 15

<210> 86

<211> 24

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> послідовність пептидного лінкера

<400> 86

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Thr Val Ala Ala
1 5 10 15

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro

20

<210> 87
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> послідовність пептидного лінкера

<400> 87

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

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 20 25

<210> 88
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> послідовність пептидного лінкера

<400> 88

Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5

<210> 89
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 89

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

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

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

Ala Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser 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 Gly Ile Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 90
<211> 108
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 90

Asn 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 Cys
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 His 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 Lys Thr Leu Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 91
<211> 118
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 91

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

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

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

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

Leu Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Asp Gly Asn Phe His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 92
<211> 108
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 92

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Arg Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn
20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
65 70 75 80

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

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

<210> 93
<211> 114
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 93

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

Gly Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Ser Glu Thr Leu Tyr Ser Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

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

Ser Ser

<210> 94
<211> 107
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 94

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met
20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
35 40 45

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

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

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ser Asn Pro Tyr Thr
85 90 95

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

<210> 95
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 95

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

<210> 96
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 96

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

```

65              70              75              80

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

Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
      100              105              110

<210>  97
<211>  122
<212>  PRT
<213>  Mus musculus

<400>  97

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

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

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

Gly Leu Ile Trp Gly Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Asn Ser Pro Leu Lys
      50              55              60

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

Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
      85              90              95

Lys Gln Arg Thr Leu Trp Gly Tyr Asp Leu Tyr Gly Met Asp Tyr Trp
      100              105              110

Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
      115              120

<210>  98
<211>  108
<212>  PRT
<213>  Mus musculus

<400>  98

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

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

```

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Val Phe Ile Ile Glu Asn Met Leu Ser
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Asp Asn Leu Pro Leu
85 90 95

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

<210> 99
<211> 118
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 99

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

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

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Cys Tyr Asn Gly Phe Thr Ser Tyr Asn Pro Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Asp Tyr Tyr Gly Thr Asn Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 100
<211> 107
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 100

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ala Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
35 40 45

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

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

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Thr Tyr Pro Tyr Thr
85 90 95

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

<210> 101

<211> 22

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> ПЛР-праймер для варіабельного домену легкого ланцюга 3D12.E3

<400> 101

atggtgtcca cagctcagtt cc

22

<210> 102

<211> 29

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> ПЛР-праймер для варіабельного домену легкого ланцюга 3D12.E3

<400> 102

gcagccaccg tacgccggtt tatttcag

29

<210> 103

<211> 24

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> ПЛР-праймер для гена Ск людини

<400> 103


```

cgtacgggtgg ctgcaccatc tgtc 24

<210> 104
<211> 23
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> ПЛР-праймер для гена Ск людини

<400> 104
tcaaacactct cccctgttga agc 23

<210> 105
<211> 22
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> ПЛР-праймер для варіабельного домену важкого ланцюга 3D12.E3

<400> 105
atggccttggg tgtggacctt gc 22

<210> 106
<211> 37
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> ПЛР-праймер для варіабельного домену важкого ланцюга 3D12.E3

<400> 106
gggcccttgg tcgacgctga ggagacggtg actgagg 37

<210> 107
<211> 28
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> ПЛР-праймер для гена С гамма1 людини

<400> 107
gcgtcgacca agggcccatc ggtcttcc 28

<210> 108
<211> 26
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> ПЛР-праймер для гена С гамма1 людини

<400> 108
tcatttaccc ggaagacagg agaggc 26

<210> 109

```

```

<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> ПЛР-праймер для варіабельного домену важкого ланцюга 13F5.G5

<400> 109
atagaatgga gctgggtttt cctc 24

<210> 110
<211> 35
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> ПЛР-праймер для варіабельного домену важкого ланцюга 13F5.G5

<400> 110
gggcccttgg tcgacgctga ggagacggtg actga 35

<210> 111
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> ПЛР-праймер для варіабельного домену легкого ланцюга 13F5.G5

<400> 111
atggtcctca tgtccttgct gttc 24

<210> 112
<211> 34
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> ПЛР-праймер для варіабельного домену легкого ланцюга 13F5.G5

<400> 112
gcagccaccg tacgccgttt tatttcacgc ttg 34

<210> 113
<211> 23
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> ПЛР-праймер для варіабельного домену важкого ланцюга 3D12.E3

<400> 113
cagatccagt tggcgcagtc tgg 23

<210> 114
<211> 35
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

```

```

<220>
<223> ПЛР-праймер для варіабельного домену важкого ланцюга 13F5.G5

<400> 114
caccaactgg atctgtgagg agacggtgac tgagg 35

<210> 115
<211> 27
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> ПЛР-праймер для варіабельного домену легкого ланцюга 3D12.E3

<400> 115
aatatccaga tgacacagac tacatcc 27

<210> 116
<211> 36
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> ПЛР-праймер для варіабельного домену легкого ланцюга 13F5.G5

<400> 116
gtgtcatctg gatattccgt tttatttcca gctttg 36

<210> 117
<211> 23
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> ПЛР-праймер для варіабельного домену важкого ланцюга 13F5.G5

<400> 117
tggggggtgc gttttggctg agg 23

<210> 118
<211> 36
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> ПЛР-праймер для варіабельного домену важкого ланцюга 3D12.E3

<400> 118
gssaaaaacga cccccccaca gatccagttg gtgcag 36

<210> 119
<211> 27
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> ПЛР-праймер для варіабельного домену легкого ланцюга 13F5.G5

<400> 119

```

tggtgcagca tcagcccgtt ttatttc

27

<210> 120
<211> 33
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> ПЛР-праймер для варіабельного домену легкого ланцюга 3D12.E3

<400> 120
gctgatgctg caccaaatat ccagatgaca cag

33

<210> 121
<211> 243
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Тандемні варіабельні домени важкого ланцюга DVD-Ig до IL-1 альфа/бета

<400> 121

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

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

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

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

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

Met Gln Leu Ser Gly Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Met Tyr Phe Cys
85 90 95

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

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser
115 120 125

Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys
130 135 140

Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Arg Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln
145 150 155 160

Ala Pro Gly Lys Asp Leu Lys Arg Met Ala Trp Ile Asn Thr Tyr Thr
165 170 175

Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser
180 185 190

Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys
195 200 205

Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Ile Tyr Tyr Tyr
210 215 220

Gly Ser Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr
225 230 235 240

Val Ser Ser

<210> 122
<211> 330
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 122

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 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> 123

<211> 221

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Тандемні варіабельні домени легкого ланцюга DVD-Ig до IL-1 альфа/бета

