



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **114712** (13) **C2**
(51) МПК (2017.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 37/00

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2013 14798	(74) Представник:	Ошарова Ірина Олександрівна, реєстр. №9
(22) Дата подання заявки:	12.06.2012	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	Impact of molecular processing in the hinge region of therapeutic IgG4 antibodies on disposition profiles in cynomolgus monkeys / Kay Stubenrauch, Uwe Wessels, Joerg Thomas Regula et al. // Drug metabolism and disposition, Pharmacology and experimental therapeutics. - 2010. - Vol. 38. - No. 1. - P. 84-91
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	25.07.2017		Anti-inflammatory activity of human IgG4 antibodies by dynamic Fab arm exchange / Marijn van der Neut Kofschoten, Janine Schuurman, Mario Losen et al. // Science. - 2007. - Vol. 317. - No. 5844. - P. 1554-1557
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	61/496,249		US 7604800 B2, 20.10.2009
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	13.06.2011		US 7563441 B2, 21.07.2009
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	US		US 20060073148 A1, 06.04.2006
(41) Публікація відомостей про заявку:	25.04.2014, Бюл.№ 8		WO 2009052439 A2, 23.04.2009
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	25.07.2017, Бюл.№ 14		WO 2010070346 A2, 24.06.2010
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/US2012/042068, 12.06.2012		WO 2011014438 A1, 03.02.2011
(72) Винахідник(и): Бассараб Стефан (DE), Ененкель Барбара (DE), Гарідель Патрік (DE), Шотт Хейдрун (DE), Сінгх Санджая (US), Літценбургер Тобіас (DE)			WO 2010102792 A2, 16.09.2010
(73) Власник(и): АБДЖЕНОМІКС КОЕПЕРАТИФ У.А., Kingsfordweg 103, 1043 GP Amsterdam, The Netherlands (NL)			A single amino acid substitution abolishes the heterogeneity of chimeric mouse/human (IgG4) antibody / S. Angal, D. J. King, M. W. Bodmer et al. // Molecular immunology. - 1993. - Vol. 30. - No. 1. - P. 105-108
			Allberse Rob C. IgG4 breaking the rules / Rob C.Allberse, Janine Schuurman // Immunology. - 2002. - Vol. 105. - No. 1. - P. 9-19
			Therapeutic IgG4 antibodies engage in Fab-arm exchange with endogenous human IgG4 in vivo / Aran F. Labrijn, Antonio Ortiz Buijsse, Ewald T.J. van den Bremer et al. // Nature biotechnology. - 2009. - Vol. 27. - No. 8. - P. 767-771

(54) МОНОКЛОНАЛЬНЕ АНТИТІЛО, ЯКЕ ІМУНОСПЕЦИФІЧНО ЗВ'ЯЗУЄТЬСЯ З ЛЮДСЬКИМ PSGL-1, ТА ЙОГО ЗАСТОСУВАННЯ

(57) Реферат:

Винахід стосується моноклонального антитіла, яке імунологічно зв'язується з людським PSGL-1, у якого константна ділянка людського IgG4 має заміщення в положенні 228 серину на пролін за нумерацією показчика EU. Винахід також стосується фармацевтичної композиції, що містить

UA 114712 C2

таке антитіло, комплекту, що включає контейнер, ін'єкційного пристрою та способу лікування запального порушення, який включає введення суб'єктові, який цього потребує, терапевтично ефективної кількості вказаного моноклонального антитіла.

СПОРИДНЕНІ ЗАЯВКИ

Дана заявка заявляє пріоритет дати подання попередньої патентної заявки США 61/496,249, поданої 13 червня 2011 р., під назвою "АНТИТІЛА ПРОТИ PSGL-1 ТА ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ". Ідею та зміст наведеної попередньої заявки у повному обсязі включено до цього опису шляхом посилання.

ГАЛУЗЬ ВІНАХОДУ

Згідно з даним винаходом, пропонуються антитіла, які специфічно зв'язуються з глікопротеїновим лігандом-1 Р-селектину (PSGL-1), полінуклеотиди, які кодують такі антитіла, вектори експресії, які включають такі полінуклеотиди, клітини-хазяї, які включають такі вектори експресії, та подібні композиції. Також пропонуються способи лікування розладу або порушення, викликаного або пов'язаного з підвищеною проліферацією та/або кількістю активованих Т-клітин, такого як псоріаз, з застосування антитіл проти PSGL-1.

РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

Запальні реакції на інфекцію або пошкодження започатковуються адгезією лейкоцитів на стінках судин (McEver et al., 1997, J. Clin. Invest., 100 (3): 485-492). Селектини представляють групу глікопротеїнів, які опосередковують першу взаємодію лейкоцитів - ендотеліальних клітин та лейкоцитів - тромбоцитів під час запалення. Група селектинів, яка складається з L-селектину, Е-селектину та Р-селектину, включає NH₂-кінцевий лектиновий домен, з наступним EGF-подібним доменом, групу консенсусних повторів, трансмембранний домен та короткий цитоплазматичний кінцевий сегмент. Лектинові домени селектинів взаємодіють зі специфічними глікокон'югатними лігандами з метою сприяння адгезії клітин. L-селектин, який експресується на більшості лейкоцитів, зв'язується з лігандами на деяких ендотеліальних клітинах та інших лейкоцитах. Е-селектин, який експресується на активованих цитокином ендотеліальних клітинах, зв'язується з лігандами на більшості лейкоцитів. Р-селектин, який експресується на активованих тромбоцитах та ендотеліальних клітинах, також зв'язується з лігандами на більшості лейкоцитів.

Глікопротеїновий ліганд-1 Р-селектину ("PSGL-1"), також відомий як SELPLG або CD162 (кластер диференціації 162), являє собою людський муциноподібний глікопротеїновий ліганд для всіх трьох селектинів (Constantin, Gabriela, 2004, Drugs News Perspect, 17(9): 579-585; McEver et al., 1997, J. Clin. Invest., 100 (3): 485-492). PSGL-1 є дисульфід-зв'язаним гомодимером з двома субодиницями по 120 кДа і експресується на поверхні моноцитів, лімфоцитів, гранулоцитів та деяких стовбурових клітин CD34⁺. PSGL-1 може сприяти патологічному рекрутингові лейкоцитів при багатьох запальних порушеннях, оскільки це сприяє адгезійній взаємодії селектинів, що вказує на те, що інгібітори PSGL-1, такі, як антитіла до PSGL-1, можуть використовуватись як протизапальні медикаменти.

Було розроблено кілька антитіл проти PSGL-1 (див., наприклад, публікацію міжнародної заявки № WO 2005/110475, опубліковану 24 листопада 2005 р.; публікацію міжнародної заявки № WO 2003/013603, опубліковану 20 лютого 2003 р.; Constantin, Gabriela, 2004, Drugs News Perspect, 17(9): 579-585).

КОРОТКИЙ ОПИС ВІНАХОДУ

В одному аспекті пропонуються антитіла та похідні від антитіл антиген-зв'язувальні фрагменти, які специфічно зв'язуються з PSGL-1. В одному варіанті втілення пропонується моноклональне антитіло, яке імуноспецифічно зв'язується з людським PSGL-1, що включає: (i) варіабельну ділянку легкого ("VL") ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 3; (ii) важкий ланцюг, який включає варіабельну ділянку важкого ("VH") ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 4; та (iii) константну ділянку людського IgG4, яка містить заміщення серину проліном в амінокислоті 228 важкого ланцюга згідно з нумерацією показника EU (гамма-G1 імуноглобулін) (Див. Edelman et al., 1969, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 63(1): 78-85). У конкретному варіанті втілення пропонується моноклональне антитіло, яке імуноспецифічно зв'язується з людським PSGL-1, що включає: (i) легкий ланцюг, який включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 1; та (ii) важкий ланцюг, який включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2. В іншому конкретному варіанті втілення пропонується моноклональне антитіло, яке імуноспецифічно зв'язується з людським PSGL-1, що включає: (i) важкий ланцюг, який складається з SEQ ID NO: 2; та (ii) а легкий ланцюг, який складається з SEQ ID NO: 1. В іншому конкретному варіанті втілення пропонується моноклональне антитіло, яке імуноспецифічно зв'язується з людським PSGL-1, що включає важкий ланцюг, який включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2, та комплементарний легкий ланцюг. У конкретному варіанті втілення будь-яке з вищезазначених моноклональних антитіл піддають очищенню.

В іншому аспекті пропонується фармацевтична композиція, що включає будь-яке з вищезазначених моноклональних антитіл та фармацевтично прийнятний носій. У конкретному варіанті втілення фармацевтична композиція включає моноклональне антитіло, яке є

очищеним.

В одному варіанті втілення пропонується фармацевтичний препарат, який включає будь-яке з вищезазначених моноклональних антитіл у водному розчині, який включає цитрат натрію, хлорид натрію та моногідрат лимонної кислоти. У конкретному варіанті втілення фармацевтичний препарат є водним розчином, який включає 9,1 мМ дигідрат цитрату натрію, 150 мМ хлориду натрію та 0,9 мМ лимонної кислоти. В іншому конкретному варіанті втілення моноклональне антитіло є присутнім у фармацевтичному препараті у концентрації 0,267 мМ. У конкретному варіанті втілення фармацевтичний препарат є водним розчином, який включає 2,676 г/л натрію, 8,766 г/л хлориду натрію, 0,2 г/л полісорбату 80 та 0,189 г/л лимонної кислоти. В іншому конкретному варіанті втілення моноклональне антитіло є присутнім у концентрації 40 г/л у фармацевтичному препараті. У конкретному варіанті втілення усі вищезгадані водні розчини мають рН 6,0.

В іншому аспекті пропонуються полінуклеотиди, які кодують описане авторами антитіло або його антиген-зв'язувальний фрагмент. У конкретному варіанті втілення пропонується виділений полінуклеотид, який кодує важкий ланцюг антитіла, який включає SEQ ID NO: 2. У варіанті втілення вектор експресії включає вищезазначений виділений полінуклеотид. У деяких варіантах втілення вектор експресії також включає полінуклеотид, який кодує легкий ланцюг антитіла, який включає SEQ ID NO: 1. У конкретному варіанті втілення вектор експресії є вектором експресії ссавця. В іншому аспекті пропонується клітина-хазяїн, яка включає вищезазначений вектор експресії. У конкретному варіанті втілення клітина-хазяїн включає (а) першу нуклеїнову кислоту, яка включає SEQ ID NO: 2, функціонально зв'язану з промотором, який функціонує у зазначеній клітині-хазяїні; та (b) другу нуклеїнову кислоту, яка кодує SEQ ID NO: 1, функціонально зв'язану з промотором, який функціонує у зазначеній клітині-хазяїні. В іншому конкретному варіанті втілення перша та друга нуклеїнові кислоти клітини-хазяїна перебувають в одному векторі експресії або у різних векторах експресії.

В іншому аспекті пропонується спосіб одержання будь-якого з вищезазначених моноклональних антитіл, який включає культивування будь-яких з вищезазначених клітин-хазяїв, згідно з яким вищезгадані перші та другі нуклеїнові кислоти експресуються вищезгаданою клітиною, і вищезгадані важкі та легкі ланцюги об'єднуються для утворення вищезгаданого антитіла.

В іншому аспекті пропонується важкий ланцюг антитіла, який включає SEQ ID NO: 2, або фрагмент важкого ланцюга антитіла, який включає амінокислоти з 1 по 228 SEQ ID NO: 2. У конкретному варіанті втілення пропонується важкий ланцюг антитіла, який включає SEQ ID NO: 2. В іншому конкретному варіанті втілення пропонується фрагмент важкого ланцюга антитіла, який включає амінокислоти з 1 по 228 SEQ ID NO: 2. Також авторами пропонується спосіб одержання вищезазначеного важкого ланцюга, який включає культивування будь-яких з вищезазначених клітин-хазяїв, таким чином, щоб вищезгаданий важкий ланцюг експресувався клітиною, та виділення вищезгаданого важкого ланцюга. У конкретному варіанті втілення спосіб одержання будь-якого з вищезгаданих антитіл включає одержання важкого ланцюга згідно з вищезазначеним способом для одержання важкого ланцюга, виділення вищезгаданого важкого ланцюга та утворення комплексу вищезгаданого важкого ланцюга з легким ланцюгом антитіла, який включає SEQ ID NO: 1.

В іншому аспекті пропонується комплект, який включає перший контейнер, який містить будь-яке з вищезазначених моноклональних антитіл. У конкретному варіанті втілення перший контейнер є флаконом, який містить вищезгадане моноклональне антитіло як ліофілізований стерильний порошок у вакуумі, і комплект також включає другий контейнер, який містить фармацевтично прийнятну рідину. Авторами також пропонується ін'єкційний пристрій, який містить будь-яке з вищезазначених моноклональних антитіл. У конкретному варіанті втілення ін'єкційний пристрій є шприцом.

В іншому аспекті пропонуються способи профілактики та/або лікування хвороби або порушення пов'язаних (повністю або частково) зі збільшеною кількістю активованих Т-клітин, або викликаних нею, порівняно з показниками здорових суб'єктів або суб'єктів, які не мають конкретних хвороби або порушення. У конкретному варіанті втілення пропонується спосіб лікування запального порушення, який включає введення суб'єктові, який цього потребує, терапевтично ефективної кількості будь-якого з вищезазначених моноклональних антитіл. В іншому конкретному варіанті втілення спосіб лікування запального порушення включає введення суб'єктові, який цього потребує, терапевтично ефективної кількості будь-якої з вищезазначених фармацевтичних композицій. У конкретному варіанті втілення запальне порушення є аутоімунною хворобою. В іншому конкретному варіанті втілення запальне порушення є псоріазом. В іншому конкретному варіанті втілення запальне порушення є

бляшковим псоріазом. В іншому конкретному варіанті втілення бляшковий псоріаз має форму від помірної до важкої. В іншому конкретному варіанті втілення запальне порушення є еритродермічним псоріазом. В іншому конкретному варіанті втілення запальне порушення є псоріатичним артритом. В іншому конкретному варіанті втілення запальне порушення є ревматоїдним артритом. В іншому конкретному варіанті втілення запальне порушення є хворобою Крона. В іншому конкретному варіанті втілення запальне порушення є анкілозуючим спондилітом. В іншому конкретному варіанті втілення запальне порушення є діабетом.

КОРОТКИЙ ОПИС ФІГУР

Фіг. 1 показує невідновний капілярний гель-електрофорез (CGE) для h15A7 та 15A7H. Стрілкою показано пік для половини молекули антитіла.

Фіг. 2 показує зв'язування 15A7H та контрольного антитіла з активованими людськими CD4+T-клітинами. Значення EC₅₀ (нМ) одержували, застосовуючи одноцентрову чотирипараметричну модель підбирання через побудову графіка залежності середньої інтенсивності флуоресценції (MFI) від концентрації антитіла.

Фіг. 3 показує об'єднані дані реакції на дозу антитіла 15A7H у trans-vivo DTH у PBMC 4-х донорів. Об'єднаний середній показник \pm SEM 4-х донорів після лікування з застосуванням 0,03, 0,1, 0,3, 1 та 10 мг/кг антитіла або наповнювача. pbmc: лише PBMC, V: наповнювач, 0,03, 0,1, 0,3, 1 та 10 мг/кг антитіла 15A7H. Відсоток зменшення товщини подушечки стопи у відповідь на лікування з застосуванням 0,03, 0,1, 0,3, 1 та 10 мг/кг антитіла 15A7H.

Фіг. 4 показує добові показники концентрації у плазмі антитіла 15A7H у мишей C57BL/6 після одноразової внутрішньочеревинної ін'єкції. На графіку показано вплив об'єднаних показників рівня у плазмі двох антитіл (середн. \pm SEM, n=4) у експериментальних тварин на % зменшення товщини подушечки стопи у trans-vivo DTH аналізі.

Фіг. 5 показує концентрацію 15A7H у плазмі залежно від часу у мишей C57BL/6. Чотирьом призначеним для оцінки фармакокінетики мишам внутрішньочеревинно вводили дозу 0,03, 0,1, 0,3, 1 та 10 мг/кг антитіла 15A7H. Зразки крові брали через 1, 3, 5 та 24 год.

Фіг. 6 показує CDC активність 15A7H та контрольних антитіл, які випробували у різних концентраціях (5, 0,5, 0,05, 0,005 та 0,0005 мкг/мл).

Фіг. 7A показує амінокислотну послідовність важкого ланцюга антитіла 15A7H (SEQ ID NO: 2). Варіабельну ділянку важкого ланцюга (SEQ ID NO: 4) виділено жирним шрифтом. CDR (CDR1 (SEQ ID NO: 8), CDR2 (SEQ ID NO: 9) та CDR3 (SEQ ID NO: 10)) є обведеними. Також вказуються каркасні ділянки (FR1 (SEQ ID NO: 17), FR2 (SEQ ID NO: 18), FR3 (SEQ ID NO: 19) та FR4 (SEQ ID NO: 20)). Вказується константна ділянка. Амінокислотна послідовність шарнірної ділянки (SEQ ID NO: 12) є обведеною. Заміщений пролін в амінокислотній позиції 228 у шарнірній ділянці виділено курсивом.

Фіг. 7B показує амінокислотну послідовність легкого ланцюга антитіла 15A7H (SEQ ID NO: 1). Варіабельну ділянку легкого ланцюга (SEQ ID NO: 3) виділена жирним шрифтом. CDR (CDR1 (SEQ ID NO: 5), CDR2 (SEQ ID NO: 6) та CDR3 (SEQ ID NO: 7)) є обведеними. Також вказуються каркасні ділянки (FR1 (SEQ ID NO: 13), FR2 (SEQ ID NO: 14), FR3 (SEQ ID NO: 15) та FR4 (SEQ ID NO: 16)). Вказується константна ділянка.

Таблиця 1

Перелік SEQ ID NO та їхніх відповідних послідовностей

SEQ ID NO.	Відповідна послідовність
SEQ ID NO: 1	Амінокислотна послідовність легкого ланцюга 15A7H
SEQ ID NO: 2	Амінокислотна послідовність важкого ланцюга 15A7H
SEQ ID NO: 3	Амінокислотна послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга (VL) 15A7H
SEQ ID NO: 4	Амінокислотна послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга (VH) 15A7H
SEQ ID NO: 5	Амінокислотна послідовність 15A7H VL CDR1
SEQ ID NO: 6	Амінокислотна послідовність 15A7H VL CDR2
SEQ ID NO: 7	Амінокислотна послідовність 15A7H VL CDR3
SEQ ID NO: 8	Амінокислотна послідовність 15A7H VH CDR1
SEQ ID NO: 9	Амінокислотна послідовність 15A7H VH CDR2
SEQ ID NO: 10	Амінокислотна послідовність 15A7H VH CDR3
SEQ ID NO: 11	Амінокислотна послідовність людського PSGL-1 повної довжини
SEQ ID NO: 12	Амінокислотна послідовність шарнірної ділянки IgG4

Перелік SEQ ID NO та їхніх відповідних послідовностей

SEQ ID NO.	Відповідна послідовність
SEQ ID NO: 13	15A7H VL FR1
SEQ ID NO: 14	15A7H VL FR2
SEQ ID NO: 15	15A7H VL FR3
SEQ ID NO: 16	15A7H VL FR4
SEQ ID NO: 17	15A7H VH FR1
SEQ ID NO: 18	15A7H VH FR2
SEQ ID NO: 19	15A7H VH FR3
SEQ ID NO: 20	15A7H VH FR4
SEQ ID NO: 21	Амінокислотна послідовність шарнірної ділянки IgG4 дикого типу

ДЕТАЛЬНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

Авторами пропонуються антитіла, які специфічно зв'язуються з PSGL-1. Також пропонуються виділені нуклеїнові кислоти, які кодують такі антитіла. Також пропонуються вектори та клітини-хазяї, які включають нуклеїнові кислоти, які кодують такі антитіла або їх антиген-зв'язувальні фрагменти. Також пропонуються способи одержання таких антитіл, клітин, наприклад, клітин CHO, антитіл, які виробляються такими клітинами, та очищення вироблених антитіл. Також авторами пропонується спосіб лікування та/або профілактики описаних авторами порушення або хвороби (наприклад, запального стану), який включає введення описаного антитіла або похідного від антитіла антиген-зв'язувального фрагмента, що імуноспецифічно зв'язується з PSGL-1. У конкретному варіанті втілення антитіло є моноклональним антитілом IgG4 15A7H, яке описується у Прикладах 1 - 4 нижче.

Антитіла

Авторами пропонуються моноклональні антитіла, які імуноспецифічно зв'язуються з людським глікопротеїновим лігандом-1 Р-селектину ("PSGL-1"). У конкретному варіанті втілення пропонується моноклональне антитіло, яке імуноспецифічно зв'язується з людським PSGL-1, що включає: (i) варіабельну ділянку легкого ("VL") ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 3; (ii) важкий ланцюг, який включає варіабельну ділянку важкого ("VH") ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 4; та (iii) константну ділянку людського IgG4, яка містить амінокислотне заміщення серину на пролін в амінокислоті 228 важкого ланцюга згідно з нумерацією показника EU. Необмежувальні приклади людських константних ділянок описуються у джерелах існуючого рівня техніки; див., наприклад, Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242. В оптимальному варіанті антитіло зв'язується з PSGL-1 і вибірково викликає апоптоз активованих Т-клітин (відносно інших клітин, які експресують PSGL-1). У конкретному варіанті втілення зв'язування антитіла з PSGL-1 не перешкоджає взаємодії Р-селектину з PSGL-1, функції, пов'язаній з PSGL-1, і не впливає на вимогу ефективної локалізації активованих Т-клітин та нейтрофілів у тканинах-мішенях.

У конкретному варіанті втілення антитіло, яке імуноспецифічно зв'язується з PSGL-1, є імуноглобуліном G класу 4 (IgG4) повної довжини і в оптимальному варіанті включає послідовність важкого ланцюга SEQ ID NO: 2, у ще кращому варіанті включає послідовність важкого ланцюга SEQ ID NO: 2 та послідовність легкого ланцюга SEQ ID NO: 1 (остання є моноклональним антитілом 15A7H).

Також авторами пропонуються антиген-зв'язувальні фрагменти антитіла, які включають послідовності варіабельної ділянки SEQ ID NO: 3 та SEQ ID NO: 4 та принаймні частину людської константної ділянки важкого ланцюга, яка містить шарнірну ділянку людського IgG4 і включає заміщення серину проліном в амінокислоті 228 людського важкого ланцюга згідно з нумерацією показника EU. У конкретному варіанті втілення похідний від антитіла антиген-зв'язувальний фрагмент є фрагментом F(ab')₂ фрагмент.

Описане авторами антитіло або похідний від антитіла антиген-зв'язувальний фрагмент в оптимальному варіанті є виділеним, у найкращому варіанті - очищеним.

У контексті цього опису, якщо не вказано іншого, терміни "імуноспецифічно зв'язується", "імуноспецифічно розпізнає", "специфічно зв'язується" та "специфічно розпізнає" є аналогічними термінами, які стосуються антитіл та похідних від антитіл антиген-зв'язувальних фрагментів і вживаються авторами взаємозамінно і стосуються зв'язування антитіла або похідного від антитіла антиген-зв'язувального фрагмента через його антиген-зв'язувальний активний центр з

його епітопом, як стане зрозуміло спеціалістам у даній галузі. В одному конкретному варіанті втілення антитіло або похідний від антитіла антиген-зв'язувальний фрагмент, який специфічно зв'язується з антигеном, також може зв'язуватися з іншими пептидами або поліпептидами, хоча зазвичай і з нижчою афінністю, як визначається, наприклад, за допомогою імуноаналізів, Biacore™, інструмент KinExA 3000 (Sapidyne Instruments, Boise, ID), або інших аналізів, відомих спеціалістам у даній галузі. У конкретному варіанті втілення антитіло або похідний від антитіла антиген-зв'язувальний фрагмент, який імуноспецифічно зв'язується з антигеном, зв'язується з антигеном з показником K_a принаймні 2 log, 2,5 log, 3 log, 4 log або більше за показник K_a , коли антитіло або похідний від антитіла антиген-зв'язувальний фрагмент зв'язується з іншим антигеном. В іншому конкретному варіанті втілення антитіло або похідний від антитіла антиген-зв'язувальний фрагмент, який імуноспецифічно зв'язується з антигеном, не дають перехресної реакції шляхом зв'язування з іншими білками. У конкретних варіантах втілення антитіло або описаний авторами похідний від антитіла антиген-зв'язувальний фрагмент специфічно зв'язується з природною ізоформою або природним варіантом PSGL-1 (які є природною ізоформою або варіантом PSGL-1 в організмі тварини, і які можуть бути виділені з організму тварини, в оптимальному варіанті - людини). У конкретних варіантах втілення описане авторами антитіло або похідний від антитіла антиген-зв'язувальний фрагмент імуноспецифічно зв'язується з людським PSGL-1 або його фрагментом. У конкретних варіантах втілення описане авторами антитіло або похідний від антитіла антиген-зв'язувальний фрагмент специфічно зв'язується з PSGL-1 людини та/або PSGL-1 яванського макака або його фрагментом.

Амінокислотна послідовність SEQ ID NO:11 показує людський PSGL-1 повної довжини, інвентарний номер GenBank™ AAA74577.1, GI:902797. У конкретних варіантах втілення описане авторами антитіло імуноспецифічно зв'язується з PSGL-1 як визначається, наприклад, шляхом ELISA або іншого аналізу зв'язування антигена, який є відомим спеціалістам у даній галузі або представленим у цьому описі.

У конкретних аспектах авторами пропонується антитіло, яке специфічно зв'язується з PSGL-1 людини та яванського макака і являє собою імуноглобулін G (який має гамма-важку ділянку) класу 4 (IgG4), яка є тетрамером двох ідентичних дисульфідно зв'язаних димерів, кожен з яких включає важкий ланцюг та легкий ланцюг. Антитіло в оптимальному варіанті включає важкий ланцюг SEQ ID NO: 2. У ще кращому варіанті антитіло включає важкий ланцюг SEQ ID NO: 2 та легкий ланцюг SEQ ID NO: 1. Що стосується легкого ланцюга, у конкретному варіанті втілення легкий ланцюг описаного авторами антитіла є каппа-легким ланцюгом.

У конкретних варіантах втілення описане авторами антитіло включає важкий ланцюг, який включає або складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 2. У конкретних варіантах втілення описане авторами антитіло включає легкий ланцюг, який включає або складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 1 і включає важкий ланцюг, який включає або складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 2. У конкретних варіантах втілення описане авторами антитіло включає легкий ланцюг, який включає або складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 1. У конкретних варіантах втілення описане авторами антитіло включає важкий ланцюг, який включає або складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 2.

У конкретному варіанті втілення запропонованими авторами антитілами є моноклональні антитіла IgG4, які специфічно зв'язуються з PSGL-1. Відомо, що антитіла IgG4 піддаються процесові, який називається обміном Fab-фрагмента, також відомий як перетасування IgG4, при якому підвищена сприйнятливість дисульфідних зв'язків природного шарніра IgG4 до відновлення дозволяє відокремлювати й випадково реасоціювати важкі ланцюги для утворення змішаної популяції молекул IgG4 з рандомізованими парами важкого ланцюга та легкого ланцюга (Aalberse et al., 1999. *Int Arch Allergy Immunol* 118: 187-189; Labrijn, et al., 2009, *Nat Biotechnol* 27: 767-771; Schuurman et al., 2001. *Mol Immunol* 38: 1-8; van der Neut Kolfshoten et al., 2007. *Science* 317: 1554-1557).

Було продемонстровано, що мутація серину на пролін у позиції 241 за нумерацією Kabat (Kabat et al. 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) або у позиції 228 за показником EU (Edelman et al., 1969, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 63(1): 78-85) у шарнірній ділянці людського IgG4 в результаті веде до значного зниження утворення внутрішньоланцюгових дисульфідних зв'язків, що в результаті веде до відновлення молекул "напівантитіла" IgG4 та зниженої гетерогенності / перетасування молекул IgG4 (Bloom et al. 1997, *Protein Sci*, 6: 407-415; Angal et al., 1993, *Molecular Immunology*, 30(1): 105-108)). Також існують опубліковані повідомлення про те, що ця шарнірна мутація може знижувати перетасування IgG4 і збільшувати період піврозпаду молекул IgG4 in vivo (Labrijn, et al., 2009, *Nat Biotechnol* 27: 767-771; Stubenrauch, et

al., 2010, Drug Metab Dispos 38: 84-91). У публікації Van der Neut Kolfshoten et al. повідомлялося, що домен C_H3 IgG4, а не коровий шарнір переважно бере участь у реакції обміну Fab-фрагмента (див. Van der Neut Kolfshoten et al, 2007, Science, 317: 1554-1557 ("Van der Neut Kolfshoten") на стор. 1555, кол. 2). У публікації Van der Neut Kolfshaten

5 повідомлялося, що обмін домену C_H3 IgG1 на домен C_H3 IgG4 активує обмін Fab-фрагмента на IgG1, водночас обмінюючи домен C_H3 IgG4 скасовує обмін Fab-фрагмента на IgG4 (див. стор. 1555 та Фігуру 2D).

У конкретному варіанті втілення авторами пропонуються IgG4 антитіла або їх антиген-зв'язувальні фрагменти, які специфічно зв'язуються з PSGL-1 і які містять одне або кілька амінокислотних заміщень у шарнірній ділянці IgG4, причому вищезгадане антитіло або його антиген-зв'язувальний фрагмент зберігає специфічне зв'язування з вищезгаданим PSGL-1, і перетасування IgG4 є зниженим відносно антитіла, яке включає шарнірну ділянку IgG4, яка не включає вищезгадані одне або кілька амінокислотних заміщень. У конкретному варіанті втілення шарнірна ділянка IgG4 лише включає єдине амінокислотне заміщення. Прикладом "шарнірної

10 ділянки людського IgG4" є ділянка на важкому ланцюгу антитіла IgG4 між доменами C_H1 та C_H2, що складається з амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 12, як викладено у публікації Angal et al., 1993, Molecular Immunology, 30(1): 105-108.

У конкретному варіанті втілення зниження перетасування IgG4 визначають через виявлення меншої кількості половинних молекул антитіл або обміну фрагмента, створеного описаним

20 авторами антитілом, яке містить одне або кілька амінокислотних заміщень у шарнірній ділянці порівняно з кількістю половинних молекул антитіла або обміну фрагмента, створеного з молекули IgG4, яка містить шарнірну ділянку IgG4, яка не включає вищезгадані одне або кілька амінокислотних заміщень. Будь-який аналіз, добре відомий спеціалістам у даній галузі, може застосовуватися для виявлення вироблення половинного антитіла та молекул біспецифічного антитіла. Див., наприклад, публікацію Van der Neut Kolfshoten et al, 2007, Science, 317: 1554-1557, у якій наводяться приклади аналізів для виявлення вироблення біспецифічних антитіл.

У конкретному варіанті втілення авторами пропонуються моноклональні антитіла IgG4, які специфічно зв'язуються з PSGL-1 і включають амінокислотні заміщення серину на пролін в амінокислотній позиції 228 важкого ланцюга згідно з нумерацією покажчика EU.

У конкретному варіанті втілення описане авторами антитіло включає легкий ланцюг, який має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 1, та важкий ланцюг, який включає пролін у позиції 228 важкого ланцюга згідно з нумерацією покажчика EU.

У конкретному варіанті втілення моноклональне антитіло, яке імуноспецифічно зв'язується з людським PSGL-1, включає: (i) легкий ланцюг, який має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 1; та (ii) важкий ланцюг, який включає константну ділянку людського IgG4, що включає одне або кілька амінокислотних заміщень у шарнірній ділянці IgG4, причому вищезгадане антитіло зберігає специфічне зв'язування з вищезгаданим PSGL-1, і перетасування IgG4 є зниженим відносно антитіла, яке включає шарнірну ділянку IgG4, що не містить вищезгадані одне або

35 кілька амінокислотних заміщень.

У конкретному варіанті втілення моноклональне антитіло, яке імуноспецифічно зв'язується з людським PSGL-1, включає (i) легкий ланцюг, який має амінокислотну послідовність SEQ ID NO:1; та (ii) важкий ланцюг, який включає константну ділянку людського IgG4, що включає амінокислотне заміщення серину на пролін в амінокислотній позиції 228 важкого ланцюга згідно з нумерацією покажчика EU або позиції 241 згідно з системою нумерації Kabat (Kabat et al. 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; and Edelman et al., 1969, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 63(1): 78-85).

У конкретному варіанті втілення моноклональне антитіло, яке імуноспецифічно зв'язується з людським PSGL-1, включає: (i) ділянку VL ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 3; (ii) ділянку VH ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 4; та (iii) константну ділянку людського IgG4, що включає шарнірну ділянку IgG4, яка включає одне або кілька амінокислотних заміщень у шарнірній ділянці, причому вищезгадане антитіло зберігає специфічне зв'язування з PSGL-1, і перетасування IgG4 є зниженим відносно антитіла, яке включає шарнірну ділянку IgG4, що не містить вищезгадані одне або кілька амінокислотних заміщень.

50

55

У конкретному варіанті втілення моноклональне антитіло, яке імуноспецифічно зв'язується з людським PSGL-1, включає: (i) важкий ланцюг, який включає ділянку VH ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 4, та (ii) константну ділянку важкого ланцюга людського IgG4, яка включає амінокислотне заміщення серину на пролін в амінокислотній позиції 228 важкого ланцюга згідно з нумерацією покажчика EU.

60

У конкретному варіанті втілення моноклональне антитіло, яке імуноспецифічно зв'язується з людським PSGL-1 включає: (i) ділянку VL ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 3; (ii) важкий ланцюг, який включає ділянку VH ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 4; та (iii) константну ділянку важкого ланцюга людського IgG4, яка

5

включає амінокислотне заміщення серину на пролін в амінокислотній позиції 228 важкого ланцюга згідно з нумерацією покажчика EU.

У деяких варіантах втілення моноклональне антитіло IgG4, як описано авторами, включає VH CDR, які включають описані авторами амінокислотні послідовності (див., наприклад, Таблицю 3) та VL CDR, які мають описані авторами амінокислотні послідовності (див.,

10

наприклад, Таблицю 2), причому антитіло імуноспецифічно зв'язується з PSGL-1 і має мутацію шарнірної ділянки, яка зменшує перетасування IgG4 (наприклад, амінокислотне заміщення серину на пролін в амінокислоті 228 важкого ланцюга згідно з нумерацією покажчика EU). У конкретному варіанті втілення моноклональне антитіло IgG4 імуноспецифічно зв'язується

15

PSGL-1 і включає важкий ланцюг, який включає (a) ділянку VH ланцюга, яка включає SEQ ID NO: 8, 9 та 10; і (b) константну ділянку важкого ланцюга людського IgG4, яка включає амінокислотне заміщення серину на пролін в амінокислоті 228 важкого ланцюга згідно з нумерацією покажчика EU. У ще кращому варіанті антитіло також включає легкий ланцюг, який включає ділянку VL ланцюга, яка включає SEQ ID NO: 5, 6 та 7.

Таблиця 2 нижче представляє VL CDR (зокрема, VL CDR1, VL CDR2 та VL CDR3) амінокислотної послідовності 15A7H. Таблиця 3 нижче представляє VH CDR (зокрема, VH CDR1, VH CDR2 та VH CDR3) амінокислотної послідовності 15A7H. У конкретних варіантах втілення описане авторами антитіло, яке імуноспецифічно зв'язується з людським PSGL-1 (SEQ ID NO: 11), включає послідовності VL CDR у таблиці 2. У конкретних варіантах втілення описане авторами антитіло, яке імуноспецифічно зв'язується з людським PSGL-1 (SEQ ID NO: 11),

25

включає послідовності VH CDR, вибрані з-поміж представлених у Таблиці 3.

Таблиця 2

Амінокислотні послідовності VL CDR

Ab	VL CDR1	VL CDR2	VL CDR3
15A7H	RSSQSIVHNDGNTYFE (SEQ ID NO:5)	KVSNRFS (SEQ ID NO:6)	FQGSYVPLT (SEQ ID NO:7)

Таблиця 3

Амінокислотні послідовності VH CDR

Ab	VH CDR1	VH CDR2	VH CDR3
15A7H	SFGMH (SEQ ID NO:8)	YINGGSSTIFYANAVKG (SEQ ID NO:9)	YASYGGGAMDY (SEQ ID NO:10)

30

У конкретному варіанті втілення описане авторами антитіло імуноспецифічно зв'язується з людським PSGL-1 і включає: (i) варіабельну ділянку легкого ("VL") ланцюга, яка включає VL CDR1, VL CDR2 та VL CDR3, які мають амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 та SEQ ID NO: 7, відповідно; (ii) варіабельну ділянку важкого ("VH") ланцюга, яка включає VH CDR1, VH CDR2 та VH CDR3, які мають амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 та SEQ ID NO: 10, відповідно; та (iii) константну ділянку важкого ланцюга людського IgG4, яка має шарнірну ділянку IgG, яка включає одне або кілька амінокислотних заміщень у шарнірній ділянці, причому вищезгадане антитіло зберігає специфічне зв'язування з вищезгаданим PSGL-1, і перетасування IgG4 є зниженим відносно антитіла, яке включає шарнірну ділянку IgG4, що не містить вищезгадані одне або кілька амінокислотних заміщень.

35

40

У конкретному варіанті втілення описане авторами антитіло імуноспецифічно зв'язується з людським PSGL-1 і включає: (i) ділянку VL ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 3; (ii) ділянку VH ланцюга, яка включає VH CDR1, VH CDR2 та VH CDR3, які мають амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 та SEQ ID NO: 10, відповідно; та (iii) константну ділянку важкого ланцюга людського IgG4, що включає шарнірну ділянку IgG4, яка

45

включає одне або кілька амінокислотних заміщень у шарнірній ділянці, причому вищезгадане антитіло зберігає специфічне зв'язування з вищезгаданим PSGL-1, і перетасування IgG4 є

зниженим відносно антитіла, яке включає шарнірну ділянку IgG4, що не містить вищезгадані одне або кілька амінокислотних заміщень.

У конкретному варіанті втілення описане авторами антитіло імуноспецифічно зв'язується з людським PSGL-1 і включає: (i) ділянку VL ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 3; (ii) важкий ланцюг, який включає ділянку VH ланцюга, яка включає VH CDR1, VH CDR2 та VH CDR3, які мають амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 та SEQ ID NO: 10, відповідно; та (iii) константну ділянку важкого ланцюга людського IgG4, яка включає амінокислотне заміщення серину на пролін в амінокислотній позиції 228 важкого ланцюга згідно з нумерацією покажчика EU.

У конкретному варіанті втілення описане авторами антитіло імуноспецифічно зв'язується з людським PSGL-1 і включає: (i) ділянку VL ланцюга, яка включає VL CDR1, VL CDR2 та VL CDR3, які мають амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 та SEQ ID NO: 7, відповідно; (ii) ділянку VH ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 4; та (iii) константну ділянку важкого ланцюга людського IgG4, що включає шарнірну ділянку IgG4, яка включає одне або кілька амінокислотних заміщень у шарнірній ділянці, причому вищезгадане антитіло зберігає специфічне зв'язування з вищезгаданим PSGL-1, і перетасування IgG4 є зниженим відносно антитіла, яке включає шарнірну ділянку IgG4, що не містить вищезгадані одне або кілька амінокислотних заміщень.

У конкретному варіанті втілення описане авторами антитіло імуноспецифічно зв'язується з людським PSGL-1 і включає: (i) ділянку VL ланцюга, яка включає VL CDR1, VL CDR2 та VL CDR3, які мають амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 та SEQ ID NO: 7, відповідно; (ii) важкий ланцюг, який включає ділянку VH ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 4; та (iii) константну ділянку важкого ланцюга людського IgG4, яка включає амінокислотне заміщення серину на пролін в амінокислотній позиції 228 важкого ланцюга згідно з нумерацією покажчика EU.

У конкретних варіантах втілення описане авторами антитіло, яке імуноспецифічно зв'язується з PSGL-1, наприклад, поліпептидом людського PSGL-1 SEQ ID NO:11, включає каркасні ділянки (наприклад, каркасні ділянки VL домену та VH домену). Необмежувальні приклади людських каркасних ділянок описуються у джерелах існуючого рівня техніки; наприклад, див. Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242).

Таблиця 4 нижче представляє амінокислотні послідовності VL каркаса (FR) (зокрема, послідовності VL FR1, VL FR2, VL FR3 та VL FR4) антитіла 15A7H. Таблиця 5 нижче представляє амінокислотні послідовності VH FR (зокрема, послідовності VH FR1, VH FR2, VH FR3 та VH FR4) антитіла 15A7H.

Таблиця 4

Амінокислотні послідовності VL FR

Ab	VL FR1	VL FR2	VL FR3	VL FR4
15A7H	DIQMTQSPSSLS ASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 13)	WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 14)	GVPSRFSGSGSGTHF TLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 15)	FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 16)

Таблиця 5

Амінокислотні послідовності VH FR

Ab	VH FR1	VH FR2	VH FR3	VH FR4
15A7H	EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTFS (SEQ ID NO: 17)	WVRQAPGKGLEWVA (SEQ ID NO: 18)	RFTISRDNAKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 19)	WGQGTLLVTVSS (SEQ ID NO: 20)

У деяких варіантах втілення вищеописані антитіла IgG4, які мають мутацію у шарнірній ділянці, яка зменшує перетасування IgG4, включають VL FR, які мають описану авторами амінокислотну послідовність (див. Таблицю 4). У конкретних варіантах втілення описане авторами антитіло включає ділянку VL ланцюга, яка включає FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 та FR4 з Таблиць 1 та 3.

У деяких варіантах втілення вищеописані антитіла IgG4, які мають мутацію у шарнірній

ділянці, яка зменшує перетасування IgG4, включають VH FR, які мають описану авторами амінокислотну послідовність (див. Таблицю 5). У конкретних варіантах втілення антитіло включає ділянку VH ланцюга, яка включає FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 та FR4 з Таблиць 2 та 4.

В іншому конкретному варіанті втілення описане авторами моноклональне антитіло IgG4 включає (i) ділянку VL ланцюга, яка включає VL FR1, VL FR2, VL FR3 та VL FR4, які мають амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 13, 14, 15 та 16, відповідно; та (ii) ділянку VH ланцюга, яка включає VH FR1, VH FR2, VH FR3 та VH FR4, які мають амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 17, 18, 19 та 20, відповідно, і має мутацію у шарнірній ділянці, яка зменшує перетасування IgG4. У конкретному варіанті втілення описане авторами антитіло включає ділянку VL ланцюга, яка включає VL FR1, VL FR2, VL FR3 та VL FR4, які мають амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 13, 14, 15 та 16, відповідно. В іншому конкретному варіанті втілення описане авторами антитіло включає ділянку VH ланцюга, яка включає VH FR1, VH FR2, VH FR3 та VH FR4, які мають амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 17, 18, 19 та 20, відповідно.

У конкретних варіантах втілення глікозилювання константної ділянки описаних авторами антитіл може бути модифіковане. Наприклад, може бути створена аглікозилована константна ділянка антитіла (наприклад, константна ділянка антитіла без глікозилювання), або може бути створена константна ділянка антитіла, яка включає мутацію або заміщення в одному або кількох сайтах глікозилювання для видалення глікозилювання в одному або кількох сайтах глікозилювання.

Глікозилювання може відбуватися через N-зв'язане (або аспарагін-зв'язане) глікозилювання або O-зв'язане глікозилювання. N-зв'язане глікозилювання включає вуглеводну модифікацію в NH₂ групі бокового ланцюга амінокислоти аспарагіну у поліпептиді. O-зв'язане глікозилювання включає вуглеводну модифікацію у гідроксильній групі на боковому ланцюгу амінокислоти серину, треоніну або гідроксилізіну.

У деяких варіантах втілення аглікозиловані антитіла можуть бути утворені у бактеріальних клітинах, у яких є відсутнім необхідний механізм глікозилювання. Клітини зі зміненим механізмом глікозилювання є описаними у джерелах існуючого рівня техніки і можуть застосовуватись як клітини-хазяї, в яких мають бути експресовані описані авторами рекомбінантні антитіла для утворення у такий спосіб антитіла зі зміненим глікозилюванням. Див., наприклад, Shields, R.L. et al. (2002) J. Biol. Chem. 277: 26733-26740; Umana et al. (1999) Nat. Biotech. 17: 176-1, а також Європейський патент № EP 1,176,195; публікації PCT WO 03/035835; WO 99/54342.