<400> 123

```

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

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

Gly Asn Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35           40           45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50           55           60

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

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

Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100          105          110

Asn Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
115          120          125

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Cys
130          135          140

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
145          150          155          160

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
165          170          175

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
180          185          190

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Lys Thr Leu Pro Tyr
195          200          205

Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Arg Arg
210          215          220

<210> 124
<211> 106
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 124

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> 125
<211> 249
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Тандемні варіабельні домени важкого ланцюга DVD-Ig IL-1
      альфа/бета

<400> 125

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

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

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

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

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

Met Gln Leu Ser Gly Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Met Tyr Phe Cys
      85             90             95

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

```


Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Gln
115 120 125

Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr
130 135 140

Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Arg Asn Tyr Gly
145 150 155 160

Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Asp Leu Lys Arg Met Ala
165 170 175

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys
180 185 190

Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu
195 200 205

Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala
210 215 220

Arg Gly Ile Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
225 230 235 240

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
245

<210> 126
<211> 225
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Тандемні варіабельні домени легкого ланцюга DVD-Ig до IL-1
альфа/бета

<400> 126

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

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

Gly Asn Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

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

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

Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

Ala Asp Ala Ala Pro Asn Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu
115 120 125

Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln
130 135 140

Asp Ile Ser Asn Cys Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr
145 150 155 160

Val Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro
165 170 175

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile
180 185 190

Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly
195 200 205

Lys Thr Leu Pro Tyr Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn
210 215 220

Arg
225

<210> 127
<211> 246
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> ТанDEMні варіабельні домени важкого ланцюга DVD-Ig до IL-1
альфа/бета

<400> 127

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

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

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

<210> 128
 <211> 222
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Тандемні варіабельні домени легкого ланцюга DVD-Ig до IL-1
 альфа/бета

<400> 128

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Arg Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn
 20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
 65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Glu Thr Thr Val Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Met Ala Ile
 115 120 125

Gly Glu Lys Val Thr Ile Arg Cys Ile Thr Ser Thr Asp Ile Asp Val
 130 135 140

Asp Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Pro Pro Lys Leu Leu
 145 150 155 160

Ile Ser Gln Gly Asn Thr Leu Arg Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
 165 170 175

Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Val Phe Ile Ile Glu Asn Met Leu
 180 185 190

Ser Glu Asp Val Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Asp Asn Leu Pro
 195 200 205

Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Arg
 210 215 220

<210> 129

<211> 246

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Тандемні варіабельні домени важкого ланцюга DVD-Ig до IL-1 альфа/бета

<400> 129

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

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

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

Gly Leu Ile Trp Gly Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Asn Ser Pro Leu Lys
50 55 60

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

Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Lys Gln Arg Thr Leu Trp Gly Tyr Asp Leu Tyr Gly Met Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
130 135 140

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Leu Asn Ile Lys Asp Thr
145 150 155 160

Tyr Met His Trp Leu Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
165 170 175

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Ala Lys Tyr Asp Pro Arg Phe
180 185 190

Leu Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
195 200 205

Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
210 215 220

Ala Arg Gly Asp Gly Asn Phe His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
225 230 235 240

Thr Leu Thr Val Ser Ser
245

<210> 130
<211> 221
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Тандемні варіабельні домени легкого ланцюга DVD-Ig до IL-1 альфа/бета

<400> 130

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Val Phe Ile Ile Glu Asn Met Leu Ser
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Asp Asn Leu Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Arg Phe Met Ser Thr Ser Val
115 120 125

Gly Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr
130 135 140

Asn Ile Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Ala Leu
145 150 155 160

Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr
165 170 175

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln
180 185 190

```

Ser Val Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Thr Arg Tyr Pro
    195                      200                      205

Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
    210                      215                      220

<210> 131
<211> 253
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> ТанDEMні варіабельні домени важкого ланцюга DVD-Ig до IL-1
      альфа/бета

<400> 131

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

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

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

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

Leu Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65                      70                      75                      80

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

Ala Arg Gly Asp Gly Asn Phe His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
      100                      105                      110

Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
      115                      120                      125

Leu Ala Pro Gln Val His Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala
      130                      135                      140

Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu
      145                      150                      155                      160

Thr Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
      165                      170                      175

```

Glu Trp Leu Gly Leu Ile Trp Gly Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Asn Ser
180 185 190

Pro Leu Lys Ser Arg Leu Ser Ile Arg Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln
195 200 205

Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Val Tyr
210 215 220

Tyr Cys Ala Lys Gln Arg Thr Leu Trp Gly Tyr Asp Leu Tyr Gly Met
225 230 235 240

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
245 250

<210> 132

<211> 228

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Тандемні варіабельні домени легкого ланцюга DVD-Ig до IL-1 альфа/бета

<400> 132

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Arg Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn
20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Glu Thr Thr Val Thr Gln Ser Pro
115 120 125

Ala Ser Leu Ser Met Ala Ile Gly Glu Lys Val Thr Ile Arg Cys Ile

130 135 140

Thr Ser Thr Asp Ile Asp Val Asp Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
145 150 155 160

Gly Glu Pro Pro Lys Leu Leu Ile Ser Gln Gly Asn Thr Leu Arg Pro
165 170 175

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Val
180 185 190

Phe Ile Ile Glu Asn Met Leu Ser Glu Asp Val Ala Asp Tyr Tyr Cys
195 200 205

Leu Gln Ser Asp Asn Leu Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu
210 215 220

Glu Leu Lys Arg
225

<210> 133
<211> 253
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Тандемні варіабельні домени важкого ланцюга DVD-Ig до IL-1
альфа/бета

<400> 133

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

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

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

Gly Leu Ile Trp Gly Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Asn Ser Pro Leu Lys
50 55 60

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

Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Lys Gln Arg Thr Leu Trp Gly Tyr Asp Leu Tyr Gly Met Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala
130 135 140

Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser
145 150 155 160

Gly Leu Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Met His Trp Leu Lys Gln Arg Pro
165 170 175

Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn
180 185 190

Ala Lys Tyr Asp Pro Arg Phe Leu Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp
195 200 205

Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu
210 215 220

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Asp Gly Asn Phe His Phe
225 230 235 240

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
245 250

<210> 134
<211> 228
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Тандемні варіабельні домени легкого ланцюга DVD-Ig до IL-1
альфа/бета

<400> 134

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

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

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

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

```

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Val Phe Ile Ile Glu Asn Met Leu Ser
65          70          75          80

Glu Asp Val Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Asp Asn Leu Pro Leu
85          90          95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala
100         105         110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln
115         120         125

Arg Phe Met Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys
130         135         140

Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Ile Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
145         150         155         160

Gly Gln Ser Pro Arg Ala Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser
165         170         175

Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
180         185         190

Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser Val Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys
195         200         205

Gln Gln Tyr Thr Arg Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
210         215         220

Glu Ile Lys Arg
225

<210> 135
<211> 238
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Тандемні варіабельні домени важкого ланцюга DVD-Ig до IL-1
альфа/бета

<400> 135

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1          5          10          15

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

```

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

Gly Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Ser Glu Thr Leu Tyr Ser Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

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

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly
115 120 125

Pro Glu Leu Val Lys Thr Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala
130 135 140

Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ser
145 150 155 160

His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Ser Cys Tyr Asn Gly
165 170 175

Phe Thr Ser Tyr Asn Pro Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Val
180 185 190

Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Ile Gln Phe Ser Arg Leu Thr Ser
195 200 205

Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Asp Tyr Tyr Gly Thr
210 215 220

Asn Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
225 230 235

<210> 136
<211> 219
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Тандемні варіабельні домени легкого ланцюга DVD-Ig до IL-1
альфа/бета

<400> 136

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

```

1             5             10             15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met
      20             25             30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
      35             40             45

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

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

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ser Asn Pro Tyr Thr
      85             90             95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Met Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
      100            105            110

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
      115            120            125

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
      130            135            140

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ala Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
      145            150            155            160

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
      165            170            175

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Val Ser Arg Met Glu Ala Glu
      180            185            190

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Thr Tyr Pro Tyr Thr
      195            200            205

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
      210            215

<210> 137
<211> 238
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Тандемні варіабельні домени важкого ланцюга DVD-Ig до IL-1
      альфа/бета

```

<400> 137

```

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

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

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35           40           45

Gly Tyr Ile Ser Cys Tyr Asn Gly Phe Thr Ser Tyr Asn Pro Lys Phe
50           55           60

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

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

Ala Arg Ser Asp Tyr Tyr Gly Thr Asn Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100          105          110

Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Gln Val Gln Leu
115          120          125

Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu
130          135          140

Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr Trp Met Asn Trp
145          150          155          160

Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp
165          170          175

Pro Tyr Asp Ser Glu Thr Leu Tyr Ser Gln Lys Phe Lys Asp Thr Ala
180          185          190

Ile Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser
195          200          205

Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Gly
210          215          220

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
225          230          235

```

<210> 138

<211> 219

```

<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Тандемні варіабельні домени легкого ланцюга DVD-Ig до IL-1
альфа/бета

<400> 138

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
          20           25           30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ala Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
          35           40           45

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

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

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Thr Tyr Pro Tyr Thr
          85           90           95

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

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Met Ser Ala Ser Pro Gly
          115          120          125

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met
          130          135          140

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
          145          150          155          160

Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
          165          170          175

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
          180          185          190

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ser Asn Pro Tyr Thr
          195          200          205

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Met Lys Arg
          210          215

```

```

<210> 139
<211> 245
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> ТанDEMні варіабельні домени важкого ланцюга DVD-Ig до IL-1
альфа/бета

<400> 139

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

Gly Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Ser Glu Thr Leu Tyr Ser Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

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

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

Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Thr Gly Thr Ser
130 135 140

Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Tyr
145 150 155 160

Met His Trp Val Arg Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly
165 170 175

Tyr Ile Ser Cys Tyr Asn Gly Phe Thr Ser Tyr Asn Pro Lys Phe Lys
180 185 190

Gly Lys Ala Thr Phe Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Ile
195 200 205

```


Gln Phe Ser Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
210 215 220

Arg Ser Asp Tyr Tyr Gly Thr Asn Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
225 230 235 240

Leu Thr Val Ser Ser
245

<210> 140
<211> 227
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Тандемні варіабельні домени легкого ланцюга DVD-Ig до IL-1
альфа/бета

<400> 140

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met
20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
35 40 45

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

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

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ser Asn Pro Tyr Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Met Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala
115 120 125

Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala
130 135 140

Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ala
145 150 155 160

Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val

165 170 175

Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr
180 185 190

Val Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
195 200 205

Arg Ser Thr Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
210 215 220

Lys Arg Arg
225

<210> 141
<211> 245
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Тандемні варіабельні домени важкого ланцюга DVD-Ig до IL-1
альфа/бета

<400> 141

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

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

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Cys Tyr Asn Gly Phe Thr Ser Tyr Asn Pro Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Asp Tyr Tyr Gly Thr Asn Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg
130 135 140

Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
145 150 155 160

Thr Thr Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu
165 170 175

Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Ser Glu Thr Leu Tyr Ser
180 185 190

Gln Lys Phe Lys Asp Thr Ala Ile Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
195 200 205

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
210 215 220

Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
225 230 235 240

Leu Thr Val Ser Ser
245

<210> 142

<211> 227

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Тандемні варіабельні домени легкого ланцюга DVD-Ig до IL-1
альфа/бета

<400> 142

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ala Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
35 40 45

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

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

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Thr Tyr Pro Tyr Thr
85 90 95

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

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala
115 120 125

Leu Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala
130 135 140

Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser
145 150 155 160

Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val
165 170 175

Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr
180 185 190

Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
195 200 205

Trp Asn Ser Asn Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Met
210 215 220

Lys Arg Arg
225

<210> 143
<211> 249
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Тандемні варіабельні домени важкого ланцюга DVD-Ig до mIL-1
альфа/бета

<400> 143

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

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

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

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

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Arg Asn Glu Tyr Tyr Gly Ser Ser Phe Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser
 115 120 125
 Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gln Val Ile Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly
 130 135 140
 Ile Leu Gln Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly
 145 150 155 160
 Phe Ser Leu Ser Thr Tyr Gly Thr Ala Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro
 165 170 175
 Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Ala Gln Ile Gly Ser Asp Asp Arg
 180 185 190
 Lys Leu Tyr Asn Pro Phe Leu Lys Ser Arg Ile Thr Leu Ser Glu Asp
 195 200 205
 Thr Ser Asn Ser Gln Val Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Thr Glu
 210 215 220
 Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Asn Gly Val Met Glu Tyr Trp Gly
 225 230 235 240
 Leu Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 245
 <210> 144
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> варіабельний домен важкого ланцюга 10G11
 <400> 144
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Thr
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Arg Asn Glu Tyr Tyr Gly Ser Ser Phe Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 145
<211> 115
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> варіабельний домен важкого ланцюга 9H10

<400> 145

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

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

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

Trp Leu Ala Gln Ile Gly Ser Asp Asp Arg Lys Leu Tyr Asn Pro Phe
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Ile Thr Leu Ser Glu Asp Thr Ser Asn Ser Gln Val
65 70 75 80

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

Cys Ala Asn Gly Val Met Glu Tyr Trp Gly Leu Gly Thr Ser Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 146
<211> 330
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 146

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

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

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

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

Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile
65 70 75 80

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

Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
115 120 125

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

Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp
145 150 155 160

Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg
165 170 175

Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln
180 185 190

His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn
195 200 205

Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly

```

210                215                220

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

Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met
245                250                255

Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu
260                265                270

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

Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn
290                295                300

Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr
305                310                315                320

Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
325                330

<210> 147
<211> 228
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> ТанDEMні варіабельні домени легкого ланцюга DVD-Ig до mIL-1
альфа/бета

<400> 147

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

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Gly Ser Gly Ile Leu His Asn Tyr
20                25                30

Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
35                40                45

Tyr Ser Ala Lys Ile Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50                55                60

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

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Thr Pro Phe
85                90                95