У деяких варіантах втілення можуть здійснюватися одна або кілька модифікацій описаної авторами Fc ділянки антитіла, насамперед, для зміни однієї або кількох функціональних властивостей антитіла, таких, як період напіввиведення з сироватки, фіксація комплементу, зв'язування Fc рецептора та/або антиген-залежна клітинна цитотоксичність. Ці модифікації є відомими спеціалістам у даній галузі й описуються, наприклад, у публікації міжнародної патентної заявки № WO 2008/153926 A2. Прикладами таких модифікацій є, крім інших: 1) зміна кількості цистеїнових залишків у шарнірній ділянці для сприяння складанню легких та важких ланцюгів або для збільшення або зменшення стійкості антитіла; 2) мутація однієї або кількох амінокислот на межі CH2-CH3 доменів Fc-шарнірного фрагмента антитіла для скорочення біологічного періоду напіввиведення антитіла; 3) заміна однієї або кількох амінокислот, вибраних з-поміж амінокислотних залишків 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 та 322 згідно з показником EU Kabat, на інший амінокислотний залишок, таким чином, щоб антитіло мало змінену афінність до ефекторного ліганду, але зберігало антиген-зв'язувальну здатність батьківського антитіла; та/або 4) модифікація однієї або кількох амінокислот у позиціях 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 або 439 згідно з показником EU Kabat для підвищення здатності антитіла до опосередкування залежної від антитіла клітинної цитотоксичності (ADCC) і/або для підвищення афінності антитіла до Fc γ рецептора. Авторами пропонуються антитіла та похідні від антитіл антиген-зв'язувальні фрагменти, які імуноспецифічно зв'язуються з PSGL-1 і які можуть регулювати активність PSGL-1. У деяких варіантах втілення запропоноване авторами антитіло та похідний від антитіла антиген-зв'язувальний фрагмент імуноспецифічно зв'язується з PSGL-1 без інгібування зв'язування PSGL-1 з P-селектином і викликає апоптоз активованих Т-клітин. Активність PSGL-1 може бути пов'язана з будь-якою активністю PSGL-1, відомою або описаною у джерелах існуючого рівня техніки, такою, як активація Т-клітин під час запальної реакції. Фрази "активність PSGL-1" або "функція PSGL-1" вживаються взаємозамінно. У деяких аспектах активність PSGL-1 викликається лігандом PSGL-1 (наприклад, P-селектином), який зв'язується з

PSGL-1.

У деяких варіантах втілення описане авторами антитіло проти PSGL-1 або похідний від антитіла антиген-зв'язувальний фрагмент не блокує або не інгібує зв'язування Р-селектину з PSGL-1.

5 У конкретному варіанті втілення описане авторами антитіло або похідний від антитіла антиген-зв'язувальний фрагмент зменшує рекрутинг лейкоцитів під час запальної реакції.

У деяких аспектах описане авторами антитіло або похідний від антитіла антиген-зв'язувальний фрагмент зменшує або інгібує виживаність клітин, які експресують PSGL-1 і реагують на активність сигналу PSGL-1 (наприклад, клітин, які розмножуються у відповідь на лігандну стимуляцію PSGL-1, сигнал або зв'язування з селектином PSGL-1), наприклад, викликає апоптоз в активованих Т-клітинах. Аналізи виживаності клітин описуються у джерелах існуючого рівня техніки і можуть легко здійснюватися спеціалістами у даній галузі. Наприклад, життєздатність клітин оцінюють шляхом застосування забарвлення трипановим синім або інших маркерів смерті або життєздатності клітин, відомих спеціалістам у даній галузі (наприклад, Annexin-1, пропідійодиду (PI) або 7-AAD, див. Gerber A, Bohne M, Rasch J, Struy H, Ansorge S, Gollnick H., 2000. Investigation of annexin V binding to lymphocytes after extracorporeal photoimmunotherapy as an early marker of apoptosis. *Dermatology*. 2000; 201(2): 111-7, Coder, D. M. 2001. Assessment of Cell Viability. *Current Protocols in Cytometry*. 9.2.1 - 9.2.14, and Muppidi, J., Porter, M. and Siegel, R. M. 2004. Measurement of Apoptosis and Other Forms of Cell Death. *Current Protocols in Immunology*. 59: 3.17.1 - 3.17.36.).

У конкретних варіантах втілення описані авторами антитіла специфічно зв'язуються з PSGL-1 і інгібують (наприклад, частково або повністю інгібують) виживаність активованих Т-клітин, як визначається способами, описаними авторами або відомими спеціалістам у даній галузі (наприклад, аналізу з витіснення трипанового синього, див. Coder, D. M. 2001. Assessment of Cell Viability. *Current Protocols in Cytometry*. 9.2.1 - 9.2.14). У деяких варіантах втілення термін "інгібувати" або "інгібування" означає зниження або запобігання виживаності активованих Т-клітин. Виживаність активованих Т-клітин може бути знижена приблизно на 10 %, приблизно на 20 %, приблизно на 30 %, приблизно на 40 %, приблизно на 50 %, приблизно на 60 %, приблизно на 70 %, приблизно на 80 %, приблизно на 90 %, приблизно на 100 %, приблизно на 125 %, приблизно на 150 % або більше порівняно з контролем (наприклад, Виживаність Т-клітин за відсутності описаних авторами антитіл або у присутності неспецифічного антитіла).

У деяких аспектах описане авторами антитіло проти PSGL-1 може викликати апоптоз (наприклад, запрограмовану загибель клітин) активованих Т-клітин, які експресують PSGL-1. Аналізи апоптозу описуються у джерелах існуючого рівня техніки і можуть легко здійснюватися спеціалістом у даній галузі (див., наприклад, Muppidi, J., Porter, M. and Siegel, R. M. 2004. Measurement of Apoptosis and Other Forms of Cell Death. *Current Protocols in Immunology*. 59: 3.17.1 - 3.17.36). Термін "викликати" або "викликання" означає започаткування або підвищення апоптозу до рівня, вищого за контрольний. Апоптоз активованих Т-клітин може бути викликаний приблизно на 10 %, приблизно на 20 %, приблизно на 30 %, приблизно на 40 %, приблизно на 50 %, приблизно на 60 %, приблизно на 70 %, приблизно на 80 %, приблизно на 90 %, приблизно на 100 %, приблизно на 125 %, приблизно на 150 % або більше порівняно з контролем (наприклад, апоптоз активованих Т-клітин за відсутності описаних авторами антитіл або у присутності неспецифічного антитіла).

Т-клітини та лінії Т-клітин, які є прийнятними для застосування в описаних авторами аналізах, які стосуються активності PSGL-1, є загальнодоступними (наприклад, ARR, DU.528, Jurkat, H-SB2, RPMI 8402, CML-T1, Karpas 45, KE-37/SKW-3, SUP-T1, SUP-T3, MOLT 3/4, P12-Ichikawa, PF-382, CCRF-CEM, HPB-ALL, K-T1, TALL-1, MOLT 16/17, TALL-104, DND-41, Loucy, MOLT 13, Peer/Be13, HUT 78/H9, HUT 102, MT-1, DEL, JB6, Karpas 299, SU-DHL1, 12H5, 3DO54.8, 3DO11.10, 8DO51.15 або 3DO18.3) або можуть бути легко розпізнані з застосуванням способів, відомих спеціалістам у даній галузі (див., наприклад, Thornton, A. M. 2003. Fractionation of T and B Cells Using Magnetic Beads. *Current Protocols in Immunology*. 55: 3.5A.1 - 3.5A.11., Hathcock, K. 2001. T Cell Enrichment by Cytotoxic Elimination of B Cells and Accessory Cells. *Current Protocols in Immunology*. 00: 3.3.1 - 3.3.5., Horgan, K., Shaw, S. and Boirivant, M. 2009. Immunomagnetic Purification of T Cell Subpopulations. *Current Protocols in Immunology*. 85: 7.4.1 - 7.4.9., and Kanof, M. E. 2001. Purification of T Cell Subpopulations. *Current Protocols in Immunology*. 00: 7.3.1 - 7.3.5). У конкретних варіантах втілення клітини або лінії клітин для застосування в аналізах проліферації клітин можуть експресувати PSGL-1, ендегенно або рекомбінантно. Клітини або лінії клітин для застосування в аналізах життєздатності клітин можуть експресувати PSGL-1, ендегенно або рекомбінантно, і здійснювати зміни у життєздатності клітин у відповідь на зв'язування з лігандом PSGL-1 або антитілом проти PSGL-

1. Клітини або лінії клітин для застосування в аналізах апоптозу можуть експресувати PSGL-1, ендогенно або рекомбінантно, і здійснювати зміни в апоптозі у відповідь на зв'язування з лігандом PSGL-1 або антитілом проти PSGL-1. В оптимальному варіанті клітини або лінії клітин є людськими (наприклад, ARR, DU.528, Jurkat, H-SB2, RPMI 8402, CML-T1, Karpas 45, KE-37/SKW-3, SUP-T1, SUP-T3, MOLT 3/4, P12-Ichikawa, PF-382, CCRF-CEM, HPB-ALL, K-T1, TALL-1, MOLT 16/17, TALL-104, DND-41, Locusy, MOLT 13, Peer/Be13, HUT 78/H9, HUT 102, MT-1, DEL, JB6, Karpas 299 або SU-DHL1).

Способи визначення імуноспецифічного зв'язування антитіла з його антигеном-мішенню є загальнодоступними й описуються у джерелах існуючого рівня техніки. Наприклад, афінність та властивості зв'язування антитіла з його антигеном-мішенню можуть визначатися різними способами *in vitro* аналізу (біохімічного або імунологічного аналізу), відомими спеціалістам у даній галузі, такими, як рівноважні способи (наприклад, імуносорбентний ферментний аналіз (ELISA) або радіоімуноаналіз (RIA)), або кінетичні (наприклад, аналіз Bıasoge™) та інші способи, такі, як аналізи непрямого зв'язування, аналізи конкурентного інгібування, резонансне перенесення енергії флуоресценції (FRET), імунопреципітація, гель-електрофорез та хроматографія (наприклад, гель-фільтрація). Згідно з цими та іншими способами, може застосовуватися мітка на одному або кількох з досліджуваних компонентів та/або різні способи виявлення, включаючи, крім інших, хромогенні, флуоресцентні, люмінесцентні або ізотопні мітки. У деяких варіантах втілення застосування міток не є необхідним; наприклад, у системах Bıasoge™ використовують природне явище поверхневого плазмонного резонансу (SPR) для забезпечення даних у реальному часі, без застосування міток.

У конкретному варіанті втілення описані авторами антитіла є виділеними. У конкретному варіанті втілення описані авторами антитіла є очищеними. У конкретному варіанті втілення описане авторами антитіло є рекомбінантним моноклональним антитілом.

У конкретному варіанті втілення авторами пропонується антитіло або похідний від антитіла антиген-зв'язувальний фрагмент, який було модифіковано у спосіб, придатний для великомасштабного виробництва. Він може включати клонування полінуклеотидних послідовностей, які кодують необхідні домени антитіла проти PSGL-1, такі, як одна або кілька CDR або FR, у прийнятний вектор експресії, який також містить полінуклеотидні послідовності, які кодують прийнятні константні ділянки, таким чином, щоб утворювалося повне антитіло. Полінуклеотидними послідовностями, які забезпечуються векторами експресії, є нуклеотидні послідовності, які можуть бути оптимізовані для максимізації виходу антитіла та його стійкості для умов вироблення культури клітин та процесів очищення.

Полінуклеотиди

У деяких аспектах авторами пропонуються полінуклеотиди, які включають нуклеотидну послідовність, яка кодує описане авторами антитіло або похідний від антитіла антиген-зв'язувальний фрагмент, які імуноспецифічно зв'язуються з а PSGL-1 антигеном, та вектори, які включають такі полінуклеотиди, для рекомбінантної експресії у клітинах-хазяях (наприклад, мікробних організмах, таких, як *E. coli*, та клітинах ссавців, таких, як мишачі клітини гібридами мишей, клітини CHO, та 3T3 фібробласти). Авторами пропонуються полінуклеотиди, які включають нуклеотидні послідовності, які кодують будь-яке з запропонованих авторами антитіл або похідних від антитіл антиген-зв'язувальних фрагментів, а також вектори, які включають такі полінуклеотидні послідовності, наприклад, вектори експресії для їх достатньої експресії у клітинах-хазяях, наприклад, клітинах ссавців. У конкретному варіанті втілення полінуклеотид, який включає нуклеотидні послідовності, які кодують будь-яке з описаних авторами антитіл або похідних від антитіл антиген-зв'язувальних фрагментів, є виділеними або очищеними.

У певних аспектах авторами пропонуються полінуклеотиди, які включають нуклеотидні послідовності, які кодують антитіла або похідні від антитіл антиген-зв'язувальні фрагменти, які імуноспецифічно зв'язуються з PSGL-1 і включають амінокислотну послідовність, як описано авторами.

У конкретних варіантах втілення описаний авторами полінуклеотид кодує важкий ланцюг, який має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2.

Полінуклеотиди можуть включати нуклеотидні послідовності, які кодують важкий ланцюг, який включає VH FR та CDR описаних авторами антитіл (див., наприклад, Таблиці 2 та 4), а також включає мутацію в шарнірній ділянці, яка зменшує перетасування IgG4.

Також авторами пропонуються полінуклеотиди, які кодують важкий ланцюг антитіла, який включає SEQ ID NO: 2, які є оптимізованими, наприклад, шляхом оптимізації кодону/РНК, заміни на гетерологічні сигнальні послідовності та видалення нестійких елементів мРНК. Також авторами пропонуються полінуклеотиди, які кодують легкий ланцюг антитіла, який включає SEQ ID NO: 1, які є оптимізованими, наприклад, шляхом оптимізації кодону/РНК, заміни на

гетерологічні сигнальні послідовності та видалення нестійких елементів мРНК. Способи утворення оптимізованих нуклеїнових кислот, які кодують антитіло або похідний від антитіла антиген-зв'язувальний фрагмент, для рекомбінантної експресії шляхом включення змін кодону та/або видалення інгібіторних ділянок в мРНК можуть здійснюватися шляхом пристосування способів оптимізації, описаних, наприклад, у патентах США №№ 5,965,726; 6,174,666; 6,291,664; 6,414,132 та 6,794,498, відповідно. Наприклад, потенційні сайти сплайсингу та нестійкі елементи (наприклад, багаті на А/Т або А/У елементи) у межах РНК можуть бути мutowані без зміни амінокислот, які кодуються нуклеїновокислотними послідовностями для підвищення стійкості РНК для рекомбінантної експресії. Для змін застосовують виродження генетичного коду, наприклад, з застосуванням альтернативного кодону для ідентичної амінокислоти. У деяких варіантах втілення може бути бажаною зміна одного або кількох кодонів для кодування консервативної мутації, наприклад, подібної амінокислоти з хімічною структурою та властивостями та/або функцією, які є подібними до первісної амінокислоти. Такі способи можуть посилювати експресію антитіла проти PSGL-1 або його антиген-зв'язувального фрагмента відносно експресії антитіла проти PSGL-1, яке кодується полінуклеотидами, які були оптимізовані. Крім того, полінуклеотидні послідовності можуть бути побудовані таким чином, щоб відповідати використанню оптимального кодону в клітині-хазяїні, наприклад, використанню кодону *E. coli* або використанню кодону CHO.

Оптимізована полінуклеотидна послідовність, яка кодує описане авторами антитіло або похідний від антитіла антиген-зв'язувальний фрагмент, може бути гібридизована з неоптимізованою полінуклеотидною послідовністю, яка кодує описане авторами антитіло або похідний від антитіла антиген-зв'язувальний фрагмент. У конкретних варіантах втілення оптимізована нуклеотидна послідовність, яка кодує описане авторами антитіло або похідний від антитіла антиген-зв'язувальний фрагмент, гібридизується за умов високої жорсткості з неоптимізованою полінуклеотидною послідовністю, яка кодує описане авторами антитіло або похідний від антитіла антиген-зв'язувальний фрагмент. У конкретному варіанті втілення оптимізована нуклеотидна послідовність, яка кодує описане авторами антитіло або похідний від антитіла антиген-зв'язувальний фрагмент, гібридизується за умов високої, середньої або низької жорсткості гібридизації з неоптимізованою нуклеотидною послідовністю, яка кодує описане авторами антитіло або похідний від антитіла антиген-зв'язувальний фрагмент. Інформація стосовно умов гібридизації міститься, наприклад, у публікації патенту США № US 2005/0048549 (наприклад, абзаци 72-73), яка є включеною до цього опису шляхом посилання у повному обсязі.

Полінуклеотиди одержують і нуклеотидні послідовності полінуклеотидів визначають будь-яким способом, відомим спеціалістам у даній галузі. Нуклеотидні послідовності, які кодують описані авторами антитіла або похідні від антитіла антиген-зв'язувальні фрагменти, та модифіковані варіанти цих антитіл або похідних від антитіл антиген-зв'язувальних фрагментів визначають, застосовуючи способи, добре відомі спеціалістам у даній галузі, тобто, нуклеотидні кодони, які кодують конкретні амінокислоти, складають таким чином, щоб утворювалася нуклеїнова кислота, яка кодує антитіло або похідний від антитіла антиген-зв'язувальний фрагмент. Такий полінуклеотид, який кодує антитіло, може бути складений з хімічно синтезованих олігонуклеотидів (наприклад, як описано у Kutmeier et al., 1994, BioTechniques 17:242), включаючи, наприклад, синтез перекривних олігонуклеотидів, які включають частини послідовності, яка кодує антитіло або похідний від антитіла антиген-зв'язувальний фрагмент, відпал та лігування цих олігонуклеотидів з наступною ампліфікацією лігованих олігонуклеотидів шляхом PCR. Різні способи утворення синтетичних генів з олігонуклеотидів є відомими спеціалістам у даній галузі.

В альтернативному варіанті полінуклеотид, який кодує описане авторами антитіло або похідний від антитіла антиген-зв'язувальний фрагмент, може бути утворений з нуклеїнової кислоти з прийнятного джерела (наприклад, гібридами) з застосуванням способів, добре відомих спеціалістам у даній галузі (наприклад, ПЛР та інших способів молекулярного клонування). Наприклад, ампліфікація шляхом ПЛР з застосуванням синтетичних праймерів, які гібридизуються з 3' та 5' кінцями відомої послідовності, можуть здійснюватися з застосуванням геномної ДНК, одержаної з клітин, які продукують потрібне антитіло, наприклад, клітин гібридами мишей. Такі способи ампліфікації шляхом ПЛР застосовують для одержання нуклеїнових кислот, які включають послідовність, яка кодує легкий ланцюг та/або важкий ланцюг антитіла. Такі способи ампліфікації шляхом ПЛР можуть застосовуватися для одержання нуклеїнових кислот, які включають послідовність, яка кодує варіабельну ділянку легкого ланцюга та/або варіабельну ділянку важкого ланцюга антитіла. Ампліфіковані нуклеїнові кислоти можуть бути клоновані у вектори для експресії у клітинах-хазяях і для подальшого

клонування, наприклад, для утворення химерних та гуманізованих антитіл. Константний ланцюг зазвичай являє собою каппа або лямбда для легкого ланцюга антитіла, для важкого ланцюга антитіла він може бути без обмежень будь-яким ізотипом IgG (наприклад, людським IgG1, IgG2, IgG3 або IgG4) або інших імуноглобулінів, включаючи алельні варіанти.

5 Якщо клон, який містить нуклеїнову кислоту, що кодує конкретне антитіло, є відсутнім, але послідовність молекули антитіла є відомою, нуклеїнова кислота, яка кодує імуноглобулін, може бути хімічно синтезована й клонована у репліковані вектори клонування з застосуванням будь-якого способу, добре відомого спеціалістам у даній галузі.

10 ДНК, яка кодує описані авторами антитіла або похідні від антитіл антиген-зв'язувальні фрагменти, можуть бути легко виділені й секвеновані з застосуванням традиційних процедур (наприклад, шляхом застосування олігонуклеотидних зондів, здатних специфічно зв'язуватися з нуклеїновими кислотами, які кодують важкі та легкі ланцюги антитіл). Відразу після виділення ДНК може бути поміщена у вектори експресії, які потім трансфікуються у прокаріотні або еукаріотні клітини-хазяї, такі, як клітини *E. coli*, дріжджі (*Pichia*, *Saccharomyces*) COS клітини

15 мавп, клітини яєчників китайського хом'ячка (*CHO*), клітини мієломи (NS0), клітини комарів або рослин, які за інших умов не продукують білок імуноглобуліну, для досягнення синтезу антитіл або похідних від антитіл антиген-зв'язувальних фрагментів у рекомбінантних клітинах-хазяях.

Клітини-хазяї та рекомбінантна експресія антитіл

20 У деяких аспектах авторами пропонуються клітини-хазяї, які рекомбінантно експресують описані авторами антитіла або похідні від антитіл антиген-зв'язувальні фрагменти та пов'язані з ними вектори експресії. Авторами пропонуються вектори експресії, які включають полінуклеотиди, які включають нуклеотидні послідовності, які кодують описані авторами антитіла або похідні від антитіл антиген-зв'язувальні фрагменти для рекомбінантної експресії у прокаріотних та еукаріотних клітинах-хазяях, в оптимальному варіанті - у клітинах ссавців.

25 Також авторами пропонуються клітини-хазяї, які включають такі вектори експресії для рекомбінантної експресії описаних авторами антитіл або похідних від антитіл антиген-зв'язувальних фрагментів. У конкретному аспекті авторами пропонуються способи одержання описаного авторами антитіла або похідного від антитіла антиген-зв'язувального фрагмента, які включають експресію такого антитіла або похідного від антитіла антиген-зв'язувального

30 фрагмента з клітини-хазяїна.

Рекомбінантна експресія описаних авторами антитіла або похідного від антитіла антиген-зв'язувального фрагмента, які імуноспецифічно зв'язуються з антигеном PSGL-1, включає побудову вектора експресії, який містить полінуклеотид, який кодує антитіло або похідний від антитіла антиген-зв'язувальний фрагмент. Відразу після одержання полінуклеотиду, який кодує

35 описане авторами антитіло або похідний від антитіла антиген-зв'язувальний фрагмент, вектор для вироблення антитіла або похідного від антитіла антиген-зв'язувального фрагмента може бути одержаний за допомогою технології рекомбінантної ДНК з застосуванням способів, добре відомих спеціалістам у даній галузі. Таким чином, авторами описуються способи одержання антитіла або похідного від антитіла антиген-зв'язувального фрагмента шляхом експресії

40 полінуклеотиду, який містить антитіло або похідний від антитіла антиген-зв'язувальний фрагмент, який кодує нуклеотидну(і) послідовність (послідовності). Способи, які є добре відомими спеціалістам у даній галузі, можуть застосовуватися для побудови векторів експресії, які містять кодуючі антитіло послідовності або кодуючі похідний від антитіла антиген-зв'язувальний фрагмент послідовності та відповідні транскрипційні та трансляційні контрольні

45 сигнали. До цих способів належать, наприклад, *in vitro* технології рекомбінантних ДНК, технології синтезу та *in vivo* генетична рекомбінація. Також пропонуються репліковані вектори, які включають нуклеотидну послідовність, яка кодує описане авторами антитіло, важкий або легкий ланцюг антитіла, варіабельний домен важкого або легкого ланцюга антитіла або похідний від антитіла антиген-зв'язувальний фрагмент, функціонально зв'язаний з промотором, зокрема, промотором, який забезпечує експресію у клітині ссавця. Такі вектори можуть

50 включати нуклеотидну послідовність, яка кодує константну ділянку молекули антитіла (див., наприклад, міжнародні публікації №№ WO 86/05807 та WO 89/01036; та Патент США № 5,122,464), і варіабельний домен антитіла може бути клонований у такий вектор для експресії повного важкого, повного легкого ланцюга, або повних як важкого, так і легкого ланцюгів.