```


Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala
100 105 110

Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ile Val Met Thr Gln Thr Pro
115 120 125

Lys Phe Leu Leu Val Ser Ala Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys
130 135 140

Ala Ser Gln Ser Val Asn His Asp Val Ala Trp Tyr Gln Gln Met Pro
145 150 155 160

Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Phe Ala Ser Asn Arg Tyr Thr
165 170 175

Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr
180 185 190

Phe Thr Ile Ser Thr Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys
195 200 205

Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
210 215 220

Glu Ile Lys Arg
225

<210> 148
<211> 108
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> варіабельний домен легкого ланцюга 10G11

<400> 148

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

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Gly Ser Gly Ile Leu His Asn Tyr
20 25 30

Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
35 40 45

Tyr Ser Ala Lys Ile Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Thr Pro Phe
85 90 95

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

<210> 149
<211> 108
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> варіабельний домен легкого ланцюга 9H10

<400> 149

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

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

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Met Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Phe Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Thr Val Gln Ala
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 150
<211> 106
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 150

Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln
1 5 10 15

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

```

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

Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
      50              55              60

Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg
      65              70              75              80

His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro
      85              90              95

Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
      100             105

<210> 151
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(9)
<223> Хаа може бути будь-якою амінокислотою

<400> 151

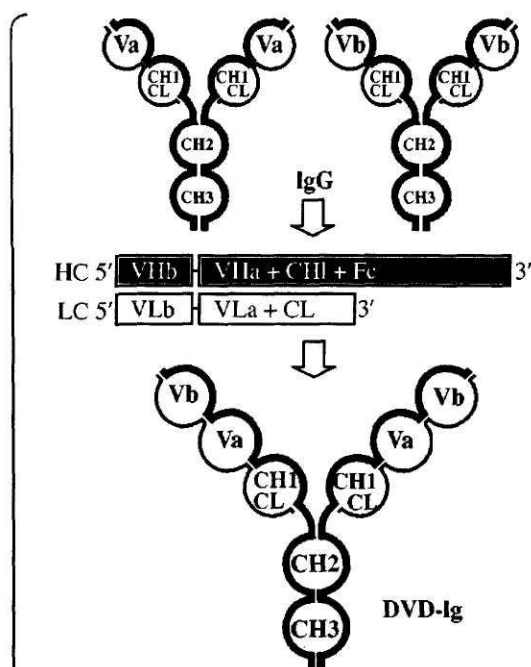
Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1              5

```

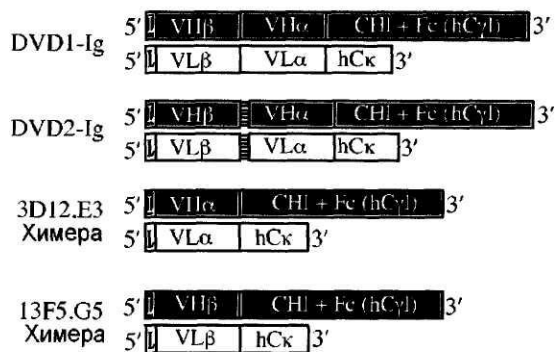
ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Спосіб лікування остеоартриту у індивідуума, який страждає на остеоартрит, що включає стадію введення індивідууму імуноглобулінового зв'язувального білка з подвійним варіабельним доменом (DVD-Ig), що зв'язує IL-1 α і IL-1 β , з лікуванням, таким чином, остеоартриту у індивідуума.
- 10 2. Спосіб за п. 1, де вказаний зв'язувальний білок, що зв'язується і з IL-1 α , і з IL-1 β , складають в фармацевтичній композиції, що містить фармацевтично прийнятний носій.
3. Спосіб за п. 1, де вказаний зв'язувальний білок, що зв'язується і з IL-1 α , і з IL-1 β , є кристалізованими.
4. Спосіб за п. 3, де вказаний кристалізований зв'язувальний білок складають в композиції, що додатково містить необов'язковий інгредієнт і полімерний носій.
- 15 5. Спосіб за п. 4, де вказаний полімерний носій є полімером, вибраним з одного або декількох з групи, що складається з поліакрилової кислоти, поліціаноакрилатів, поліамінокислоти, поліангіриду, полідепептиду, складного поліефіру, полімолочної кислоти, співполімеру молочної і гліколевої кислот або PLGA, полі-*b*-гідроксибутирату, полікапролактону, полідіоксанону, поліетиленгліколю, полігідроксипропілметакриламід, поліорганосфазену,
- 20 поліортоефіру, полівінілового спирту, полівінілпіролідону, співполімерів малеїнового ангіриду і алкілвінілового простого ефіру, поліолу-плуроніку, альбуміну, альгінату, целюлози і похідного целюлози, колагену, фібрину, желатину, гіалуронової кислоти, олігосахариду, глікозаміноглікану, сульфатованого полісахариду, їх сумішей і співполімерів.
6. Спосіб за п. 4, де вказаний необов'язковий інгредієнт вибраний з групи, що складається з альбуміну, сахарози, трегалози, лактату, желатину, гідроксипропіл- β -циклодекстрину, метоксиполіетиленгліколю і поліетиленгліколю.
- 25 7. Спосіб за п. 1, який додатково включає введення індивідууму другого засобу, де вказаний другий засіб є однією або декількома сполуками з групи, що складається з будезоніду, епідермального фактора росту, кортикостероїдів, циклоспорину, сульфасалазину, аміносаліцилатів, 6-меркаптопурина, азатіоприну, метронідазолу, інгібіторів ліпоксигенази, месалазину, олсалазину, балсалазиду, антиоксидантів, інгібіторів тромбоксану, антагоністів рецептора IL-1, моноклональних антитіл до IL-1 β , моноклональних антитіл до IL-6, факторів росту, інгібіторів еластази, піридинілімідазольних сполук, антитіл до ФНП, LT, IL-2, IL-6, IL-7, IL-
- 30

- 8, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-18, IL-23, ЕМАР-II, ГМ-КСФ, FGF і PDGF, антитіл до CD2, CD3, CD4, CD8, CD19, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD90 або їх лігандів, метотрексату, циклоспорину, FK506, рапаміцину, мікофеноляту мофетилу, лефлуноміду, НПЗЗ, ібупрофену, преднізолону, інгібіторів фосфодієстерази, агоністів аденозинових рецепторів, антитромботичних засобів, інгібіторів компонентів комплементу, адренергічних засобів, IRAK, NIK, IKK, p38, інгібіторів MAP-кіназ, інгібіторів IL-1 β -перетворювального ферменту, інгібіторів ФНП- α -перетворювального ферменту, інгібіторів передачі сигналу Т-клітин, інгібіторів металопротеїназ, інгібіторів ангіотензинперетворювального ферменту, розчинних рецепторів цитокінів, розчинного рецептора ФНП p55, розчинного рецептора ФНП p75, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R, протизапальних цитокінів, IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 і TGF β .
8. Спосіб за будь-яким з пп. 1-7, де вказану стадію введення вказаному індивідууму здійснюють щонайменше одним способом, вибраним з парентерального, підшкірного, внутрішньом'язового, внутрішньовенного, внутрішньосуглобового, внутрішньобронхіального, внутрішньочеревного, внутрішньокапсульного, внутрішньохрящового, внутрішньопорожнинного, внутрішньомозочкового, інтрацеребровентрикулярного, внутрішньотовстокишкового, інтрацервікального, внутрішньошлункового, внутрішньопечінкового, інтраміокардіального, внутрішньокісткового, внутрішньотазового, внутрішньоперикардіального, інтраперитонеального, внутрішньоплеврального, внутрішньопростатичного, внутрішньолегеневого, ректального, внутрішньониркового, інtrarетинального, інтраспінального, інтрасиновіального, інтраторакального, внутрішньоматкового, інтравезикального, болюсного, вагінального, ректального, букального, сублінгвального, інтраназального і трансдермального.
9. Спосіб за п. 1, в якому остеоартрит включає остеоартритичне пошкодження.
10. Спосіб за п. 1, в якому остеоартрит включає пошкодження передньої хрестоподібної зв'язки.
11. Спосіб за п. 1, в якому остеоартрит включає дегенерацію хряща і експресію IL-6.
12. Спосіб за п. 1, в якому дегенерація хряща включає дегенерацію стегнового хряща або дегенерацію великогомілкового хряща.
13. Спосіб за п. 1, в якому введення зв'язувального білка чинить антиноцицептивний ефект.
14. Спосіб за п. 1, в якому зв'язувальний білок додатково лікує біль.
15. Спосіб за п. 14, в якому біль вибраний з групи, яка складається з алодинії, гіпералгезії і комбінації алодинії і гіпералгезії.