55 Вектори експресії включають плазміди, ретровіруси, косміди, похідні від EBV епісоми, штучні хромосоми і т. ін. Вектор експресії та послідовності контролю експресії вибирають таким чином, щоб вони були сумісні з клітиною-хазяїном. Рекомбінантний вектор експресії також може кодувати сигнальний пептид, який сприяє секреції ланцюгів антитіла з клітини-хазяїна. Сигнальний пептид може бути сигнальним пептидом імуноглобуліну, гетерологічним пептидом з

60 відмінного від імуноглобуліну білка або штучним пептидом.

Вектор експресії переносять до клітини-хазяїна традиційними способами, відомими спеціалістам у даній галузі (наприклад, шляхом опосередкованої ліпосомами трансфекції, опосередкованої полікатіонами трансфекції, злиття протопластів, мікроін'єкцій, осадження фосфату кальцію, електропорації, перенесення вірусними векторами), а потім трансфіковані клітини культивують традиційними способами для одержання описаного авторами антитіла або похідного від антитіла антиген-зв'язувального фрагмента. Таким чином, авторами пропонуються клітини-хазяї, які містять полінуклеотид, який кодує описане авторами антитіло або похідний від антитіла антиген-зв'язувальний фрагмент, що функціонально зв'язується з гетерологічним промотором. У деяких варіантах втілення для експресії дволанцюгових антитіл вектори, які кодують як важкий, так і легкий ланцюги, можуть бути коекспресовані у клітині-хазяїні для експресії повної молекули імуноглобуліну, як детально описується нижче. У деяких варіантах втілення клітина-хазяїн містить вектор, який включає полінуклеотид, який кодує як важкий ланцюг, так і легкий ланцюг описаного авторами антитіла або його антиген-зв'язувальний фрагмент. У конкретних варіантах втілення клітина-хазяїн містить два різні вектори, причому перший вектор включає полінуклеотид, який кодує важкий ланцюг описаного авторами антитіла, або його фрагмент (наприклад, його антиген-зв'язувальний фрагмент), а другий вектор включає полінуклеотид, який кодує легкий ланцюг описаного авторами антитіла або його фрагмент (наприклад, його антиген-зв'язувальний фрагмент). В інших варіантах втілення перша клітина-хазяїн включає перший вектор, який включає полінуклеотид, який кодує важкий ланцюг описаного авторами антитіла або його фрагмент, а друга клітина-хазяїн включає другий вектор, який включає полінуклеотид, який кодує легкий ланцюг описаного авторами антитіла.

Різні системи векторів експресії у хазяях можуть застосовуватися для експресії описаних авторами молекул антитіла або похідних від антитіл антиген-зв'язувальних фрагментів (див., наприклад, Патент США № 5,807,715 та Патент США № 7,604,800). Такі системи експресії у хазяях представляють провідники, за допомогою яких можуть бути утворені потрібні кодуючі послідовності з подальшим їх очищенням, а також представляють Т-клітини, які у разі трансформації або трансфекції відповідними нуклеотидними кодуючими послідовностями можуть експресувати описану авторами молекулу антитіла або похідний від антитіла антиген-зв'язувальний фрагмент *in situ*. До них, крім інших, належать мікроорганізми, такі, як бактерії (наприклад, *E. coli* та *B. subtilis*), вектори експресії трансформованих ДНК рекомбінантних бактеріофагів, плазмідних ДНК або космідних ДНК, які містять кодуючі антитіло послідовності або кодуючі похідний від антитіла антиген-зв'язувальний фрагмент послідовності; дріжджі (наприклад, *Saccharomyces*, *Pichia*), трансформовані рекомбінантними векторами експресії дріжджів, які містять кодуючі антитіло послідовності або кодуючі похідний від антитіла антиген-зв'язувальний фрагмент послідовності; системи клітин комах, інфікованих рекомбінантними вірусними векторами експресії (наприклад, бакуловірусом), які містять кодуючі антитіло послідовності або кодуючі похідний від антитіла антиген-зв'язувальний фрагмент послідовності; системи клітин рослин (наприклад, зелених водоростей, таких, як *Chlamydomonas reinhardtii*), інфіковані рекомбінантними вірусними векторами експресії (наприклад, вірусом мозаїки цвітної капусти, CaMV; вірусом тютюнової мозаїки, TMV) або трансформовані рекомбінантними плазмідними векторами експресії (наприклад, Ti-плазмідною), які містять кодуючі антитіло послідовності або кодуючі похідний від антитіла антиген-зв'язувальний фрагмент послідовності; або системи клітин ссавців (наприклад, клітин COS, CHO, BHK, MDCK, HEK 293, NS0, PER.C6, VERO, CRL7030, HsS78Bst, HeLa та NIH 3T3), які містять рекомбінантні експресійні послідовності, які включають промотори та/або енхансери, які походять від геному клітин ссавців (наприклад, металотіонеїновий промотор, імуноглобуліновий промотор, актиновий промотор) або від вірусів ссавців (наприклад, пізній промотор аденовірусу; промотор вірусу вакцини 7.5K, CMV, Simian Virus 40). Іншими регуляторними елементами для експресії в еукаріотних клітинах є сигнали поліаденілування, такі, як BGH polyA, ранній або пізній polyA SV40. В альтернативному варіанті можуть застосовуватися сигнали поліаденілування імуноглобуліну або інших генів. В іншому конкретному варіанті втілення еукаріотні клітини, зокрема, для експресії описаного авторами моноклонального антитіла IgG4, застосовують для експресії описаного авторами антитіла або його антиген-зв'язувального фрагмента. Наприклад, клітини ссавців, такі, як клітини яєчників китайського хом'ячка (CHO), разом з вектором, таким, як основний проміжний промоторний елемент раннього гена з людського цитомегаловірусу, є ефективною експресійною системою для антитіл (Foehking et al., 1986, Gene 45:101; та Cockett et al., 1990, Bio/Technology 8:2). У деяких варіантах втілення описані авторами антитіла виробляються клітинами CHO або клітинами NS0. У конкретному варіанті втілення експресія нуклеотидних послідовностей, які кодують описані авторами антитіла або похідні від антитіл антиген-зв'язувальні фрагменти, які імуноспецифічно зв'язуються з антигеном PSGL-1,

регулюється конститутивним промотором, індукцибельним промотором або тканинноспецифічним промотором.

У бактеріальних системах багато векторів експресії можуть бути оптимальним чином вибрані залежно від передбаченого застосування молекули антитіла, яка експресується. Наприклад, якщо має бути вироблена велика кількість такого антитіла або похідного від антитіла антиген-зв'язувального фрагмента, для одержання фармацевтичних композицій молекули антитіла або похідного від антитіла антиген-зв'язувального фрагмента можуть бути бажаними вектори, які спрямовують експресію високого рівня злитих білкових продуктів, які легко піддаються очищенню.

Крім того, може бути вибраний штам клітин-хазяїв, який регулює експресію вставлених послідовностей або забезпечує модифікацію та процесинг генного продукту у конкретний потрібний спосіб. Такі модифікації (наприклад, глікозилювання) та процесинг білкових продуктів можуть бути важливими для функції білка. Різні клітини-хазяї мають характерні й специфічні механізми посттрансляційного процесингу та модифікації білків та генних продуктів. Прийнятні лінії клітин або клітини-хазяї можуть бути вибрані для забезпечення належної модифікації та процесингу чужорідного експресованого білка. Для цього використовують еукаріотні клітини-хазяї, які мають клітинний механізм для належного процесингу первинного транскрипту, глікозилювання та фосфорилювання генного продукту. До таких клітин-хазяїв ссавців, крім інших, належать CHO, VERO, BHK, Hela, COS, MDCK, HEK 293, NIH 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 та T47D, NS0 (лінія клітин мієломи мишей, яка ендегенно не виробляє імунoglobulinових ланцюгів), клітини CRL7030 та HsS78Bst. У деяких варіантах втілення описані авторами антитіла або похідні від антитіла антиген-зв'язувальні фрагменти виробляються у клітинах ссавців, таких, як клітини CHO.

Для довготривалого високопродуктивного вироблення рекомбінантних антитіл або похідних від антитіл антиген-зв'язувальних фрагментів перевага віддається стійкій експресії. Наприклад, лінії клітин ссавців, які стійко експресують молекулу антитіла або похідний від антитіла антиген-зв'язувальний фрагмент, можуть бути піддані інженерії. Замість застосування векторів експресії, які містять вірусні джерела реплікації, клітини-хазяї можуть бути трансформовані ДНК, контрольованою відповідними елементами контролю експресії (наприклад, промотором, енхансерами, послідовностями, термінаторами). Після введення чужорідної ДНК піддані інженерії клітини залишають для росту протягом 1-2 днів у неселективному середовищі з наступним переведенням на селективні середовища. Селектований маркер у рекомбінантній плазміді забезпечує резистентність до селекції й дозволяє клітинам стійко включати плазмиду в їхні хромосоми. Після клонування окремої клітини клітини розширюють до продукуючих ліній клітин. Цей спосіб може вигідно застосовуватися для інженерії ліній клітин, які експресують молекулу антитіла або похідний від антитіла антиген-зв'язувальний фрагмент. Такі піддані інженерії лінії клітин можуть бути особливо корисними для відбору та оцінки композицій, які прямо або непрямо взаємодіють з молекулою антитіла.

Можуть застосовуватися різні системи відбору, включаючи, крім інших, гени тимідинкінази вірусу простого герпесу (Wigler et al., 1977, Cell 11: 223), гіпоксантингуанінфосфорибозилтрансферази (Szybalska & Szybalski, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48: 202) та аденінфосфорибозилтрансферази (Lowy et al., 1980, Cell 22: 8-17), які можуть застосовуватися у tk-, hgprr- або aprt-клітинах, відповідно. Крім того антиметаболітна резистентність може застосовуватися як основа відбору таких генів: dhfr, який надає резистентності до метотрексату (Wigler et al., 1980, Natl. Acad. Sci. USA 77: 357; O'Hare et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 1527); gpt, який надає резистентності до мікофенолової кислоти (Mulligan & Berg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 2072); neo, який надає резистентності до аміноглікозиду G-418 (Wu and Wu, 1991, Biotherapy 3: 87-95; Tolstoshev, 1993, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32: 573-596; Mulligan, 1993, Science 260: 926-932; та Morgan and Anderson, 1993, Ann. Rev. Biochem. 62: 191-217; May, 1993, TIB TECH 11(5):155-2 15); i hygro, який надає резистентності гіроміцину (Santerre et al., 1984, Gene 30:147). Способи, загальновідомі серед спеціалістів галузі технологій рекомбінантних ДНК, можуть традиційним чином застосовуватися для відбору потрібного рекомбінантного клону, і такі способи описуються, наприклад, у публікаціях Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990); і у Розділах 12 та 13, Dracopoli et al. (eds.), Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY (1994); Colberre-Garapin et al., 1981, J. Mol. Biol. 150:1, які є включеними до цього опису шляхом посилання у повному обсязі.

Рівень експресії молекули антитіла або похідного від антитіла антиген-зв'язувального фрагмента може бути підвищений через ампліфікацію вектора (огляд див. у публікації

Bebbington and Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Vol. 3 (Academic Press, New York, 1987)). Якщо маркер у векторній системі, що експресує антитіло або похідний від антитіла антиген-зв'язувальний фрагмент, піддається ампліфікації, підвищення рівня інгібітора, присутнього у культурі клітини-хазяїна, збільшує кількість копій маркерного гена. Оскільки ампліфікована ділянка є асоційованою з геном антитіла або похідного від антитіла антиген-зв'язувального фрагмента, вироблення антитіла або похідного від антитіла антиген-зв'язувального фрагмента також збільшується (Crouse et al., 1983, Mol. Cell. Biol. 3: 257).

Клітина-хазяїн може бути спільно трансфікована з двома або більшою кількістю описаних авторами векторів експресії, причому перший вектор кодує одержаний з важкого ланцюга поліпептид, а другий вектор кодує одержаний з легкого ланцюга поліпептид. Два вектори можуть містити ідентичні селектовані маркери або різні маркери відбору, які забезпечують достатню експресію поліпептидів важкого та легкого ланцюга. Клітини-хазяї можуть бути спільно трансфіковані з різною кількістю двох або більшої кількості векторів експресії.

В альтернативному варіанті може застосовуватись один вектор, який кодує і є здатним експресувати поліпептиди як важкого, так і легкого ланцюга. Кодуючі послідовності для важкого та легкого ланцюгів можуть включати кДНК або геномну ДНК. Вектори експресії можуть бути моноцистронними або поліцистронними. Наприклад, послідовність біцистронної нуклеїнової кислоти може включати у нижчезазначеному порядку промотор, важкий ланцюг описаного авторами антитіла та легкий ланцюг описаного авторами антитіла. У такому векторі експресії транскрипція обох ланцюгів може бути викликана промотором, тоді, як трансляція мРНК з важкого ланцюга може здійснюватися через кеп-залежний механізм сканування, а трансляція мРНК з легкого ланцюга може здійснюватися через кеп-незалежний механізм, наприклад, через IRES.

У деяких варіантах втілення молекули антитіл або похідні від антитіл антиген-зв'язувальні фрагменти утворюються шляхом культивування клітин-хазяїв протягом періоду часу, достатнього для забезпечення можливості високої експресії молекул у клітинах-хазяях. У деяких варіантах втілення молекули експресуються у клітинах ссавців, наприклад, у клітинах СНО у безсироваткових середовищах або у хімічно визначених середовищах. У деяких варіантах втілення молекули антитіл або похідні від антитіл антиген-зв'язувальні фрагменти видобувають з культурального середовища як секретований поліпептид, або ж вони можуть видобуватися з лізатів клітин-хазяїв, якщо вони експресуються, наприклад, без секреторного сигналу.

Відразу після утворення описаних авторами молекули антитіла або похідного від антитіла антиген-зв'язувального фрагмента шляхом рекомбінантної експресії вони можуть бути очищені будь-яким відомим спеціалістам у даній галузі способом очищення молекули імуноглобуліну, наприклад, шляхом хроматографії (наприклад, іонообмінної, афінної, зокрема, через афінність до специфічного антигена на Протеїні А, та хроматографії на колонці з молекулярними ситами), центрифугування, диференційної розчинності, осадження, фільтрації, HPLC з оберненням фаз, або з застосуванням іншої стандартної технології очищення білків для одержання практично гомогенних і біологічно активних композицій молекул. Крім того, описані авторами антитіла або похідні від антитіл антиген-зв'язувальні фрагменти можуть бути злиті з гетерологічними поліпептидними послідовностями для сприяння очищенню.

У конкретних варіантах втілення описане авторами антитіло або похідний від антитіла антиген-зв'язувальний фрагмент виділяють або очищують. Наприклад, у конкретному варіанті втілення композиція описаного авторами антитіла або похідного від антитіла антиген-зв'язувального фрагмента практично не містить клітинного матеріалу, компонентів середовища та/або хімічних попередників. Вираз "практично не містить клітинного матеріалу" охоплює композиції антитіла або похідного від антитіла антиген-зв'язувального фрагмента, в яких антитіло або похідний від антитіла антиген-зв'язувальний фрагмент є відокремленим від клітинних компонентів клітин, з яких його виділено або одержано рекомбінантним шляхом. Якщо антитіло або похідний від антитіла антиген-зв'язувальний фрагмент одержують рекомбінантним шляхом, вони також в цілому практично не містять культурального середовища, тобто, культуральне середовище складає менше, ніж приблизно 20 %, 10 %, 2 %, 1 %, 0,5 % або 0,1 % об'єму білкової композиції. Якщо антитіло або похідний від антитіла антиген-зв'язувальний фрагмент одержують шляхом хімічного синтезу, вони в цілому практично не містять хімічних попередників або інших хімічних речовин, тобто, є відокремленими від хімічних попередників або інших хімічних речовин, які беруть участь у синтезі білка. Відповідно, такі композиції антитіла або похідного від антитіла антиген-зв'язувального фрагмента містять менше, ніж приблизно 30 %, 20 %, 10 %, 5 % (за сухою масою) хімічних попередників або сполук, відмінних

від потрібного антитіла або потрібного похідного від антитіла антиген-зв'язувального фрагмента.

Фармацевтичні композиції

Авторами пропонуються композиції, фармацевтичні композиції, які включають описане авторами антитіло або похідний від антитіла антиген-зв'язувальний фрагмент. У певних аспектах описані авторами композиції можуть призначатися для *in vitro*, *in vivo* або *ex vivo* застосування. У конкретних варіантах втілення авторами пропонується фармацевтична композиція, яка включає описані авторами антитіло або похідний від антитіла антиген-зв'язувальний фрагмент та фармацевтично прийнятний носій або наповнювач.

Терапевтичні композиції, що містять антитіло або похідний від антитіла антиген-зв'язувальний фрагмент згідно з винаходом, можуть приготуватися для зберігання шляхом змішування антитіла, яке має потрібний ступінь очищення, з оптимальними фізіологічно прийнятними носіями, наповнювачами або стабілізаторами (Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA; Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st ed. (2006) Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD) у формі ліофілізованих композицій або водних розчинів. Прийнятні носії, наповнювачі або стабілізатори є нетоксичними для реципієнтів у застосовуваних дозах та концентраціях і включають буфери, такі, як фосфат, цитрат, цитрат натрію дигідрат та інші органічні кислоти; та/або неіонні поверхнево-активні речовини, такі, як TWEEN™, PLURONICS™ або поліетиленгліколь (PEG).

Композиції, такі, як ті, що описуються авторами, також можуть містити більше однієї активної сполуки (наприклад, молекули, наприклад, описані авторами антитіло або антитіла), які можуть бути необхідними для конкретного показання, що піддається лікуванню. У деяких варіантах втілення композиції включають запропоновані авторами антитіло або похідний від антитіла антиген-зв'язувальний фрагмент та одну або кілька активних сполук з комплементарною активністю, які не мають негативного впливу одна на одну. Такі молекули відповідно є присутніми у комбінації у кількості, яка є ефективною для передбаченого призначення. Наприклад, описані авторами антитіло або похідний від антитіла антиген-зв'язувальний фрагмент можуть комбінуватися з одним або кількома іншими терапевтичними засобами. Така комбінована терапія може застосовуватися для пацієнтів періодично або одночасно або послідовно.

Композиції, які призначаються для введення *in vivo*, можуть бути стерильними. Це може легко здійснюватися шляхом фільтрації, наприклад, крізь стерильні фільтрувальні мембрани.

У конкретних аспектах запропоновані авторами фармацевтичні композиції містять терапевтично ефективну кількість запропонованого авторами антитіла або похідного від антитіла антиген-зв'язувального фрагмента та, необов'язково, один або кілька додаткових профілактичних або терапевтичних засобів у фармацевтично прийнятному носії. Такі фармацевтичні композиції можуть застосовуватися для профілактики та/або лікування описаних авторами порушення або хвороби, таких, як псоріаз, або одного або кількох його симптомів. Термін "терапевтично ефективна кількість" означає кількість, яка є безпечною й достатньою для профілактики або лікування хвороби. У контексті даного опису термін "лікувати", "лікований" або "лікування" означає забезпечення сприятливого або бажаного клінічного результату для суб'єкта з хворобою. До сприятливих або бажаних клінічних результатів, крім інших, належать послаблення симптомів, зниження ступеня хвороби, стабілізація (наприклад, відсутність погіршення) стану хвороби, затримка або уповільнення прогресування хвороби, послаблення або тимчасове полегшення стану хвороби та ремісія (часткова або повна), незалежно від того, чи піддаються вони виявленню. "Лікування" також може означати подовження тривалості життя порівняно з очікуваною тривалістю життя за відсутності отримання лікування.

До фармацевтичних носіїв, прийнятних для введення запропонованого авторами антитіла або похідного від антитіла антиген-зв'язувального фрагмента, належать будь-які носії, відомі спеціалістам у даній галузі як прийнятні для конкретного режиму введення. В одному варіанті втілення антитіло або похідний від антитіла антиген-зв'язувальний фрагмент рецептують у прийнятні фармацевтичні препарати, такі, як стерильні розчини або суспензії для парентерального введення.

Крім того, описані авторами антитіло або похідний від антитіла антиген-зв'язувальний фрагмент можуть бути рецептовані як окремий фармацевтично активний інгредієнт у композиції або можуть комбінуватися з іншими активними інгредієнтами (такими, як один або кілька інших профілактичних або терапевтичних агентів).

У композиціях запропоновані авторами антитіло або похідний від антитіла антиген-зв'язувальний фрагмент змішують з прийнятним фармацевтичним носієм. Концентрація антитіла або похідного від антитіла антиген-зв'язувального фрагмента у композиціях може бути

ефективною, наприклад, для доставлення після введення кількості, яка забезпечує профілактику та/або лікування описаних авторами порушення або хвороби (наприклад, запального порушення) або їх симптомів.

В одному варіанті втілення композиції рецептують для введення однієї дози. Для рецептування композиції масову частку сполуки розчиняють, суспендують, диспергують або іншим чином змішують у вибраному носії в ефективній концентрації, таким чином, щоб забезпечувалося полегшення, лікування порушення або послаблення одного або кількох симптомів.

У деяких аспектах запропоновані авторами антитіло або похідний від антитіла антиген-зв'язувальний фрагмент є включеними до фармацевтично прийнятного носія в ефективній кількості, достатній для забезпечення терапевтично сприятливого ефекту за відсутності або за наявності мінімальних або незначних небажаних побічних ефектів для пацієнта, який піддається лікуванню. Терапевтично ефективна концентрація може визначатись емпірично шляхом випробування сполук в *in vitro* та *in vivo* системах з застосуванням традиційних способів з наступною екстраполяцією для доз, призначених для людини.

Концентрація антитіла або похідного від антитіла антиген-зв'язувального фрагмента у фармацевтичній композиції залежить, наприклад, від фізико-хімічних характеристик антитіла або похідного від антитіла антиген-зв'язувального фрагмента, режиму дозування та введеної кількості, а також інших чинників, відомих спеціалістам у даній галузі.

Фармацевтичні композиції в іншому варіанті втілення забезпечують дозу від приблизно 0,001 мг до приблизно 100 мг антитіла або похідного від антитіла антиген-зв'язувального фрагмента на кілограм маси тіла на день. Фармацевтичні дозовані лікарські форми можуть бути рецептовані таким чином, щоб забезпечувати від приблизно 0,001 мг до приблизно 100 мг та/або комбінацію інших необов'язкових суттєвих інгредієнтів на дозовану лікарську форму. У конкретному варіанті втілення антитіло або похідний від антитіла антиген-зв'язувальний фрагмент рецептують у концентрації 40 мг/мл.

Антитіло або похідний від антитіла антиген-зв'язувальний фрагмент можуть вводитися за один раз або можуть бути розділені на багато менших доз, які мають водитися з інтервалами часу. Слід розуміти, що точна доза та тривалість лікування залежать від описаних авторами хвороби або порушення, які підлягають лікуванню, і можуть визначатись емпірично з застосуванням відомих протоколів випробування, або шляхом екстраполяції на основі даних *in vivo* або *in vitro* випробувань. Слід розуміти, що значення концентрації та дози також можуть бути різними, залежно від тяжкості хвороби або порушення, які підлягають послабленню. Також слід розуміти, що для будь-якого конкретного суб'єкта певні режими дозування можуть регулюватися з часом згідно з індивідуальною потребою і на професійний розсуд особи, яка здійснює або контролює введення композицій.

Фармацевтичні композиції призначаються для введення людині та тваринам у дозованих лікарських формах, таких, як стерильні розчини або суспензії для парентерального введення, які містять прийнятну кількість описаного авторами антитіла або похідного від антитіла антиген-зв'язувального фрагмента. Антитіло або похідний від антитіла антиген-зв'язувальний фрагмент в одному варіанті втілення рецептують і вводять у дозованих лікарських формах або багатодозових лікарських формах. Дозовані лікарські форми у контексті даного опису означають фізично окремі одиниці, прийнятні для людини та тварин і окремо розфасовані, як відомо спеціалістам у даній галузі. Кожна окрема доза містить задану кількість антитіла або похідного від антитіла антиген-зв'язувального фрагмента, достатню для забезпечення бажаного терапевтичного ефекту, разом з потрібним фармацевтичним носієм, наповнювачем або розріджувачем. Прикладами дозованих лікарських форм є ампули та шприци. Дозовані лікарські форми можуть вводитися частками або їх кратною кількістю. Багатодозова форма являє собою кілька ідентичних одиничних дозованих форм, розфасованих в одному вмістищі, для введення у формі окремих доз. Прикладами багатодозових форм є флакони або пляшки, місткість яких вимірюється пінтами або галонами. Таким чином, багатодозова форма є кратною кількістю окремих доз, які не є розфасованими по окремих вмістищах.

У деяких варіантах втілення описані авторами антитіло або похідний від антитіла антиген-зв'язувальний фрагмент передбачаються у рідкій фармацевтичній композиції. Рідкі призначені для фармацевтичного введення композиції можуть приготуватися, наприклад, шляхом розчинення, диспергування або з застосуванням іншого способу змішування описаного авторами антитіла у носії, такому, як, наприклад, вода, сольовий розчин, водна декстроза, гліцерин, гліколі, етанол і т. ін., таким чином, щоб утворювалися розчин або суспензія. У разі необхідності призначена для введення фармацевтична композиція також може містити незначну кількість нетоксичних допоміжних речовин, таких, як зволожувачі, емульгатори,

солюбілізатори та pH буферні агенти і т. ін.

Способи одержання таких дозованих форм є відомими або очевидними для спеціалістів у даній галузі; див., наприклад, Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA; Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st ed. (2006) Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD.

Приготовляють дозовані форми або композиції, які містять антитіло у межах від 0,005 % до 99,9 % з рештою, що складається з нетоксичного носія. Способи одержання цих композицій є відомими спеціалістам у даній галузі.

Також передбачається парентеральне введення в одному варіанті втілення передбачає ін'єкцію, підшкірну, внутрішньом'язову або внутрішньовенну. Ін'єкційні лікарські засоби приготавливають у традиційних формах як рідкі розчини або суспензії, тверді форми, прийнятні для розчинення або суспендування у рідині перед ін'єкцією, або як емульсії. Ін'єкційні лікарські засоби, розчини та емульсії також містять один або кілька наповнювачів. Прийнятними наповнювачами є, наприклад, вода, сольовий розчин, декстроза, гліцерин або етанол. Крім того, у разі необхідності призначені для введення фармацевтичні композиції також можуть містити незначну кількість нетоксичних допоміжних речовин, таких, як зволожувачі або емульгатори, pH буферні агенти, стабілізатори, посилювачі розчинності та інші подібні агенти. Іншими шляхами введення можуть бути ентеральне введення, інтрацеребральне введення, назальне введення, внутрішньоартеріальне введення, внутрішньосерцеве введення, внутрішньокісткова інфузія, інтратекальне введення, внутрішньовенна інфузія, підшкірна імплантація або ін'єкція, внутрішньом'язове введення, внутрішньопрямкишкове введення, внутрішньовагінальне введення, внутрішньошлункове введення, внутрішньотрахеальне введення, внутрішньолегеневе введення та внутрішньочеревинне введення.

До композицій для парентеральне введення належать стерильні розчини, готові для ін'єкції, стерильні сухі розчинні продукти, такі, як ліофілізовані порошки, готові для комбінування з розчинником безпосередньо перед застосуванням, включаючи стерильні суспензії, готові для ін'єкції, стерильні сухі нерозчинні продукти, готові для комбінування з наповнювачем безпосередньо перед застосуванням, та стерильні емульсії. Розчини можуть бути водними або безводними.

У разі внутрішньовенного введення до прийнятних носіїв належать фізіологічний розчин або фосфатно-буферний розчин (PBS), вода та розчини, які містять загусники та солюбілізатори, такі, як глюкоза, поліетиленгліколь та поліпропіленгліколь та їх суміші.

До фармацевтично прийнятних носіїв, які застосовують у парентеральних композиціях, належать водні наповнювачі, безводні наповнювачі, протимікробні засоби, ізотонічні агенти, буфери, антиоксиданти, місцеві анестетики, суспендуючі та диспергуючі засоби, емульгатори, зв'язувальні або комплексоутворювальні агенти та інші фармацевтично прийнятні речовини. До фармацевтичних носіїв також належать етиловий спирт, поліетиленгліколь та пропіленгліколь для змішуваних з водою наповнювачів; та гідроксид натрію, хлористоводнева кислота, лимонна кислота або молочна кислота для регулювання pH.

Внутрішньовенна або внутрішньоартеріальна інфузія стерильного водного розчину, який містить антитіло, є прикладом ефективного способу введення. Іншим варіантом втілення є стерильний водний або олійний розчин або суспензія, які містять активний матеріал і вводяться ін'єкційним шляхом у разі необхідності для забезпечення потрібного фармакологічного ефекту.

У конкретному варіанті втілення фармацевтичний препарат включає цитрат натрію, хлорид натрію, лимонної кислоти, полісорбат 80 та воду. У конкретному варіанті втілення фармацевтичний препарат включає цитрат натрію, хлорид натрію та лимонну кислоту. У конкретному варіанті втілення фармацевтичний препарат включає 9,1 mM цитрату натрію, 150 mM хлориду натрію та 0,9 mM лимонної кислоти. У конкретному варіанті втілення фармацевтичний препарат включає описані авторами антитіло або кон'югат у концентрації 0,267 mM. У конкретному варіанті втілення фармацевтичний препарат включає 2,676 г/л цитрату натрію, 8,766 г/л хлориду натрію, 0,2 г/л полісорбату 80 та 0,189 г/л лимонної кислоти. У конкретному варіанті втілення фармацевтичний препарат включає описане авторами антитіло або похідний від антитіла антиген-зв'язувальний фрагмент у концентрації 40 г/л. В оптимальному варіанті вищезазначені фармацевтичні препарати мають рівень pH 6,0.

В інших варіантах втілення фармацевтичні композиції являють собою ліофілізовані порошки, вологовміст яких може бути відновлений для введення у формі розчинів, емульсій та інших сумішей. Вони також можуть бути піддані відновленню вологовмісту й рецептовані як тверді речовини або гелі.

Ліофілізований порошок приготавливають шляхом розчинення запропонованого авторами антитіла у прийнятному розчиннику. У деяких варіантах втілення ліофілізований порошок є

стерильним. Розчинник може містити наповнювач, який поліпшує стійкість або інший фармакологічний компонент порошку або відновленого розчину, приготовленого з порошку. До наповнювачів, які можуть застосовуватися, належать, крім інших, декстроза, сорбіт, фруктоза, кукурудзяний сироп, ксиліт, гліцерин, глюкоза, цукроза або інший прийнятний агент. Розчинник також може містити буфер, такий, як цитрат натрію або фосфат калію, або інший буфер, відомий спеціалістам у даній галузі, в одному варіанті втілення - з приблизно нейтральним рН. Наступна стерильна фільтрація розчину з подальшою ліофілізацією за стандартних умов, відомих спеціалістам у даній галузі, забезпечує потрібну композицію. В одному варіанті втілення утворений в результаті розчин розподіляють по флаконах для ліофілізації. Кожен флакон містить одну дозу або кілька доз сполуки. Ліофілізований порошок може зберігатись у відповідних умовах, наприклад, при температурі від приблизно 4 °C до кімнатної.

Відновлення вологовмісту цього ліофілізованого порошку водою для ін'єкцій забезпечує композицію для застосування при парентеральному введенні. Для відновлення вологовмісту ліофілізований порошок додають до стерильної води або іншого прийнятного носія. Точна кількість залежить від вибраної сполуки. Така кількість може бути визначена емпірично.

Терапевтичні способи

Описані авторами антитіла та похідні від антитіл антиген-зв'язувальні фрагменти застосовують для лікування порушень та хвороб, пов'язаних або викликаних (повністю або частково) підвищеною проліферацією та/або збільшеною кількістю активованих Т-клітин порівняно з проліферацією та/або кількістю активованих Т-клітин у здорових осіб або суб'єктів, які не мають конкретного порушення або хвороби. Такі хвороби та порушення є відомими спеціалістам у даній галузі або можуть бути визначені спеціалістом у даній галузі. У конкретному варіанті втілення описані авторами антитіла та похідні від антитіл антиген-зв'язувальні фрагменти застосовують для лікування запальної хвороби або порушення. В одному варіанті втілення запальна хвороба є аутоімунною хворобою. У конкретному варіанті втілення запальною хворобою або порушенням є псоріаз, бляшковий псоріаз, псоріатичний артрит, ревматоїдний артрит, хвороба Крона та анкілозний спондиліт.

Необмежувальними прикладами порушень та хвороб, які піддаються лікуванню з застосуванням описаних авторами антитіл та похідних від антитіл антиген-зв'язувальних фрагментів є псоріаз, хвороба Крона, анкілозний спондиліт, артрит (включаючи ревматоїдний артрит, ювенільний ревматоїдний артрит, остеоартрит та псоріатичний артрит), цукровий діабет, розсіяний склероз, енцефаломієліт, важка міастенія, системний червоний вовчак, аутоімунний тиреоїдит, дерматит (включаючи atopічний дерматит та екзематозний дерматит), синдром Шегрена, афтозна виразка, ірит, кон'юнктивіт, кератокон'юнктивіт, діабет I типу, запальні хвороби кишечника, виразковий коліт, астма, алергічна астма, шкірний червоний вовчак, склеродерма, вагініт, проктит, медикаментозні висипи, лепрозні зворотні реакції, вузлова лепрозна еритема, аутоімунний увеїт, алергічний енцефаломієліт, гостра некротизуюча геморагічна енцефалопатія, ідіопатична двостороння прогресуюча сенсоневральна туговухість, апластична анемія, уроджена апластична анемія, ідіопатична тромбоцитопенія, поліхондрит, гранулематоз Вегенера, хронічний активний гепатит, синдром Стівенса-Джонсона, ідіопатичний спру, червоний плесканий лишай, хвороба Грейвса, саркоїдоз, первинний біліарний цироз, задній увеїт, інтерстиціальний фіброз легенів, алергії, такі, як atopічна алергія, СНІД та Т-клітинні неоплазії, такі, як лейкози або лімфоми.

Крім того, антитіла та похідні від антитіл антиген-зв'язувальні фрагменти застосовують для профілактики та/або лікування деяких порушень та хвороб, пов'язаних або викликаних (повністю або частково) підвищеною проліферацією та/або кількістю активованих Т-клітин порівняно з проліферацією та/або кількістю активованих Т-клітин у здорових осіб або суб'єктів, які не мають конкретного порушення або хвороби. Необмежувальними прикладами порушень та хвороб, які піддаються профілактиці або лікуванню з застосуванням описаних авторами антитіл та похідних від антитіл антиген-зв'язувальних фрагментів, є реакція "трансплантат проти хазяїна" та випадки відторгнення трансплантатів (включаючи відторгнення трансплантатів з використанням алогенних або ксеногенних тканин), наприклад, при трансплантації кісткового мозку, трансплантація печінки, трансплантація нирок або трансплантація будь-якого органа або тканини.

Відповідно, авторами пропонуються способи профілактики та лікування описаних авторами хвороб та порушень з застосуванням описаних авторами антитіла або похідного від антитіла антиген-зв'язувального фрагмента. У конкретному варіанті втілення такі способи включають введення суб'єктові, який цього потребує, терапевтично ефективної кількості описаного авторами антитіла або похідного від антитіла антиген-зв'язувального фрагмента. У конкретних варіантах втілення антитілом, яке вводять для лікування описаних авторами порушень або

хвороб є 15A7H.

В одному варіанті втілення "лікування" порушення або хвороби означає послаблення хвороби або порушення, або принаймні одного її (його) явного симптому. В іншому варіанті втілення "лікування" означає послаблення принаймні одного вимірного фізичного параметра, пов'язаного з хворобою або порушенням, яке не обов'язково є помітним для суб'єкта. У ще одному варіанті втілення "лікування" означає стримування прогресування хвороби або порушення, фізично, наприклад, стабілізацію явного симптому, фізіологічно, наприклад, стабілізацію фізичного параметра, або і тим, і іншим чином.

У конкретних варіантах втілення описані авторами способи лікування забезпечують зменшення або послаблення прогресування, тяжкості та/або тривалості описаних авторами порушення або хвороби. В інших конкретних варіантах втілення описані авторами способи лікування зменшують один або кілька симптомів описаних авторами порушення або хвороби.

У конкретному варіанті втілення спосіб лікування описаних авторами порушення або хвороби дозволяє досягти принаймні одного, двох, трьох, чотирьох або більшої кількості нижчезазначених ефектів завдяки введенню терапевтично ефективної кількості описаного авторами антитіла або похідного від антитіла антиген-зв'язувального фрагмента: (i) зменшення або послаблення тяжкості порушення або хвороби та/або одного або кількох пов'язаних з ним (нею) симптомів; (ii) скорочення тривалості одного або кількох симптомів, пов'язаних з порушенням або хворобою; (iii) профілактики рецидиву порушення або хвороби; (iv) регресії порушення або хвороби та/або одного або кількох пов'язаних з ним (нею) симптомів; (v) зменшення шпиталізації суб'єкта; (vi) скорочення терміну шпиталізації; (vii) подовження тривалості життя суб'єкта; (viii) стримування прогресування порушення або хвороби та/або одного або кількох пов'язаних з ним (нею) симптомів; (ix) посилення або поліпшення терапевтичного ефекту іншої терапії; (x) зменшення або усунення порушення або хвороби; (xi) зниження смертності; (xii) зниження рівня шпиталізації; (xiii) запобігання розвитку або виникненню одного або кількох симптомів, пов'язаних з порушенням або хворобою.

В одному варіанті втілення "профілактика" порушення або хвороби означає повне або часткове стримування виникнення або розвитку порушення або хвороби.

У конкретному варіанті втілення хворобою або порушенням, що піддається лікуванню згідно з описаними авторами способами, є псоріаз. Загальновизнано, що Т-лімфоцити відіграють ключову роль у патогенезі псоріазу. У конкретному варіанті втілення спосіб лікування псоріазу включає введення суб'єктові, який цього потребує, терапевтично ефективної кількості описаного авторами антитіла або похідного від антитіла антиген-зв'язувального фрагмента. В іншому конкретному варіанті втілення спосіб послаблення або профілактики одного або кількох симптомів псоріазу включає введення суб'єктові, який цього потребує, терапевтично ефективної кількості описаного авторами антитіла або похідного від антитіла антиген-зв'язувального фрагмента. До симптомів псоріазу належать, крім інших, червоні плями на шкірі, вкриті сріблястими лусочками, рельєфні плями на шкірі, невеликі лускаті ділянки на шкірі, сухість шкіри, тріщини на шкірі, включаючи гнояки, свербіж шкіри, потовщення, утворення ямок або гребенів на нігтях, набряклі або негнучкі суглоби.

В іншому варіанті втілення хвороба або порушення, які підлягають лікуванню згідно з описаними авторами способами є бляшковим псоріазом. Бляшковий або звичайний псоріаз є найбільш поширеною формою псоріазу і характеризується чітко обмеженими, рельєфними еритематозними бляшками на шкірі, вкритими сріблястими лусочками. Ураження зазвичай поширюються на зовнішні поверхні кінцівок, попереково-крижову ділянку та волосисту частину шкіри голови. Відповідні гістопатологічні результати включають значну запальну клітинну інфільтрацію дерми та епідермісу, збільшення кількості розширених судин та значне потовщення епідермісу з порушеною диференціацією кератиноцитів та гіперкератозу. Приблизно одна третина пацієнтів з бляшковим псоріазом класифікується як пацієнти з помірною або важкою хворобою, а отже, розглядаються як потенційні пацієнти, що підлягають терапії, що виходить за межі лише місцевого лікування.

У конкретному варіанті втілення спосіб лікування бляшкового псоріазу включає введення суб'єктові, який цього потребує, терапевтично ефективної кількості описаного авторами антитіла або похідного від антитіла антиген-зв'язувального фрагмента. В іншому конкретному варіанті втілення спосіб послаблення або профілактики одного або кількох симптомів бляшкового псоріазу включає введення суб'єктові, який цього потребує, терапевтично ефективної кількості описаного авторами антитіла або похідного від антитіла антиген-зв'язувального фрагмента. До симптомів бляшкового псоріазу належать, крім інших, червоні плями на шкірі, вкриті сріблястими лусочками, рельєфні плями на шкірі, невеликі лускаті ділянки на шкірі, сухість шкіри, тріщини на шкірі, включаючи гнояки, свербіж шкіри, потовщення,

утворення ямок або гребенів на нігтях, набряклі або негнучкі суглоби.

В іншому варіанті втілення порушенням, яке піддається лікуванню згідно з описаними авторами способами, є хронічний бляшковий псоріаз. У конкретному варіанті втілення спосіб лікування хронічного бляшкового псоріазу включає введення суб'єктові, який цього потребує, терапевтично ефективної кількості описаного авторами антитіла або похідного від антитіла антиген-зв'язувального фрагмента. В іншому конкретному варіанті втілення описаний авторам спосіб, призначений для послаблення або профілактики одного або кількох симптомів хронічного бляшкового псоріазу, включає введення суб'єктові, який цього потребує, терапевтично ефективної кількості описаного авторами антитіла або похідного від антитіла антиген-зв'язувального фрагмента. До симптомів бляшкового хронічного псоріазу належать, крім інших, одна або кілька рельєфних почервонілих плям на шкірі, розміром з монету і більших, на будь-якій частині тіла, включаючи, крім інших коліна, лікті, попереково-крижові ділянки, волосисту частину шкіри голови та нігті.

В іншому варіанті втілення хворобою, яка підлягає лікуванню згідно з описаними авторами способами, є краплеподібний псоріаз. В іншому конкретному варіанті втілення спосіб лікування краплеподібного псоріазу включає введення суб'єктові, який цього потребує, терапевтично ефективної кількості описаного авторами антитіла або похідного від антитіла антиген-зв'язувального фрагмента. В іншому конкретному варіанті втілення спосіб профілактики або послаблення одного або кількох симптомів краплеподібного псоріазу включає введення суб'єктові, який цього потребує, терапевтично ефективної кількості описаного авторами антитіла або похідного від антитіла антиген-зв'язувального фрагмента. До симптомів краплеподібного псоріазу належать, крім інших, спалахи лускатих бляшок у формі водяних крапель на шкірі внаслідок інфекції, такої, як стрептококова інфекція горла.

В іншому варіанті втілення хворобою або порушенням, що підлягає лікуванню згідно з описаними авторами способами, є псоріаз складок. У конкретному варіанті втілення спосіб лікування псоріазу складок (також відомого як інтертригінозний псоріаз та псоріаз складок) включає введення суб'єктові, який цього потребує, терапевтично ефективної кількості описаного авторами антитіла або похідного від антитіла антиген-зв'язувального фрагмента. В іншому конкретному варіанті втілення спосіб профілактики або послаблення одного або кількох симптомів псоріазу складок включає введення суб'єктові, який цього потребує, терапевтично ефективної кількості описаного авторами антитіла або похідного від антитіла антиген-зв'язувального фрагмента. До симптомів псоріазу складок належать, крім інших, рівні, зазвичай вологі ділянки шкіри, які є почервонілими й запаленими, на відміну від лущення, пов'язаного з бляшковим псоріазом, на одній або кількох з таких частин тіла: пахви, пах, ділянки під грудьми та в інших складках шкіри навколо геніталій та сідниць.

В іншому варіанті втілення хворобою або порушенням, що підлягає лікуванню згідно з описаними авторами способами, є пустульозний псоріаз. У конкретному варіанті втілення спосіб лікування пустульозного псоріазу включає введення суб'єктові, який цього потребує, терапевтично ефективної кількості описаного авторами антитіла або похідного від антитіла антиген-зв'язувального фрагмента. В іншому конкретному варіанті втілення описаний авторам спосіб профілактики або послаблення одного або кількох симптомів пустульозного псоріазу включає введення суб'єктові, який цього потребує, терапевтично ефективної кількості описаного авторами антитіла або похідного від антитіла антиген-зв'язувального фрагмента. До симптомів пустульозного псоріазу належать, крім інших, наповнені гноєм пухирі, які мають різний розмір та розташування, але здебільшого розташовуються на руках та ногах.