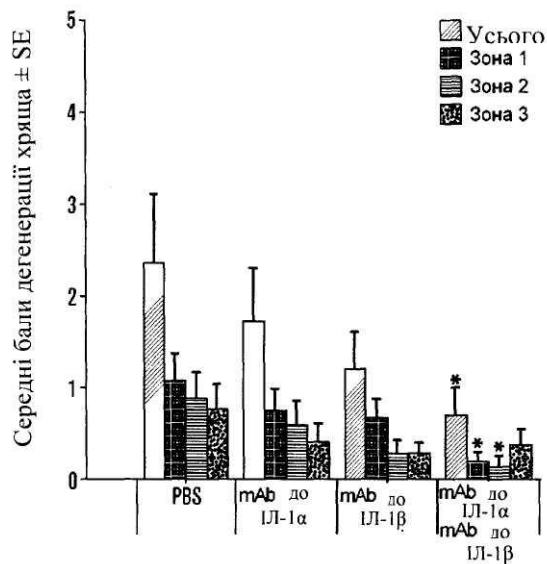


Фіг. 1А



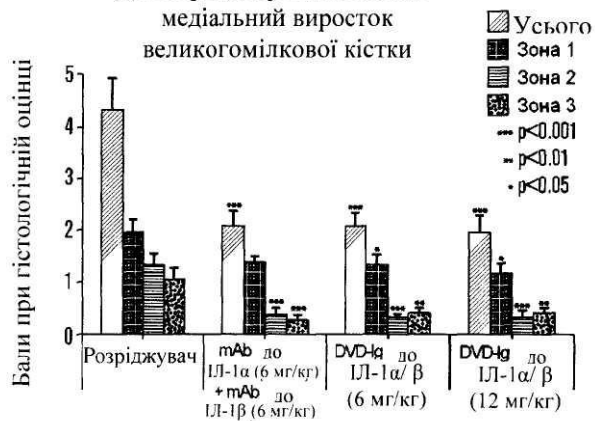
Фіг. 1В

Дегенерація хряща по зонах - медіальний виросток великогомілкової кістки



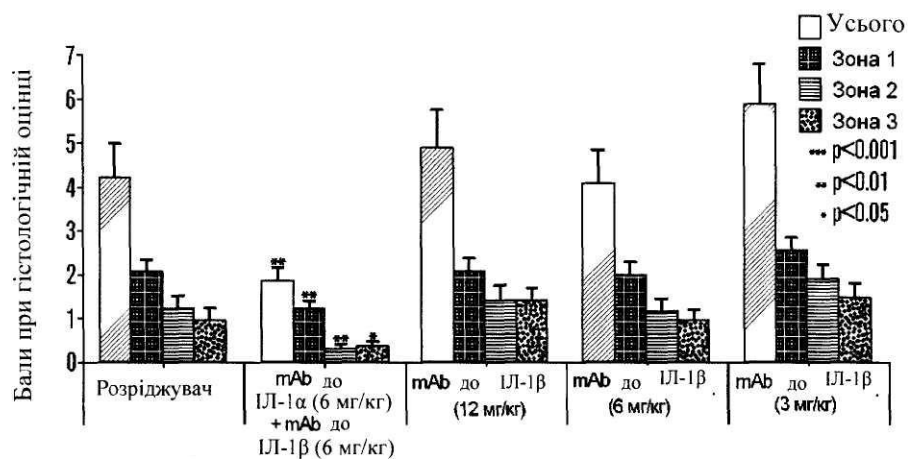
Фіг. 2

Дегенерація хряща по зонах - медіальний виросток великогомілкової кістки

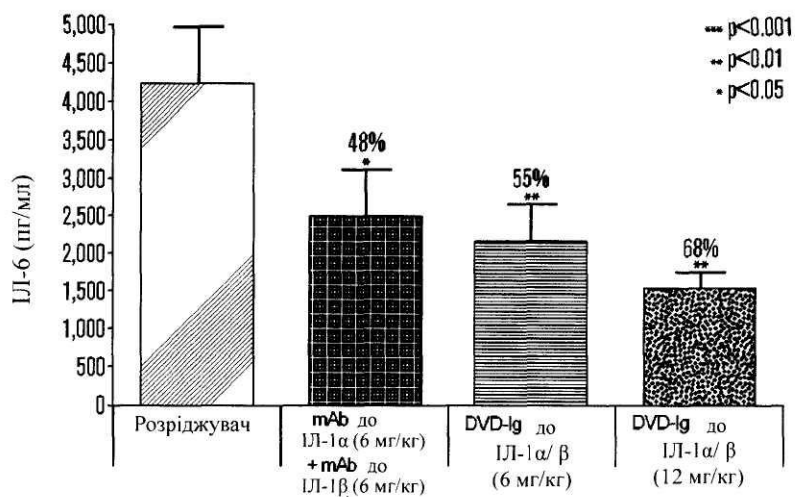


Фіг. 3

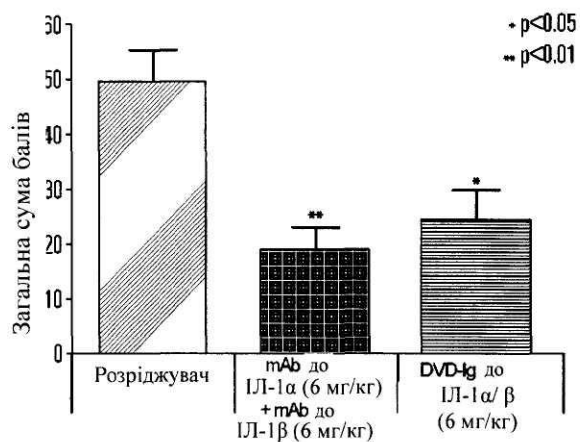
Дегенерація хряща по зонах - медіальний
виросток великогомілкової кістки