В іншому варіанті втілення хворобою або порушенням, що підлягає лікуванню згідно з описаними авторами способами є еритродермічний псоріаз. У конкретному варіанті втілення спосіб лікування еритродермічного псоріазу включає введення суб'єктові, який цього потребує, терапевтично ефективної кількості описаного авторами антитіла або похідного від антитіла антиген-зв'язувального фрагмента. В іншому конкретному варіанті втілення описаний авторам спосіб профілактики або послаблення одного або кількох симптомів еритродермічного псоріазу включає введення суб'єктові, який цього потребує, терапевтично ефективної кількості описаного авторами антитіла або похідного від антитіла антиген-зв'язувального фрагмента. До симптомів еритродермічного псоріазу належать, крім інших, періодичне, поширене, запалене почервоніння на шкірі та відшарування листами, а не маленькими лусочками. Почервоніння та відшарування шкіри часто супроводжуються сильним свербіжем та болем, прискореним серцебиттям та коливанням температури тіла.

В іншому варіанті втілення хворобою або порушенням, що підлягає лікуванню згідно з описаними авторами способами, є ревматоїдний артрит. У конкретному варіанті втілення спосіб лікування ревматоїдного артриту включає введення суб'єктові, який цього потребує,

терапевтично ефективної кількості описаного авторами антитіла або похідного від антитіла антиген-зв'язувального фрагмента. В іншому конкретному варіанті втілення описаний авторам спосіб, призначений для профілактики або лікування одного або кількох симптомів ревматоїдного артриту, включає введення суб'єктові, який цього потребує, терапевтично ефективної кількості описаного авторами антитіла або похідного від антитіла антиген-зв'язувального фрагмента. До симптомів ревматоїдного артриту, належать, крім інших, стомлюваність, втрата апетиту, субфебрильна температура тіла, набряклі залози, слабкість, біль у суглобах зап'ясток, ліктів, плечей, стегон, колін, щиколоток, пальців ніг, щелеп, кистей рук, ступень, пальців рук та/або шиї, ранкова скутість, біль у грудях під час вдихання (плеврит), печіння очей, свербіж та виділення, вузли під шкірою, отерплість, поколювання або печіння у кистях рук та ступнях.

В іншому варіанті втілення хворобою або порушенням, що підлягає лікуванню згідно з описаними авторами способами, є хвороба Крона. У конкретному варіанті втілення спосіб лікування хвороба Крона включає введення суб'єктові, який цього потребує, терапевтично ефективної кількості описаного авторами антитіла або похідного від антитіла антиген-зв'язувального фрагмента. В іншому конкретному варіанті втілення описаний авторам спосіб профілактики або послаблення одного або кількох симптомів хвороби Крона включає введення суб'єктові, який цього потребує, терапевтично ефективної кількості описаного авторами антитіла або похідного від антитіла антиген-зв'язувального фрагмента. Симптомами хвороби Крона, крім інших, є спастичний черевний (у зоні шлунка) біль, лихоманка, стомлюваність, втрата апетиту, біль при випорожненні (тенезми), стійка, водяниста діарея, небажана втрата ваги, запор, запалення очей, фістули (зазвичай навколо заднього проходу, можуть викликати стікання гною, слизу або випорожнень), біль у суглобах, запалення печінки, виразки у роті, кровотеча з прямої кишки та кров'янисті випорожнення, гулі або ураження (виразки) на шкірі та набряклі ясна.

В іншому варіанті втілення хворобою або порушенням, що підлягає лікуванню згідно з описаними авторами способами є анкілозуючим спондилітом. У конкретному варіанті втілення спосіб лікування анкілозний спондиліт включає введення суб'єктові, який цього потребує, терапевтично ефективної кількості описаного авторами антитіла або похідного від антитіла антиген-зв'язувального фрагмента. В іншому конкретному варіанті втілення спосіб послаблення або профілактики одного або кількох симптомів анкілозного спондиліту включає введення суб'єктові, який цього потребує, терапевтично ефективної кількості описаного авторами антитіла або похідного від антитіла антиген-зв'язувального фрагмента. До симптомів анкілозного спондиліту належать, крім інших, частий біль та отерплість у попереку та сідницях, хребті та/або шиї; і біль та слабкість, що поширюється на ребра, лопатки, стегна та п'яти; запалення очей (іридоцикліт та увеїт), викликання почервоніння, біль в очах, втрата зору, плаваючі помутніння склистого тіла та фотофобія; стомлюваність; та нудота.

В іншому варіанті втілення хворобою або порушенням, що підлягає лікуванню згідно з описаними авторами способами, є цукровий діабет. У конкретному варіанті втілення а спосіб лікування цукровий діабет включає введення суб'єктові, який цього потребує, терапевтично ефективної кількості описаного авторами антитіла або похідного від антитіла антиген-зв'язувального фрагмента. В іншому конкретному варіанті втілення спосіб послаблення або профілактики одного або кількох симптомів цукрового діабету включає введення суб'єктові, який цього потребує, терапевтично ефективної кількості описаного авторами антитіла або похідного від антитіла антиген-зв'язувального фрагмента. До симптомів цукрового діабету належать, крім інших, втрата ваги, поліурія (часте сечовипускання), полідипсія (сильна спрага), поліфагія (сильний голод), серцево-судинна хвороба, діабетична ретинопатія, діабетична нейропатія, гіперосмолярний некетотичний стан та діабетичний кетоацидоз.

У конкретних варіантах втілення описане авторами антитіло або похідний від антитіла антиген-зв'язувальний фрагмент вводять пацієнтові, який раніше піддавався або у даний час піддається одному або кільком видам терапії.

У конкретних варіантах втілення описане авторами антитіло або похідний від антитіла антиген-зв'язувальний фрагмент вводять пацієнтові, який раніше піддавався або у даний час піддається одному або кільком видам терапії. В інших конкретних варіантах втілення описане авторами антитіло або похідний від антитіла антиген-зв'язувальний фрагмент вводять пацієнтові з наявністю або підозрою на резистентність або стійкість до протизапальної терапії.

У деяких аспектах авторами пропонуються способи знищення Т-клітин у суб'єкта, який цього потребує, причому вищезгаданий спосіб включає введення вищезгаданому суб'єктові ефективної кількості описаного авторами антитіла або похідного від антитіла антиген-зв'язувального фрагмента. У деяких аспектах авторами пропонуються способи викликання

апоптозу активованих Т-клітин у суб'єкта, який цього потребує, причому вищезгаданий спосіб включає введення вищезгаданому суб'єктові ефективної кількості описаного авторами антитіла або похідного від антитіла антиген-зв'язувального фрагмента.

У деяких варіантах втілення описані авторами антитіло або похідний від антитіла антиген-зв'язувальний фрагмент або їх фармацевтична композиція можуть вводитися будь-яким прийнятним способом суб'єктові, який цього потребує. Необмежувальними прикладами способи введення є внутрішньовенна інфузія, підшкірна ін'єкція або імплантація, внутрішньом'язове, інтратекальне, внутрішньочеревинне, внутрішньопрямкишкове, внутрішньовагінальне, інтраназальне, внутрішньошлункове, внутрішньотрахеальне або внутрішньолегеневе доставлення та/або будь-який інший спосіб фізичного доставлення, описаний авторами або відомий спеціалістам у даній галузі. В одному варіанті втілення антитіло або похідний від антитіла антиген-зв'язувальний фрагмент або їх фармацевтичну композицію вводять системно (наприклад, парентерально) суб'єктові, який цього потребує. В іншому варіанті втілення антитіло або його фармацевтичну композицію вводять за місцем (наприклад, внутрішньопухлинно) суб'єктові, який цього потребує. Кожна доза не обов'язково може вводиться ідентичним шляхом введення. У деяких варіантах втілення описане авторами антитіло або похідний від антитіла антиген-зв'язувальний фрагмент можуть вводитися різними шляхами введення одночасно або послідовно з іншими дозами того самого або іншого описаного авторами антитіла.

При лікуванні хвороби або її симптому введення антитіла або похідного від антитіла антиген-зв'язувального фрагмента зазвичай здійснюють після виникнення хвороби або її симптомів. При профілактиці симптому хвороби введення антитіла або похідного від антитіла антиген-зв'язувального фрагмента зазвичай здійснюють до виникнення симптомів.

Дозу та частоту введення описаного авторами антитіла або похідного від антитіла антиген-зв'язувального фрагмента або їх фармацевтичної композиції визначають згідно зі способами профілактики та/або лікування з мінімізацією побічних ефектів. Точну дозу описаного авторами антитіла або похідного від антитіла антиген-зв'язувального фрагмента, які мають вводитися конкретному суб'єктові, або їх фармацевтичну композицію визначає спеціаліст-практик з врахуванням чинників, пов'язаних із суб'єктом, який потребує лікування. До чинників, які можуть враховуватися, належать важкість хвороби, загальний стан здоров'я суб'єкта, вік та маса тіла суб'єкта, режим харчування, час та частота введення, комбінування з іншими терапевтичними агентами або медикаментами, чутливість реакції та переносимість / реакція на терапію. Доза та частота введення описаних авторами антитіла або похідного від антитіла антиген-зв'язувального фрагмента або їх фармацевтичної композиції з часом можуть регулюватися для забезпечення достатнього рівня антитіла або похідного від антитіла антиген-зв'язувального фрагмента або для підтримання бажаного ефекту.

Точна доза, яка має застосовуватись у композиції, також залежить від шляху введення та серйозності запального порушення або хвороби і має визначатися на розсуд спеціаліста-практика та обставин, які стосуються кожного пацієнта.

Ефективні дози можуть бути екстрапольовані за кривими доза-ефект, побудованими на основі випробувальних систем *in vitro* або на тваринних моделях.

В одному варіанті втілення доза описаних авторами антитіла або похідного від антитіла антиген-зв'язувального фрагмента, які вводять пацієнтові для профілактики та/або лікування описаних авторами хвороби або порушення, зазвичай складає від 0,001 мг/кг до 100 мг/кг маси тіла пацієнта. В іншому варіанті втілення прийнятна доза антитіла або похідного від антитіла антиген-зв'язувального фрагмента, яка є терапевтично ефективною для профілактики та/або лікування описаних авторами хвороби або порушення, складає від 0,01 мг/кг до 100 мг/кг маси тіла пацієнта.

У конкретних варіантах втілення "ефективна кількість" описаного авторами антитіла або похідного від антитіла антиген-зв'язувального фрагмента означає кількість описаного авторами антитіла або похідного від антитіла антиген-зв'язувального фрагмента, яка є ефективною для досягнення принаймні одного, двох, трьох, чотирьох або більшої кількості нижчезазначених ефектів: (i) зменшення або послаблення тяжкості описаних авторами хвороби або порушення та/або одного або кількох пов'язаних з ним (нею) симптомів; (ii) скорочення тривалості одного або кількох симптомів, пов'язаних з описаними авторами порушенням або хворобою; (iii) профілактики рецидиву хвороби або порушення; (iv) регресії хвороби або порушення та/або одного або кількох пов'язаних з ним (нею) симптомів; (v) зменшення шпиталізації суб'єкта; (vi) скорочення терміну шпиталізації; (vii) подовження тривалості життя суб'єкта; (viii) стримування прогресування хвороби або порушення та/або одного або кількох пов'язаних з ним (нею) симптомів; (ix) посилення або поліпшення терапевтичного ефекту іншої терапії; (x) зменшення

або усунення хвороби або порушення; (xi) зниження смертності; (xii) зниження рівня шпиталізації; (xiii) запобігання розвитку або виникненню одного або кількох симптомів, пов'язаних з хворобою або порушенням; та (xiv) поліпшення якості життя, яке оцінюють з застосуванням засобів, добре відомих спеціалістам у даній галузі, наприклад, анкет. У деяких

варіантах втілення вжитий авторами термін "ефективна кількість" означає кількість описаного авторами антитіла для досягнення зазначеного результату, описаного у Розділі 6 нижче. У деяких варіантах втілення ефективна кількість антитіла або похідного від антитіла антиген-зв'язувального фрагмента становить від приблизно 0,01 мг до приблизно 1000 мг.

У деяких варіантах втілення єдину дозу описаного авторами антитіла або похідного від

антитіла антиген-зв'язувального фрагмента вводять пацієнтові один або кілька разів для профілактики та/або запобігання описаних авторами порушення або хвороби.

У конкретних варіантах втілення антитіло або похідний від антитіла антиген-зв'язувальний фрагмент або їх фармацевтичну композицію вводять суб'єктові згідно зі способами профілактики та/або лікування описаних авторами порушення або хвороби циклічно, причому антитіло або похідний від антитіла антиген-зв'язувальний фрагмент або фармацевтичну композицію вводять протягом періоду часу з наступним періодом паузи (наприклад, антитіло або похідний від антитіла антиген-зв'язувальний фрагмент або фармацевтичну композицію протягом певного періоду часу не вводять).

Запропоновані авторами антитіло або похідний від антитіла антиген-зв'язувальний фрагмент можуть вводитися до, під час або після введення одного або кількох додаткових засобів терапії (наприклад, агентів) для застосування у профілактиці та/або лікуванні описаних авторами порушення або хвороби. Застосування терміну "у комбінації" не обмежує порядок, у якому антитіло або похідний від антитіла антиген-зв'язувальний фрагмент та один або кілька додаткових засобів терапії вводять суб'єктові. У конкретних варіантах втілення засоби терапії можуть вводитися періодично або послідовно.

В іншому конкретному варіанті втілення описані авторами антитіло або похідний від антитіла антиген-зв'язувальний фрагмент застосовують у комбінації з кількістю іншого терапевтичного засобу (такого, як, наприклад, протизапальний агент) для профілактики та/або лікування описаних авторами хвороби або порушення. У конкретному варіанті втілення така комбінована терапія має синергетичний ефект. В інших варіантах втілення така комбінація має адитивний ефект.

У конкретному варіанті втілення антитіло або похідний від антитіла антиген-зв'язувальний фрагмент та додатковий засіб терапії дозволяють застосовувати нижчі дози (наприклад, субоптимальні дози) антитіла або похідного від антитіла антиген-зв'язувального фрагмента та/або додаткового засобу терапії та/або знизити частоту введення суб'єктові описаних авторами антитіла або похідного від антитіла антиген-зв'язувального фрагмента або додаткового засобу терапії. У деяких варіантах втілення можливість застосування нижчих доз описаних авторами антитіла або похідного від антитіла антиген-зв'язувального фрагмента та/або додаткового засобу терапії та/або зниження частоти введення антитіла або похідного від антитіла антиген-зв'язувального фрагмента або вищезгаданого додаткового засобу терапії знижує токсичність, пов'язану з введенням суб'єктові антитіла або похідного від антитіла антиген-зв'язувального фрагмента, або вищезгаданого додаткового засобу терапії, відповідно, без зниження ефективності антитіла або вищезгаданого додаткового засобу терапії, відповідно, для профілактики та/або лікування описаних авторами порушення або хвороби. У деяких варіантах втілення введення описаного авторами антитіла або похідного від антитіла антиген-зв'язувального фрагмента у комбінації з додатковим засобом терапії в результаті поліпшує ефективність описаних авторами антитіла або похідного від антитіла антиген-зв'язувального фрагмента та/або вищезгаданого додаткового засобу терапії при профілактиці та/або лікуванні описаних авторами порушення або хвороби. У деяких варіантах втілення введення описаного авторами антитіла або похідного від антитіла антиген-зв'язувального фрагмента та одного або кількох додаткових засобів терапії дозволяє уникати або знижувати негативні або небажані побічні ефекти, пов'язані з застосуванням будь-якого окремого засобу терапії.

У конкретному варіанті втілення суб'єктом, якому вводять описані авторами антитіло або похідний від антитіла антиген-зв'язувальний фрагмент, є тварина (наприклад, яванський макак або людина). В оптимальному варіанті втілення суб'єктом, якому вводять описане авторами антитіло або похідний від антитіла антиген-зв'язувальний фрагмент, є людина. У конкретному варіанті втілення суб'єктом, якому вводять антитіло або похідний від антитіла антиген-зв'язувальний фрагмент демонструє один або кілька описаних авторами симптомів хвороби або порушення.

Способи на основі клітин

Авторами пропонуються способи викликання або посилення апоптозу в клітинах, які експресують PSGL-1, які включають контактування клітини з ефективною кількістю описаного авторами антитіла. В одному варіанті втілення клітина є імунною клітиною. У конкретному варіанті втілення клітина є Т-клітиною. У більш конкретному варіанті втілення клітина є активованою Т-клітиною. Способи виявлення апоптозу описуються у джерелах існуючого рівня техніки і можуть легко здійснюватися спеціалістами у даній галузі. У конкретних варіантах втілення спосіб викликання та посилення апоптозу активованих Т-клітин, які експресують PSGL-1, включає контактування клітин з ефективною кількістю описаного авторами антитіла, причому ефективна кількість є достатньою для посилення апоптозу, що визначається способами, відомими спеціалістам у даній галузі.

Авторами пропонуються способи зниження або інгібування виживаності клітин, які експресують PSGL-1, які включають контактування клітини з ефективною кількістю описаного авторами антитіла. В одному варіанті втілення клітина є імунною клітиною. У конкретному варіанті втілення клітина є Т-клітиною. У більш конкретному варіанті втілення клітина є активованою Т-клітиною. Аналізи виживаності клітин описуються у джерелах існуючого рівня техніки і можуть легко здійснюватися спеціалістами у даній галузі. Наприклад, життєздатність клітин може оцінюватися з застосуванням забарвлення трипановим синім або інших маркерів загибелі клітин (наприклад, забарвлення Annexin-5) або маркерів життєздатності (наприклад, виключення пропідійодиду або 7-AAD), відомих спеціалістам у даній галузі. У конкретних варіантах втілення спосіб зниження або інгібування виживаності активованих Т-клітин, які експресують PSGL-1, включає контактування клітин з ефективною кількістю описаного авторами антитіла, причому ефективна кількість знижує або інгібує виживаність клітин, що визначається способами, відомими спеціалістам у даній галузі (наприклад, аналізу з витіснення трипанового синього або виключення пропідійодиду або 7-AAD).

Комплекти

Авторами пропонується фармацевтичний набір або комплект, який включає один або кілька контейнерів, наповнених одним або кількома з інгредієнтів описаних авторами фармацевтичних композицій, таких, як запропоновані авторами антитіло або похідний від антитіла антиген-зв'язувальний фрагмент. Необов'язково до такого(их) контейнера(ів) може додаватися пам'ятка у формі, яка визначається урядовим органом, який регулює виробництво, застосування або продаж фармацевтичних або біологічних продуктів, у якій відображається затвердження з боку органа стосовно виробництва, застосування або продажу для введення людині.

У конкретному варіанті втілення пропонується комплект, який включає перший контейнер, який містить описане авторами антитіло або похідний від антитіла антиген-зв'язувальний фрагмент. У конкретному варіанті втілення комплект включає перший контейнер, який є флаконом, який містить вищезгадане антитіло або вищезгаданий похідний від антитіла антиген-зв'язувальний фрагмент як ліофілізований стерильний порошок у вакуумі, і комплект також включає другий контейнер, який містить фармацевтично прийнятну рідину.

У конкретному варіанті втілення пропонується ін'єкційний пристрій, який містить описане авторами антитіло або похідний від антитіла антиген-зв'язувальний фрагмент. У конкретному варіанті втілення ін'єкційний пристрій містить антитіло у стерильному розчині. У конкретному варіанті втілення як ін'єкційний пристрій авторами пропонується шприц.

Також авторами пропонуються комплекти, які можуть застосовуватися згідно з вищезазначеними способами. В одному варіанті втілення комплект включає описане авторами антитіло або похідний від антитіла антиген-зв'язувальний фрагмент, в оптимальному варіанті - очищене антитіло, в одному або кількох контейнерах. У конкретному варіанті втілення описані авторами комплекти містять по суті виділений PSGL-1 як контроль. В іншому конкретному варіанті втілення описані авторами комплекти також включають контрольне антитіло, яке не реагує з PSGL-1. В іншому конкретному варіанті втілення описані авторами комплекти містять один або кілька елементів для виявлення зв'язування антитіла або похідного від антитіла антиген-зв'язувального фрагмента з PSGL-1 (наприклад, антитіло або похідний від антитіла антиген-зв'язувальний фрагмент може бути кон'югований з субстратом, який піддається виявленню, таким, як флуоресцентна сполука, ферментний субстрат, радіоактивна сполука або люмінесцентна сполука, або друге антитіло, яке розпізнає перше антитіло або похідний від антитіла антиген-зв'язувальний фрагмент, може бути кон'юговане з субстратом, який піддається виявленню). У конкретних варіантах втілення комплект може включати рекомбінантно утворений або хімічно синтезований PSGL-1. PSGL-1, який забезпечується у комплекті, також може бути зв'язаний з твердою основою. У більш конкретному варіанті втілення засіб виявлення вищеописаного комплекту включає тверду основу, з якою зв'язується PSGL-1. Такий комплект також може включати незв'язане мічене репортером антитіло проти людини. У цьому варіанті

втілення зв'язування антитіла або похідного від антитіла антиген-зв'язувального фрагмента з PSGL-1 може бути виявлене шляхом зв'язування вищезгаданого міченого репортером антитіла.

ПРИКЛАДИ

Приклади в цьому розділі (тобто, розділі 6) представлено для пояснення, і вони не є обмежувальними.

Приклад 1: Утворення моноклональних антитіл проти PSGL-1

Антитіло h15A7 містить варіабельні ділянки важкого та легкого ланцюга гуманізованого 15A7, описані у публікації міжнародної заявки № WO 2005/110475, опублікованій 24 листопада 2005 р., яка є включеною до цього опису шляхом посилання у повному обсязі. Антитіло h15A7 є антитілом ізотипу IgG4 з легким ланцюгом каппа-типу. Мутацію Ser²²⁸ → Pro²²⁸ було включено шляхом ПЛР з застосуванням мутагенних праймерів у шарнірну ділянку h15A7. Утворений в результаті шарнірний мутант h15A7 у цьому описі називається 15A7H. Решта білкової послідовності 15A7H є ідентичною h15A7. Амінокислотну послідовність 15A7H показано на фігурі 7 A-B і представлено у SEQ ID NO: 1 та 2. Антитіло, яке кодує генні послідовності для важкого та легкого ланцюгів, було включено в еукаріотні вектори експресії, які походять від вектора pAD-CMV1 (описаного у документі EP 393 438).

15A7H утворювали, застосовуючи способи, відомі спеціалістам у даній галузі. У загальних рисах, рекомбінантні вектори експресії, які, додатково до важкого та легкого ланцюгів для 15A7H, також кодують маркери відбору дигідрофолатредуктази (DHFR) та неоміцинофосфотрансферази, відповідно, спільно трансфікували у суспендовані клітини-хазяї CHO-DG44. Відбір стійко трансфікованих клітин здійснювали через два дні після трансфекції у селективному вільному від гіпоксантину / тимідину середовищі та додавання антибіотика G418. Відразу після одержання клітин з початкового відбору викликали ампліфікацію гена на основі DHFR шляхом додавання метотрексату. Шляхом відкладання окремих клітин утворювали лінію моноклональних продукуючих клітин з використанням клітини-хазяїна CHO-DG44 для 15A7H. Для утворення антитіла 15A7H клітини розширювали для інокуляту для виробничого біореактора. Виробничий біореактор працював у режимі періодичних культур з підживленням протягом періоду від 8 до 14 днів. Для підтримки вироблення антитіла і для подовження періоду вироблення культури клітин під час стадії виробництва додавали живильне середовище. Бульйонну культуру клітин збирали шляхом центрифугування та тупикової фільтрації для ефективного видалення клітин з забезпеченням безклітинної культуральної рідини (CCF) для подальшого очищення продукту. Після видалення клітин під час збирання білок очищали шляхом афінної хроматографії на протеїні A та аніоно- та катіонообмінної хроматографії. Крім того, включали два етапи видалення стійких вірусів, етап інактивації вірусів при низькому рН та етап нанофільтрації для видалення вірусів.

Чистоту 15A7H визначали способом капілярного гель-електрофорезу. Зразки денатурували з застосуванням SDS (додецилсульфату натрію) і відокремлювали на основі розміру у капілярах, наповнених гелевим буфером, який діє як середовище висівання. У редукованих зразках дисульфідні зв'язки відновлюють 2-меркаптоетанолом з утворенням в результаті окремих піків для важкого та легкого ланцюгів антитіла. У нередукованих зразках додають йодоацетамід як алкілюючий агент для уникнення будь-якої фрагментації, викликаной підготуванням зразка, і для забезпечення незмінності головного піка IgG.

Зразки вводили шляхом електрокінетичної ін'єкції і мобілізовані білки виявляли шляхом поглинання в УФ-діапазоні при 200 нм з застосуванням УФ-детектора. Для редукованих зразків повідомляються регульовані за часом відсотки площі (TCA %) суми важкого та легкого ланцюгів (% LC+HC). Значення, яке повідомляється для нередукованих зразків, являє собою TCA% головного піка IgG.

Меншу кількість половинних молекул антитіл виявляли шляхом невідного капілярного гель-електрофорезу (CGE) (Фігура 1), який вказує, що мутація Ser²²⁸ → Pro²²⁸ значно знижувала утворення внутрішньоланцюгового дисульфідного зв'язку в шарнірній ділянці. Кількість половинних молекул антитіл зменшувалася з ~8-10 % для h15A7 до <1 % для 15A7H.

Композицію для 15A7H показано у Таблиці 6.

Таблиця 6

Композиція 15A7H

Компоненти	Концентрація [ммоль/л]	Концентрація [г/л]	Призначення компонента
Дигідрат цитрату натрію $C_6H_5Na_3O_7 \times 2 H_2O$	9,1	2,676	Буферний компонент
Хлорид натрію	150	8,76 6	Регулятор тоничності
Полісорбат 80	----	0,2	Стабілізатор
Моногідрат лимонної кислоти $C_6H_8O_7 \times H_2O$	0,9	0,189	Буферний компонент
15A7H	0,267	40	Активний інгредієнт
Вода для ін'єкцій (WFI)	----	додавання WFI до кінцевого об'єму 1,0 л	Розчинник

Рівень pH композиції складає 6,0.

Приклад 2: Зв'язування антитіл 15A7H на активованих первинних людських Т-клітинах 15A7H досліджували на зв'язування у первинних активованих людських Т-клітинах CD4⁺.

МАТЕРІАЛИ та СПОСОБИ

Культура клітин та активація Т-клітин Т-клітини CD4⁺ периферичної крові культивували при 37 °C у кількості 1×10^6 у повному середовищі RPMI і стимулювали протягом 2 днів з додаванням 20 мкг/мл PHA-L (Sigma, каталог. номер L2769). Клітини інкубували протягом додаткових чотирьох-п'яти днів при 37 °C з 20 нг/мл IL-2 (R&D systems, Catalog #RD202-IL) для одержання "активованих Т-клітин CD4⁺".

Аналіз зв'язування клітин: Активовані людські Т-клітини CD4⁺ підраховували й поміщали у кількості 1×10^5 клітин/100 мкл у FACS буфер у 96-лунковий культуральний планшет з v-подібним дном (Falcon BD, Catalog # 353263) і інкубували на льоду протягом 30 хвилин.

IgG4 проти лізоцимів як ізотипічний контроль, h15A7 та 15A7H розводили до 90 мкг/мл у FACS буфері у чашці для розведення з круглим дном (Falcon, Catalog # 353077). Здійснювали одинадцять триразових послідовних розведень препаратів антитіла для кожного антитіла у чашці при початковій концентрації 30 мкг/мл.

Подвійні зразки клітин осаджували центрифугуванням і ресуспендували у 100 мкл кожного розведення антитіла для первісної початкової концентрації 30 мкг/мл. Клітини інкубували на льоду протягом 60 хвилин. Клітини осаджували центрифугуванням і промивали промивальним буфером з наступним додаванням 100 мкл розведеного вторинного R-PE кон'югованого антитіла кози проти F(ab)₂ Ig людини. Вторинне R-PE кон'юговане антитіло кози проти F(ab)₂ Ig людини (BD Biosciences, Catalog # 554655; вихідний розчин 1,05 мг/мл) попередньо розводили 1:800 у FACS буфері. Клітини інкубували на льоду протягом 30 хвилин у темряві, потім осаджували центрифугуванням і двічі промивали промивальним буфером. Клітини ресуспендували у 150 мкл промивального буфера й фіксували шляхом додавання 50 мкл фіксаційного буфера BD Cytotfix/Cytoperm (BD Biosciences, каталог. номер 554655).

Зразки аналізували на біоаналізаторі BD FACS Array Bioanalyzer. Отримували близько 5000 подій, застосовуючи протоковий цитометр BD FACS Array для кожного зразка клітин з "лімфоцитним" вікном, встановленим згідно з SSC та FSC, і середньою флуоресценцією, яку визначали для кожного зразка.

Аналіз даних: афінність зв'язування антитіл IgG4 проти лізоцимів, h15A7 та 15A7H з активованими CD4⁺Т-клітинами визначали через побудову графіка впливу концентрації антитіла та середній показник флуоресценції (MFI) для кожного подвійного зразка з застосуванням Xlfit (модель: дозозалежна одноцентрова, 205). Значення EC50 визначали для кожної кривої зв'язування.

РЕЗУЛЬТАТИ:

Зв'язування з активованими людськими Т-клітинами: за допомогою протокової цитометрії визначали зв'язування 15A7H з активованими людськими Т-клітинами CD4⁺. Фігура 2 демонструє, що 15A7H зв'язується з EC50 0,22 нМ.

Сукупні дані зв'язування від кількох донорів демонструють зв'язування 15A7H з активованими Т-клітинами CD4⁺ з середнім показником EC50 0,22±0,02. Значення EC50 4-х

донорів використовували для розрахунку середнього значення \pm SEM. Антитіло h15A7 випробували за таких самих умов, і воно зв'язувалося з активованими Т-клітинами CD4⁺ з середнім показником EC50 0,27 \pm 0,05. Таким чином, 15A7H та h15A7 продемонстрували порівнянне зв'язування з активованими Т-клітинами (див. Таблицю 7).

5

Таблиця 7

Аналіз зв'язування з активованими
Т-клітинами CD4⁺

EC50 (нМ)	Середн. \pm SEM
15A7H	0,22 \pm 0,02
h15A7	0,27 \pm 0,05

Приклад 3: In-vivo активність 15A7H людському організмі у trans-vivo мишачій моделі гіперчутливості уповільненого типу

15A7H випробували у trans-vivo моделі гіперчутливості уповільненого типу (DTH) на самицях мишей C57BL/6. Дози 0,03, 0,10, 0,3, 1 та 10 мг/кг 15A7H вводили внутрішньочеревинно у буферній суміші. Антитіло h15A7 випробували за таких самих умов.

МАТЕРІАЛИ та СПОСОБИ

Trans vivo аналіз: Самиць мишей C57BL/6 придбавали у Harlan Sprague Dawley, Inc. (Indianapolis, Indiana) у віці 6-8 тижнів і використовували протягом чотирьох тижнів після надходження. Усіх мишей поміщали у безпатогенне середовище й піддавали лікуванню згідно з рекомендаціями NIH. Усі експерименти на тваринах перевірялися й затверджувалися Інституціональним комітетом з догляду за тваринами та їх використанням (IACUC) і здійснювалися відповідно до рекомендацій NIH "керівні принципи досліджень з використанням тварин та людей".

Зразки крові брали шляхом венепункції у нормальних донорів, які демонстрували сильний імунітет проти правця. 100 мл суцільної крові переносили у пробірки CPT з вакуумом (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) і центрифугували при 1800 RCF протягом 30 хв. Лейкоцитарний шар, який містить мононуклеарні клітини та тромбоцити, відокремлювали, тричі промивали і ресуспендували у фосфатно-буферному розчині (PBS) і підраховували. Забруднення тромбоцитами мінімізували шляхом багаторазового промивання у PBS. Допускається співвідношення тромбоцитів з PBMC не більше, ніж 1:1. Відразу після цього клітини вводили шляхом ін'єкції у подушечку ступні мишей.

Адсорбований на фосфаті алюмінію правцевий анатоксин (TT-Tetguard) застосовували у концентрації 0,25 Lf на кожне місце ін'єкції (Lf є одиницею оцінки коагулюючої здатності - кількістю анатоксину, яка при змішуванні з однією міжнародною одиницею антитоксину створює суміш з оптимальною коагуляцією).

7-10 $\times 10^6$ PBMC, змішані з 0,25 Lf-одиниць TT у загальному об'ємі 50 мкл, вводили шляхом ін'єкції у подушечку задньої ступні мишей. Товщину подушечки ступні вимірювали перед ін'єкцією і через 24 години після ін'єкції, застосовуючи індикаторний товщиномір (Mitutoyo, Aurora, IL). Товщину перед ін'єкцією віднімали від післяін'єкційної товщини через 24 години для одержання зміни у товщині лапи. Усі розміри представлено у дюймах.

Випробування 15A7H та h15A7: 15A7H та h15A7 (вихідний розчин 10 мг/мл) розчиняли у наповнювачі, який містив 25 мМ цитрату натрію та 115 мМ хлориду натрію з 0,04 % Tween 80, pH 5,97. Мишам шляхом внутрішньочеревинної ін'єкції вводили 0,2 мл наповнювача або 15A7H або h15A7 у кількості 0,03, 0,1, 0,3, 1 та 10 мг/кг, за одну годину до ін'єкції у подушечку лапи PBMC з TT або без нього. Кожну дозу антитіла 15A7H та h15A7 випробували на PBMC чотирьох різних донорів і використовували одну мишу для кожного режиму лікування на одного донора. Групи, які отримували 15A7H та h15A7, порівнювали з групою, яка отримувала наповнювач.

Статистика: Усі значення вказувались як середній показник \pm SEM, якщо спеціально не вказано іншого. Зміни у товщині подушечки ступні у групі, яка отримувала медикамент, порівнювали з показниками у групі, яка отримувала наповнювач. Дельта-показники товщини лапи за результатами експериментів для 4-х окремих донорів об'єднували і розраховували середнє значення \pm SEM. Відсоток інгібування товщина лапи розраховували таким чином: $100 \times (\Delta \text{товщина лапи}_{\text{наповн.}} - \Delta \text{товщина лапи}_{\text{медик.}}) / (\Delta \text{товщина лапи}_{\text{наповн.}} - \Delta \text{товщина лапи}_{\text{PBMC}})$. Значущість інгібуючого впливу випробували, застосовуючи ранговий однофакторний дисперсійний аналіз Крускала-Волліса (ANOVA). Значення p, менше за 0,05, вважали статистично значущим.

Рівень 15A7H та h15A7 у плазмі мишей C57BL/6: Визначали рівень 15A7H та h15A7 у плазмі у кількості 0,03, 0,1, 0,3, 1 та 10 мг/кг через 24 години після внутрішньочеревинної ін'єкції у самиць мишей C57BL/6. Зразки плазми брали у trans-vivo DTH експериментальних тварин по закінченню експерименту. Біоаналіз здійснювали на всіх зразках.

Дослідження фармакокінетики 15A7H: Самиць призначених для оцінки фармакокінетики мишей C57BL/6, які отримували внутрішньочеревинні дози 15A7H (такі самі дози, як зазначено вище), використовували для збирання даних, які є більш інтенсивними відносно концентрації 15A7H у плазмі. Цим мишам не вводили людські РВМС або правцевий анатоксин. Зразки у цих "РК" мишей брали через 1, 3, 5 та 24 год. після введення дози. Кожна дозова група РК мишей складалася з 6 мишей. У межах кожної дозової групи використовували підгрупу з 3-х мишей для забирання зразків через 1 та 5 год., а іншу підгрупу з 3-х мишей використовували для забирання зразків через 3 та 24 год.

Біоаналіз h15A7 та 15A7H: Застосовували ELISA-аналіз сендвіч-типу для кількісного визначення концентрації h15A7 або 15A7H у плазмі мишей. У загальних рисах, застосовували 96-лункові мікротитрувальні планшети, вкриті PSGL-1, для зв'язування з h15A7 або 15A7H у розведеному зразку плазми. Після промивання зв'язані h15A7 або 15A7H виявляли за допомогою міченого біотином моноклонального антитіла проти IgG₄ людини та міченого ферментом (HRP) стрептавідину. Кількість забарвленого продукту, утвореного під час субстратної реакції вимірювали фотометрично, і вона збільшувалася зі збільшенням концентрації h15A7 або 15A7H у зразку. Концентрацію h15A7 або 15A7H, яка відповідала вимірянній оптичній поглинальній здатності, розраховували через апроксимацію даних нелінійної стандартної кривої. Розмір градуювальних зразків складав від 0,04 до 1,2 нг/мл. Зразки розводили принаймні до 1:100. Таким чином, нижня межа кількісного визначення h15A7 або 15A7H у суцільній плазмі становила 4 нг/мл. Через застосування вищих коефіцієнтів розведення верхня межа кількісного визначення може бути збільшена до 2,4 мг/мл (1:2000000).

Через невеликі розбіжності у реакційній здатності контрольного матеріалу h15A7 та 15A7H в ELISA-аналізі використовували дві градуювальні криві та два набори для контролю якості. Зразки, взяті у тварин, які отримували h15A7, аналізували за градуювальною кривою h15A7, а зразки, взяті у тварин, які отримували 15A7H, аналізували за градуювальною кривою 15A7H.

РЕЗУЛЬТАТИ

TRANS VIVO DTH: Фігура 3 показує об'єднані дані реакції на дозу антитіла 15A7H у trans vivo DTH у РВМС 4-х донорів, як показано через відсоток інгібування DTH після лікування з застосуванням 15A7H. При внутрішньочеревинному введенні мишам через -1 годину 0,03, 0,1, 0,3, 1 та 10 мг/кг як h15A7, так і 15A7H інгібували trans vivo DTH залежно від дози. Таблиця 8 показує дозозалежний ефект та відсоток інгібування 15A7H та h15A7 у trans-vivo DTH. Єдина доза 15A7H або h15A7 у кількості 0,3 мг/кг і вище демонструвала значне інгібування trans vivo DTH. Показник ED₅₀ для h15A7 та 15A7H у цьому аналізі становив 0,09 та 0,1 мг/кг, відповідно, n=4 донори.

Таблиця 8

Дозозалежний ефект та % інгібування trans-vivo DTH

Дельта (дюйми)		Середн.	SEM	n
	РВМС	0,0005	0,0000	4
	Наповнювач	0,0090	0,0010	4
	h15A7 0,03 мг/кг	0,0061	0,0007	4
	h15A7 0,1 мг/кг	0,0047	0,0008	4
	h15A7 0,3 мг/кг	0,0033	0,0006	4
	h15A7 1 мг/кг	0,0018	0,0003	4
	h15A7 10 мг/кг	0,0009	0,0001	4
	15A7H 0,03 мг/кг	0,0060	0,0007	4
	15A7H 0,1 мг/кг	0,0049	0,0006	4
	15A7H 0,3 мг/кг	0,0040	0,0010	4
	15A7H 1 мг/кг	0,0024	0,0006	4
	15A7H 10 мг/кг	0,0012	0,0004	4
% інгібування				
	Наповнювач	0,00	0,00	4
	h15A7 0,03 мг/кг	33,31	6,67	4

Таблиця 8

Дозозалежний ефект та % інгібування trans-vivo DTH

Дельта (дюйми)		Середн.	SEM	n
	h15A7 0,1 мг/кг	51,02	2,52	4
	h15A7 0,3 мг/кг	67,83	4,26	4
	h15A7 1 мг/кг	85,14	3,17	4
	h15A7 10 мг/кг	95,43	1,41	4
	15A7H 0,03 мг/кг	35,56	3,25	4
	15A7H 0,1 мг/кг	47,95	2,88	4
	15A7H 0,3 мг/кг	61,20	5,62	4
	15A7H 1 мг/кг	79,15	5,19	4
	15A7H 10 мг/кг	91,32	4,94	4

5 КОНЦЕНТРАЦІЯ СПОЛУКИ У ПЛАЗМІ: показники концентрації у плазмі 15A7H для призначених для оцінки фармакокінетики РК та DTH мишей зведено на Фігурі 5. Фігура 4 показує 24-годинні об'єднані показники впливу концентрації у плазмі 15A7H на % інгібування DTH. Слід зазначити, що середні показники концентрації через 24 години після введення дози для РК та DTH мишей при даному рівні дози були дуже подібними. Це вказує на те, що, хоча РК та DTH миші отримували різні препарати (лише DTH миші отримували РВМС та правцевий анатоксин), фармакокінетичні показники 15A7H у двох випадках були дуже подібними. Концентрація у плазмі h15A7 та 15A7H коливалася лише у дуже вузьких межах у процесі проведення дослідження (вимірювання концентрації від 1 до 24 год. після введення дози).

10 РК-PD: Таблиця 9 та Таблиця 10 показують добові показники концентрації у плазмі (РК) антитіл h15A7 та 15A7H і відповідний відсоток інгібування trans-vivo DTH (PD) в однакових дозах. На Фігурі 4 порівнюється співвідношення РК-PD для 15A7H у trans-vivo DTH моделі. Розраховані значення ED₅₀ для h15A7 та 15A7H становили 687 та 770 нг/мл, відповідно, n=4

15 донори.

Таблиця 9

Співвідношення РК-PD у trans-vivo DTH моделі

(А) Фармакокінетика (РК) нг/мл			
Доза h15A7 мг/кг, i.p.	Середн.	SEM	N
0,03	111	12	4
0,1	618	64	4
0,3	2320	172	4
1	9355	642	4
10	67668	23686	4
(В) Фармакодинаміка (PD) % інгібування			
Доза h15A7 мг/кг, i.p.	Середн.	SEM	N
0,03	33	7	4
0,1	51	3	4
0,3	68	4	4
1	85	3	4
10	95	1	4

Співвідношення PK-PD у trans-vivo DTH моделі

(A) Фармакокінетика (PK) нг/мл			
Доза 15A7H мг/кг, і.р.	Середн.	SEM	n
0,03	228	20	4
0,1	708	79	4
0,3	1968	228	4
1	6163	469	4
10	54725	13612	4
(B) Фармакодинаміка (PD) % інгібування			
Доза 15A7H мг/кг, і.р.	Середн.	SEM	n
0,03	36	3	4
0,1	48	3	4
0,3	61	6	4
1	79	5	4
10	91	5	4

ВИСНОВОК

Єдина доза 15A7H або h15A7 у кількості 0,3 мг/кг і вище демонструвала значний відсоток інгібування trans vivo DTH. Показник ED₅₀ для h15A7 та 15A7H у trans-vivo DTH аналізі становив 0,09 та 0,1 мг/кг, відповідно. Концентрація у плазмі h15A7 та 15A7H коливалася лише у дуже вузьких межах у процесі проведення дослідження.

Приклад 4: Оцінка комплементзалежної цитотоксичності (CDC)

Для того, щоб визначити, чи має 15A7H CDC активність, застосовували аналізи вивільнення лактатдегідрогенази для вимірювання CDC активності у різних концентраціях.

МАТЕРІАЛИ ТА СПОСОБИ

Клітини Ramos (одержані від ATCC; cat# CRL-1596) використовували як клітини-мішені і культивували у повному середовищі DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA; каталог. номер 11995) з 0,5 мг/мл Geneticin (Invitrogen, Carlsbad, CA; каталог. номер 10131). Комплемент кроля використовували як джерело білків комплементу (Accurate Chemical & Scientific Corp., Westbury, NY; каталог. номер: AIC4000-1). Цитотоксичне середовище Cedarlane використовували як аналітичне середовище (Accurate Chemical & Scientific Corp., Westbury, NY; каталог. номер: CL95100).

CDC активність визначали за вивільненням LDH клітин-мішеней з застосуванням комплекту для виявлення цитотоксичності Cytotoxicity Detection Kit^{PLUS} (LDH) (Roche Applied Science, Indianapolis, IN; каталог. номер: 04 744 934 001). Антитіло миші проти людського CD20, виділене з гібридами 1F5 (ATCC), Birmingham, AL; каталог. номер: 6140-01) використовували для активації комплементу як позитивне контрольне антитіло в аналізі. Людський IgG4 к (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; каталог. номер: I4639) використовували як ізотипічний контроль. Зразки та контролю мали такі характеристики (усі зразки дублювалися):

Зразки: 100 мкл стандартного комплементу кроля (розведення 1:6 в аналітичному середовищі) + 50 мкл клітин-мішеней (клітини Ramos в аналітичному середовищі) + 50 мкл розведеного антитіла

Фоновий контроль: 200 мкл аналітичного середовища

Контроль максимального вивільнення: 50 мкл клітин-мішеней + 100 мкл стандартного комплементу кроля + 50 мкл аналітичного середовища

Контроль спонтанного вивільнення: 50 мкл клітин-мішеней + 100 мкл стандартного комплементу кроля + 50 мкл аналітичного середовища

Планшет інкубували при 37 °C у вологому інкубаторі з CO₂ протягом 3 год. За 30 хв до закінчення інкубації (після 2,5 год. інкубації) 10 мкл лізисного розчину (передбаченого у комплекті для виявлення цитотоксичності) додавали до зразка для контролю максимального вивільнення. Наприкінці інкубації планшет центрифугували при 200 g протягом 10 хв при кімнатній температурі і 100 мкл безклітинних супернатантів переносили у відповідні лунки 96-лункового планшета з плоским дном для виявлення LDH. 100 мкл реакційної суміші (передбаченої у комплекті для виявлення цитотоксичності) додавали у кожен лунку і планшет

інкубували при кімнатній температурі протягом 15-30 хв у темряві. Наприкінці другої інкубації реакцію зупиняли шляхом додавання 50 мкл стоп-реагента (передбаченого у комплекті для виявлення цитотоксичності). Оптичну густину вимірювали при довжині хвилі 490-492 нм на зчитувальному пристрої для планшетів SpectraMAX Plus (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

5 CDC% розраховували за формулою $\frac{([\text{викликано антитілом вивільнення}] - [\text{контроль спонтанного вивільнення}])}{([\text{максимальне вивільнення}] - [\text{контроль спонтанного вивільнення}])} \times 100 \%$.