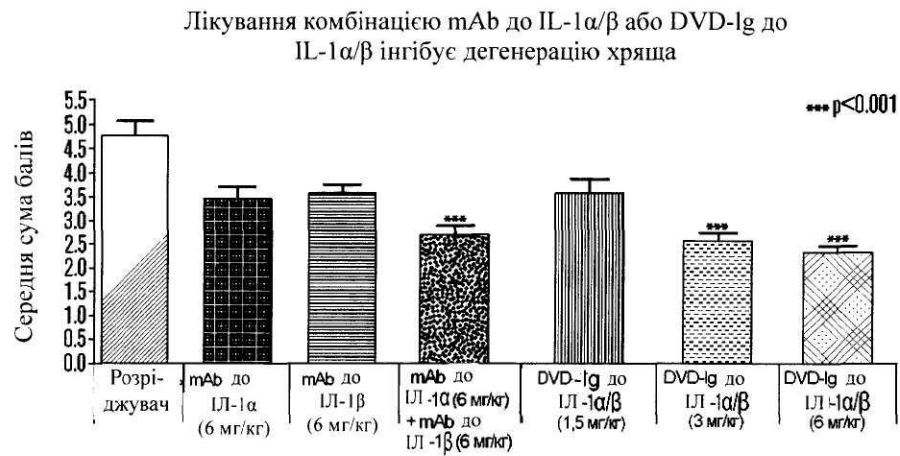
Фіг. 4



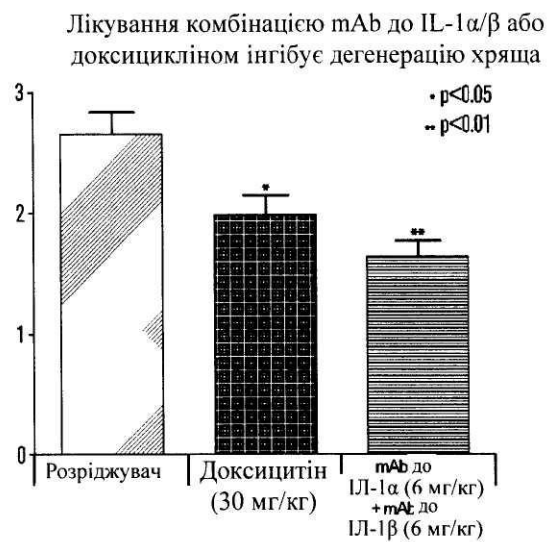
Фіг. 5



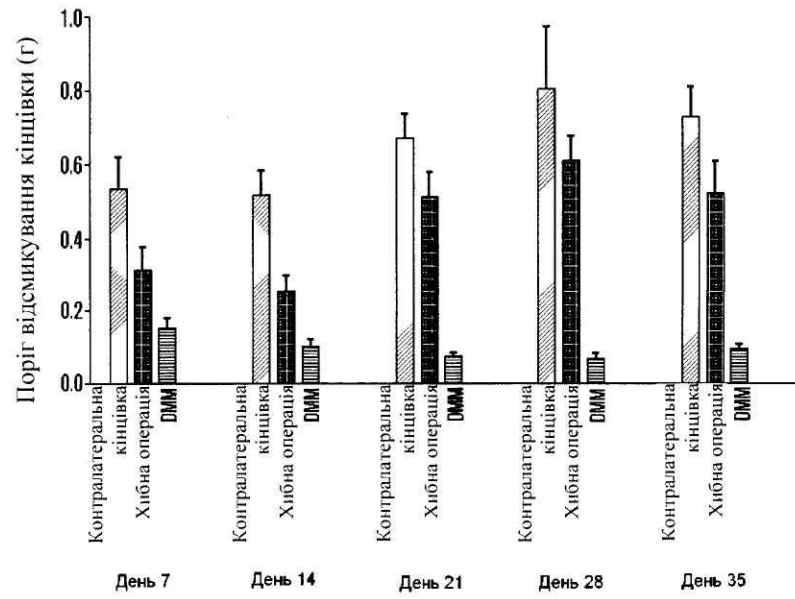
Фіг. 6



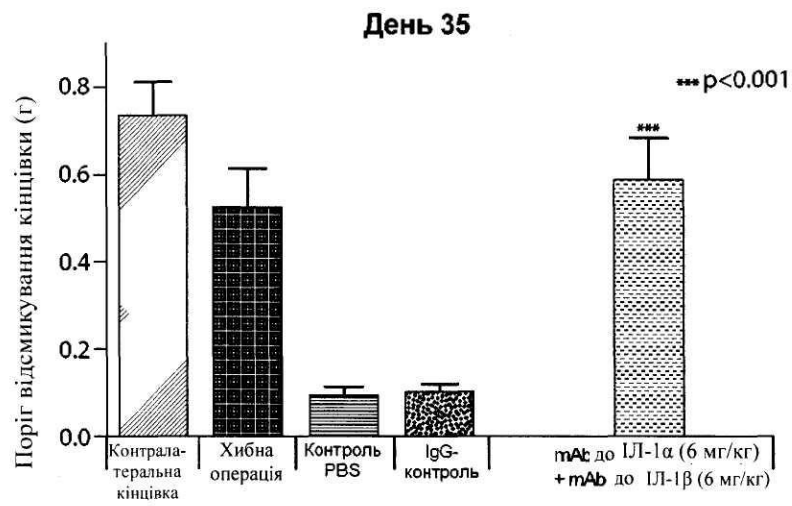
Фіг. 7



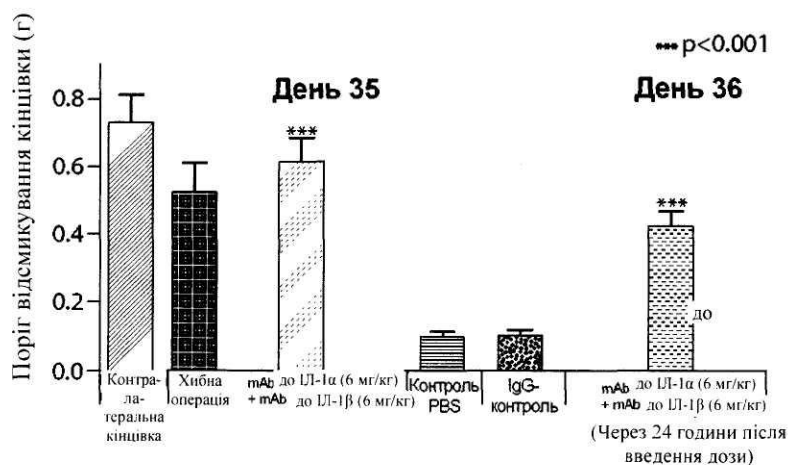
Фіг. 8



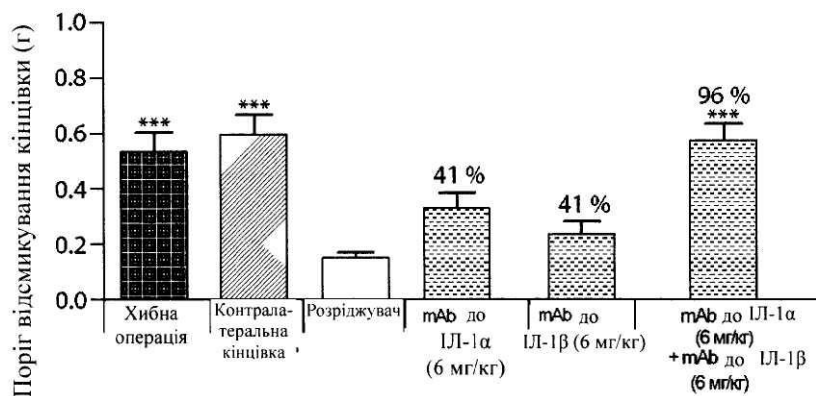
Фіг. 9



Фіг. 10

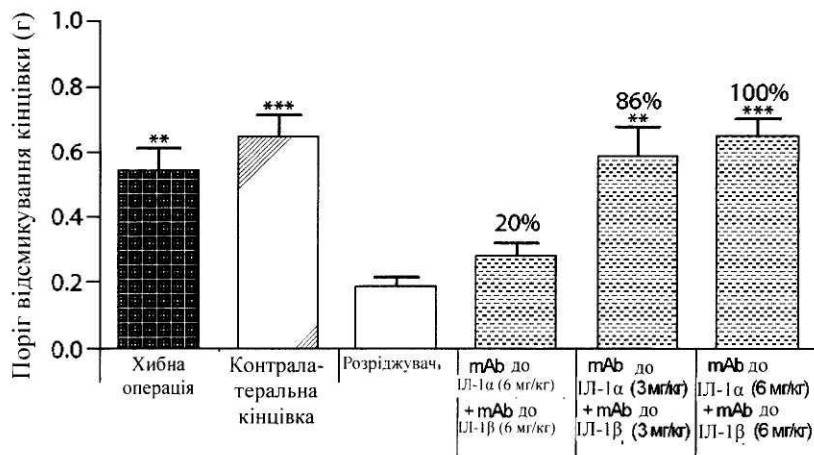


Фіг. 11

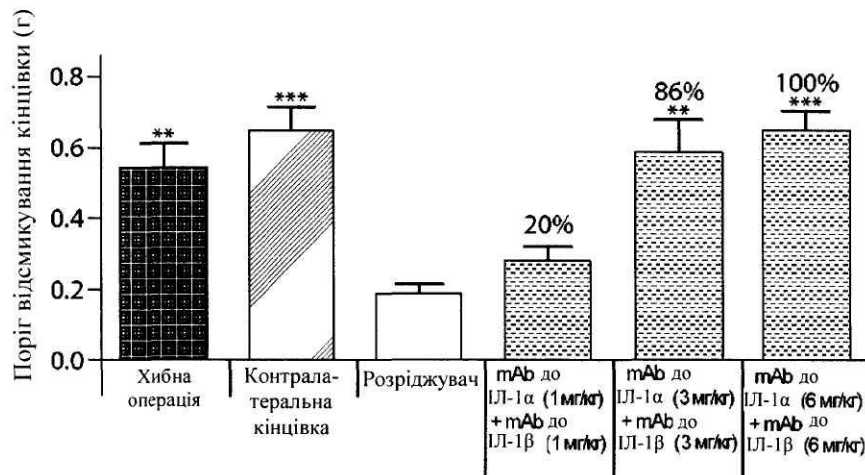


Фіг. 12

Анальгезуючі ефекти комбінації mAb до IL-1α/β на моделі дестабілізації медіального меніска

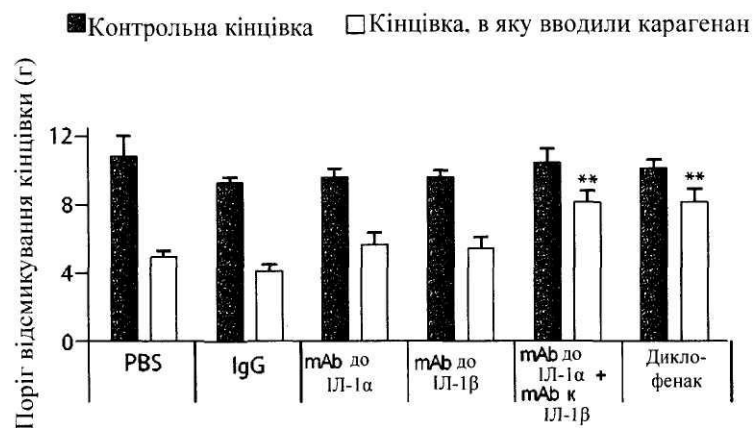


Фіг. 13



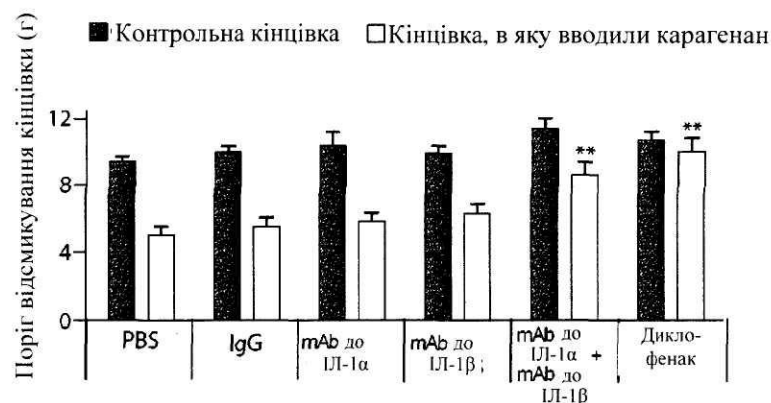
Фіг. 14

Карагенанова модель 48 годин



Фіг. 15А

Карагенанова модель 96 годин



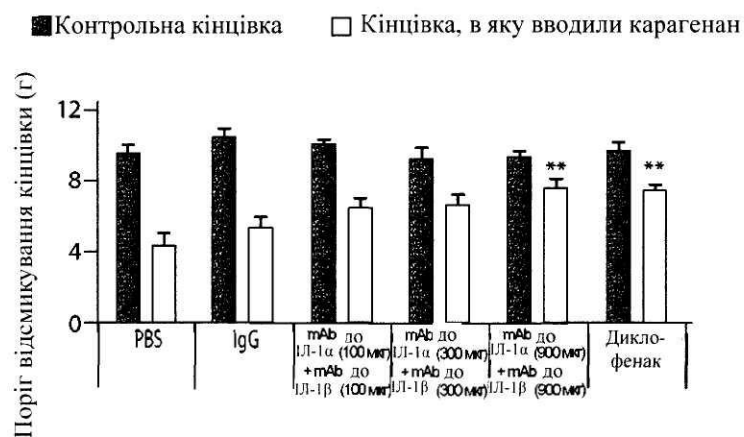
Фіг. 15B

Карагенанова модель 48 годин

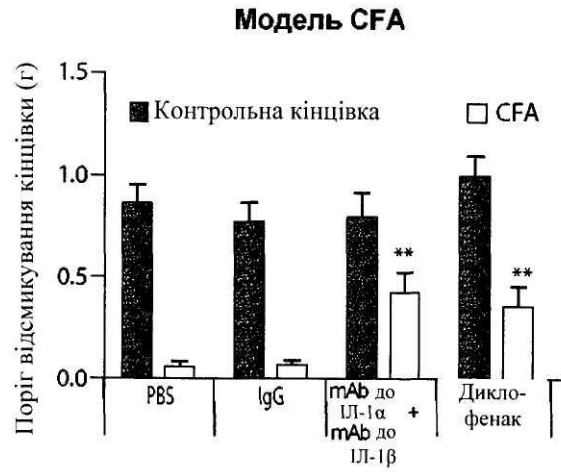


Фіг. 16A

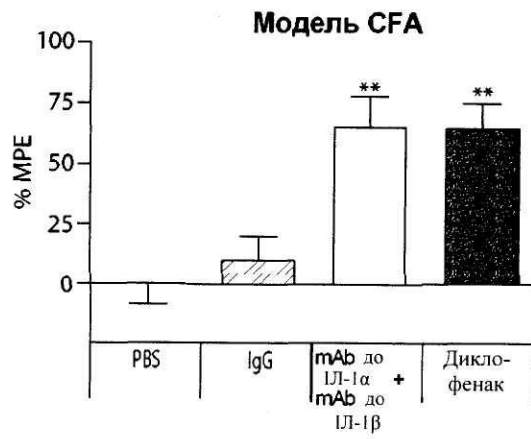
Карагенанова модель 96 годин



Фіг. 16B



Фіг. 17A

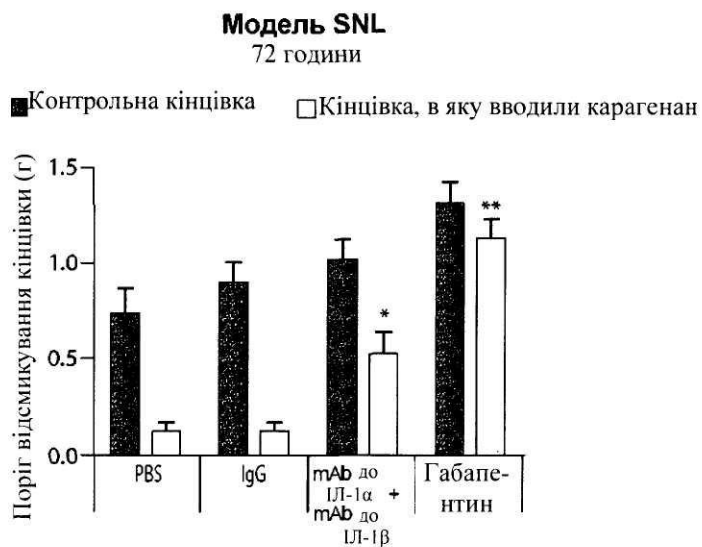


Фіг. 17B

Модель SNL
24 години

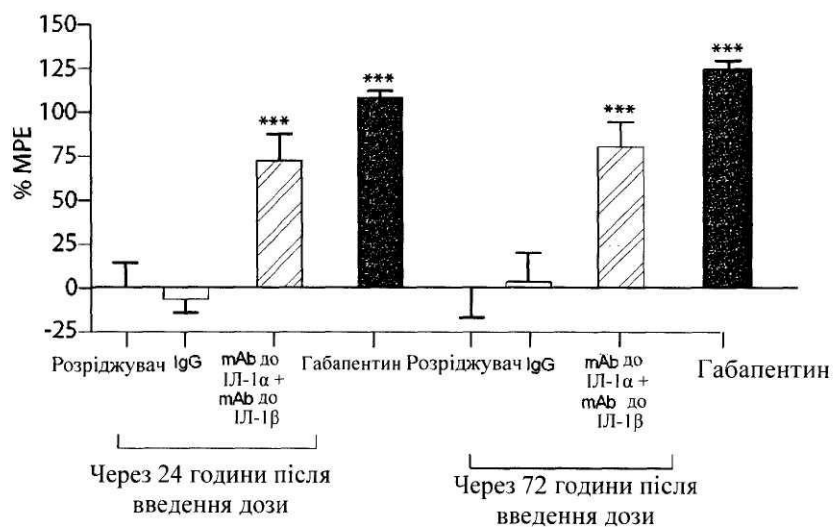


Фіг. 18A



Фіг. 18В

Ефекти лікування комбінацією mAb до IL-1α і
mAb до IL-1β в моделі SNL



Фіг. 19

Комп'ютерна верстка М. Мацело

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