РЕЗУЛЬТАТИ

10 CDC активність 15A7H випробували в умовах, оптимізованих для CDC-реакції антитіла проти CD20 з клітинами Ramos. Як показано на Фігурі 6 і у Таблиці 11, різні показники концентрації антитіл з незмінним розведенням комплементу 1:12 випробували на CDC активність. CDC активність не виявлялася для 15A7H, h15A7 або для IgG4 негативного контролю. Антитіло миші проти людського CD20 демонструвало чіткий дозозалежний ефект антитіла.

Таблиця 11

Відсоток CDC активності 15A7H при різних концентраціях

Конц. антитіла (мкг/мл)	h15A7	IgG4 каппа	Ант. миші проти CD20	15A7H
5	1,54	-0,87	відс.	-0,45
0,5	4,25	0,50	68,26	-0,15
0,05	0,84	3,22	59,60	-2,59
0,005	2,08	3,29	31,42	-1,37
0,0005	відс.	відс.	6,77	відс.

ВИСНОВОК

15A7H не демонструє CDC активності при концентрації до 5 мкг/мл антитіла при розведенні комплементу 1:12 в аналізах, які здійснювали на клітинах Ramos.

Приклад 5: Клінічне дослідження

20 15A7H вводили суб'єктам внутрішньовенно одноразовими збільшуваними дозами 125 мкг/кг, 500 мкг/кг, 1000 мкг/кг та 2000 мкг/кг, а іншим суб'єктам підшкірно вводили одноразові дози 500 мкг/кг та 1000 мкг/кг. Дозування пристосовують до умов. Застосовують 15A7H, ресуспендоване у композиції, описаній у Таблиці 6. Після введення здійснюють клінічні лабораторні випробування (наприклад, гематологічні, клініко-хімічні та аналіз сечі), наприклад, щотижня, з застосуванням способів, відомих спеціалістам у даній галузі. Також визначають фармакокінетичні параметри, наприклад, щотижня, застосовуючи способи, відомі спеціалістам у даній галузі.

Усі публікації, патенти та патентні заявки, наведені в цій заявці, є включеними шляхом посилання у повному обсязі, так само, як це було б, якби кожна окрема публікація або патентна заявка була конкретно й окремо вказана як включена шляхом посилання. Хоча представлений вище винахід було описано у певних деталях для ілюстрації та прикладу для кращого пояснення, спеціалістові у даній галузі з врахуванням принципів даного винаходу стане зрозумілою можливість певних змін та модифікацій без відхилення від сутності або обсягу супровідної формули винаходу.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> AbGenomics Cooperatief U.A.
 BASSARAB, Stefan
 ENENKEL, Barbara
 GARIDEL, Patrick
 SCHOTT, Heidrun
 SINGH, Sanjaya
 LITZENBURGER, Tobias

<120> АНТИТИЛА ПРОТИ PSGL-1 ТА ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ

<130> A0871.70004W000

<140> N/A
 <141> 2012-06-11

<150> US 61/496249
 <151> 2011-06-13

<160> 21

<170> FastSEQ для Windows, версія 4.0

<210> 1
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Амінокислотна послідовність легкого ланцюга 15A7H

<400> 1
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Asn
 20 25 30
 Asp Gly Asn Thr Tyr Phe Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
 35 40 45
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr His Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75 80
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95
 Ser Tyr Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 2

<211> 447

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Амінокислотна послідовність важкого ланцюга 15A7H

<400> 2

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	Ser	Phe
			20					25					30		
Gly	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
	35					40						45			
Ala	Tyr	Ile	Asn	Gly	Gly	Ser	Ser	Thr	Ile	Phe	Tyr	Ala	Asn	Ala	Val
	50				55						60				
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65					70					75				80	
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85					90					95		
Ala	Arg	Tyr	Ala	Ser	Tyr	Gly	Gly	Gly	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln
		100					105						110		
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val
	115					120						125			
Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala
	130					135					140				
Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser
145					150					155				160	
Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val
			165					170					175		
Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro
		180						185					190		
Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys
	195					200						205			
Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro
	210					215				220					
Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val
225					230					235				240	
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr
			245						250					255	
Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu
	260							265					270		
Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys
	275						280					285			
Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser
	290					295					300				
Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys
305					310					315				320	
Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile
			325					330					335		
Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro
		340						345					350		
Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu
	355					360						365			
Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn
	370					375					380				
Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser
385					390					395				400	
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg
			405						410				415		
Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu
		420						425					430		
His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys	
	435						440					445			

<210> 3
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> Амінокислотна послідовність варіабельної ділянки (VL) легкого ланцюга
 15A7H

<400> 3

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

Arg

<210> 4
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> Амінокислотна послідовність варіабельної ділянки (VH) важкого ланцюга
 15A7H

<400> 4

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

<210> 5
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> Амінокислотна послідовність VL CDR1 15A7H

<400> 5

Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Ile	Val	His	Asn	Asp	Gly	Asn	Thr	Tyr	Phe	Glu
1				5					10					15	

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Амінокислотна послідовність VL CDR2 15A7H

<400> 6

Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser
1				5		

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Амінокислотна послідовність VL CDR3 15A7H

<400> 7

Phe	Gln	Gly	Ser	Tyr	Val	Pro	Leu	Thr
1				5				

<210> 8

<211> 5

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Амінокислотна послідовність 15A7H VH CDR1

<400> 8

Ser	Phe	Gly	Met	His
1			5	

<210> 9

<211> 17

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Амінокислотна послідовність VH CDR2 15A7H

<400> 9

Tyr	Ile	Asn	Gly	Gly	Ser	Ser	Thr	Ile	Phe	Tyr	Ala	Asn	Ala	Val	Lys	Gly
1				5				10						15		

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Амінокислотна послідовність VH CDR3 15A7H

<400> 10

Tyr Ala Ser Tyr Gly Gly Gly Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 11

<211> 412

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Амінокислотна послідовність людського PSGL-1 повної довжини

<400> 11

Met Pro Leu Gln Leu Leu Leu Leu Leu Ile Leu Leu Gly Pro Gly Asn
 1 5 10 15
 Ser Leu Gln Leu Trp Asp Thr Trp Ala Asp Glu Ala Glu Lys Ala Leu
 20 25 30
 Gly Pro Leu Leu Ala Arg Asp Arg Gln Ala Thr Glu Tyr Glu Tyr
 35 40 45
 Leu Asp Tyr Asp Phe Leu Pro Glu Thr Glu Pro Pro Glu Met Leu Arg
 50 55 60
 Asn Ser Thr Asp Thr Thr Pro Leu Thr Gly Pro Gly Thr Pro Glu Ser
 65 70 75 80
 Thr Thr Val Glu Pro Ala Ala Arg Arg Ser Thr Gly Leu Asp Ala Gly
 85 90 95
 Gly Ala Val Thr Glu Leu Thr Thr Glu Leu Ala Asn Met Gly Asn Leu
 100 105 110
 Ser Thr Asp Ser Ala Ala Met Glu Ile Gln Thr Thr Gln Pro Ala Ala
 115 120 125
 Thr Glu Ala Gln Thr Thr Gln Pro Val Pro Thr Glu Ala Gln Thr Thr
 130 135 140
 Pro Leu Ala Ala Thr Glu Ala Gln Thr Thr Arg Leu Thr Ala Thr Glu
 145 150 155 160
 Ala Gln Thr Thr Pro Leu Ala Ala Thr Glu Ala Gln Thr Thr Pro Pro
 165 170 175
 Ala Ala Thr Glu Ala Gln Thr Thr Gln Pro Thr Gly Leu Glu Ala Gln
 180 185 190
 Thr Thr Ala Pro Ala Ala Met Glu Ala Gln Thr Thr Ala Pro Ala Ala
 195 200 205
 Met Glu Ala Gln Thr Thr Pro Pro Ala Ala Met Glu Ala Gln Thr Thr
 210 215 220
 Gln Thr Thr Ala Met Glu Ala Gln Thr Thr Ala Pro Glu Ala Thr Glu
 225 230 235 240
 Ala Gln Thr Thr Gln Pro Thr Ala Thr Glu Ala Gln Thr Thr Pro Leu
 245 250 255
 Ala Ala Met Glu Ala Leu Ser Thr Glu Pro Ser Ala Thr Glu Ala Leu
 260 265 270
 Ser Met Glu Pro Thr Thr Lys Arg Gly Leu Phe Ile Pro Phe Ser Val
 275 280 285
 Ser Ser Val Thr His Lys Gly Ile Pro Met Ala Ala Ser Asn Leu Ser
 290 295 300
 Val Asn Tyr Pro Val Gly Ala Pro Asp His Ile Ser Val Lys Gln Cys
 305 310 315 320
 Leu Leu Ala Ile Leu Ile Leu Ala Leu Val Ala Thr Ile Phe Phe Val
 325 330 335
 Cys Thr Val Val Leu Ala Val Arg Leu Ser Arg Lys Gly His Met Tyr
 340 345 350
 Pro Val Arg Asn Tyr Ser Pro Thr Glu Met Val Cys Ile Ser Ser Leu
 355 360 365

Leu Pro Asp Gly Gly Glu Gly Pro Ser Ala Thr Ala Asn Gly Gly Leu
 370 375 380
 Ser Lys Ala Lys Ser Pro Gly Leu Thr Pro Glu Pro Arg Glu Asp Arg
 385 390 395 400
 Glu Gly Asp Asp Leu Thr Leu His Ser Phe Leu Pro
 405 410

<210> 12
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Амінокислотна послідовність шарнірної ділянки IgG4

<400> 12
 Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10

<210> 13
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> 15A7H VL FR1

<400> 13
 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> 14
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> 15A7H VL FR2

<400> 14
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 15
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> 15A7H VL FR3

<400> 15
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr His 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> 16
<211> 11
<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>
<223> 15A7H VL FR4

<400> 16
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 17
<211> 30
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> 15A7H VH FR1

<400> 17
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> 18
<211> 14
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> 15A7H VH FR2

<400> 18
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
1 5 10

<210> 19
<211> 32
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> 15A7H VH FR3

<400> 19
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr 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> 20
<211> 11
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>

<223> 15A7H VH FR4

<400> 20

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

<210> 21

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Амінокислотна послідовність шарнірної ділянки IgG4 дикого типу

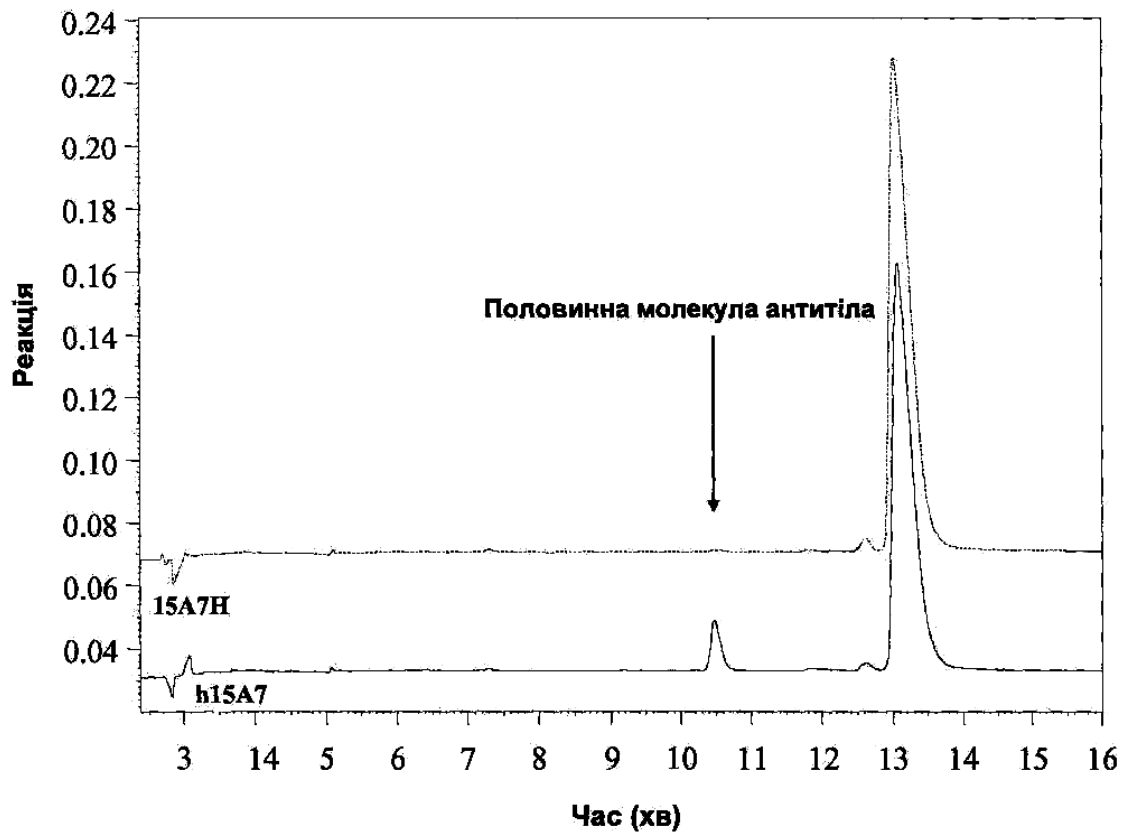
<400> 21

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala
 1 5 10

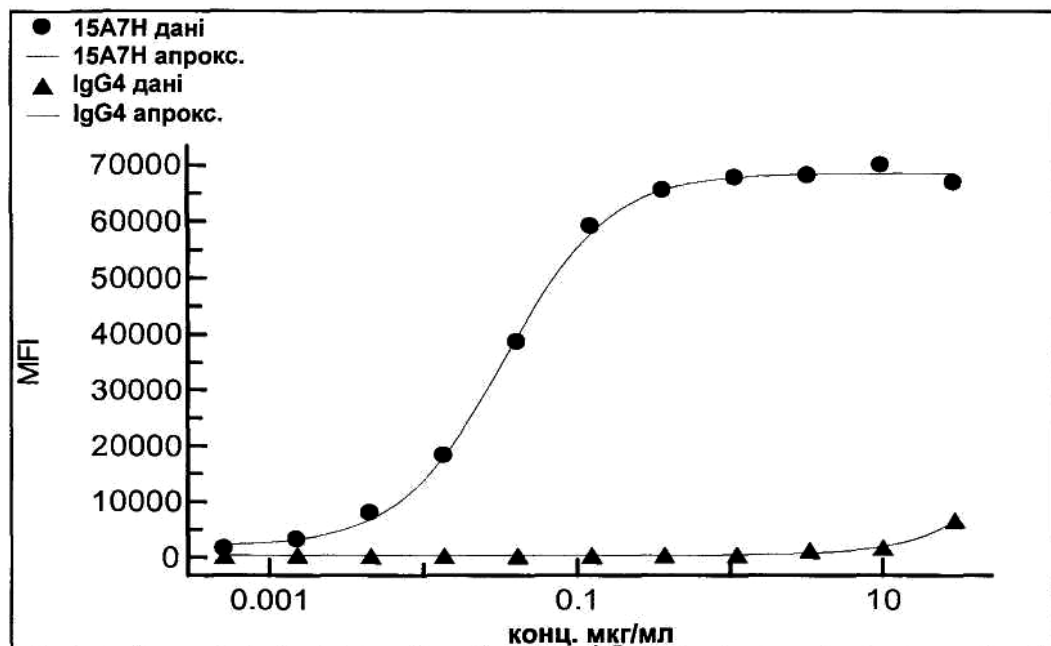
ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Моноклональне антитіло, яке імуноспецифічно зв'язується з людським PSGL-1, що включає:
 - (i) варіабельну ділянку легкого ("VL") ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 3;
 - (ii) важкий ланцюг, який включає варіабельну ділянку важкого ("VH") ланцюга, яка включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 4; та
 - 10 (iii) константну ділянку людського IgG4, яка містить заміщення серину на пролін в амінокислоті 228 важкого ланцюга, згідно з нумерацією покажчика EU.
2. Моноклональне антитіло, яке імуноспецифічно зв'язується з людським PSGL-1, що включає:
 - (i) легкий ланцюг, який включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 1; та
 - (ii) важкий ланцюг, який включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2.
- 15 3. Моноклональне антитіло, яке імуноспецифічно зв'язується з людським PSGL-1, що включає:
 - (i) важкий ланцюг, який складається з SEQ ID NO: 2; та
 - (ii) легкий ланцюг, який складається з SEQ ID NO: 1.
4. Моноклональне антитіло, яке імуноспецифічно зв'язується з людським PSGL-1, що включає:
 - (i) важкий ланцюг, який включає ділянку VH ланцюга, яка включає SEQ ID NO: 8, 9 та 10, та
 - 20 константну ділянку важкого ланцюга людського IgG4, яка містить амінокислотне заміщення серину на пролін в амінокислоті 228 важкого ланцюга згідно з нумерацією покажчика EU; та
 - (ii) легкий ланцюг, який включає ділянку VL ланцюга, яка включає SEQ ID NO: 5, 6 та 7.
5. Моноклональне антитіло за будь-яким з пп. 1-4, яке **відрізняється** тим, що антитіло є очищеним.
- 25 6. Фармацевтична композиція, яка включає моноклональне антитіло за будь-яким з пп. 1-5 та фармацевтично прийнятний носій.
7. Фармацевтична композиція за п. 6, яка **відрізняється** тим, що моноклональне антитіло є очищеним.
8. Комплект, який включає контейнер, який містить моноклональне антитіло за будь-яким з пп. 1-5.
- 30 9. Комплект за п. 8, де контейнер являє собою ампулу.
10. Ін'єкційний пристрій, який містить моноклональне антитіло за будь-яким з пп. 1-5, де ін'єкційний пристрій являє собою шприц.
11. Спосіб лікування запального порушення, який включає введення суб'єктові, який цього потребує, терапевтично ефективної кількості моноклонального антитіла за будь-яким з пп. 1-5 або фармацевтичної композиції за п. 6 або п. 7.
- 35 12. Спосіб за п. 11, який **відрізняється** тим, що запальне порушення є аутоімунною хворобою.
13. Спосіб за п. 11 або 12, який **відрізняється** тим, що запальним порушенням є: псоріаз, бляшковий псоріаз, хронічний бляшковий псоріаз, краплеподібний псоріаз, псоріаз шкірних складок, пустульозний псоріаз, еритродермічний псоріаз, псоріатичний артрит, ревматоїдний артрит, хвороба Крона, анкілозний спондиліт, хвороба "трансплантат проти хазяїна" (GVHD),
- 40

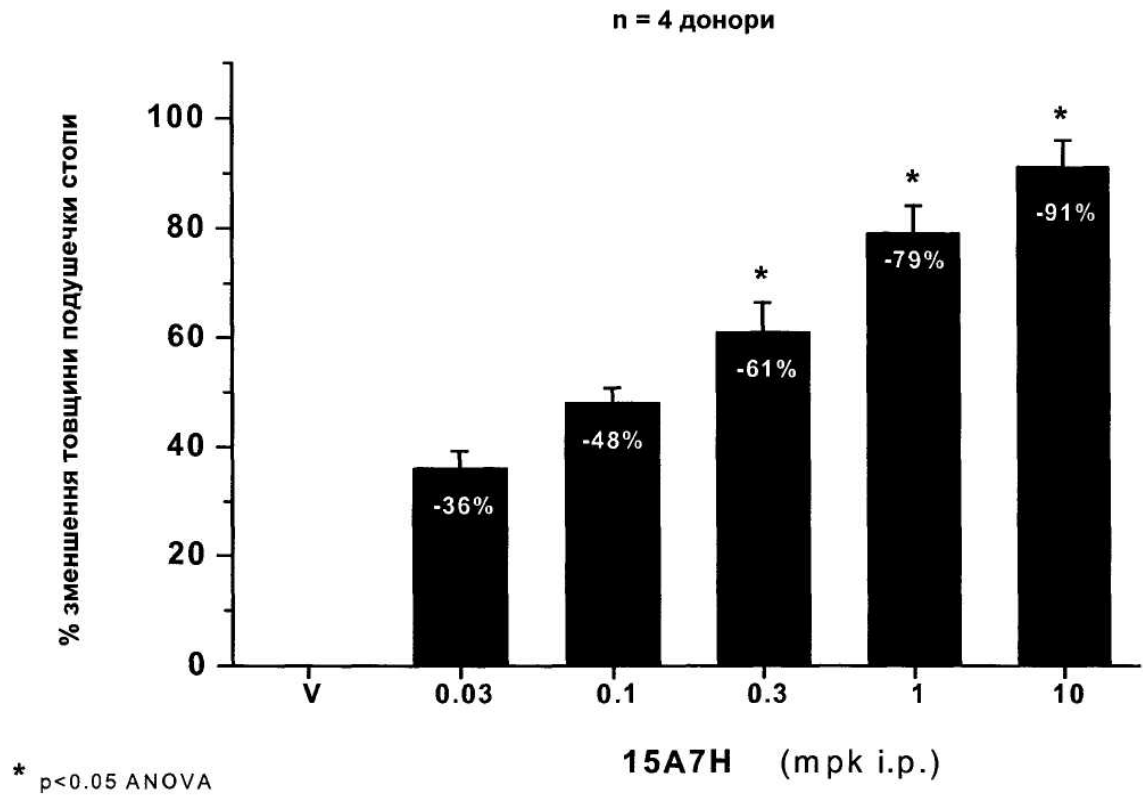
відторгнення трансплантата, виразковий коліт, розсіяний склероз, atopічний дерматит, алергія, астма або діабет 1 типу.



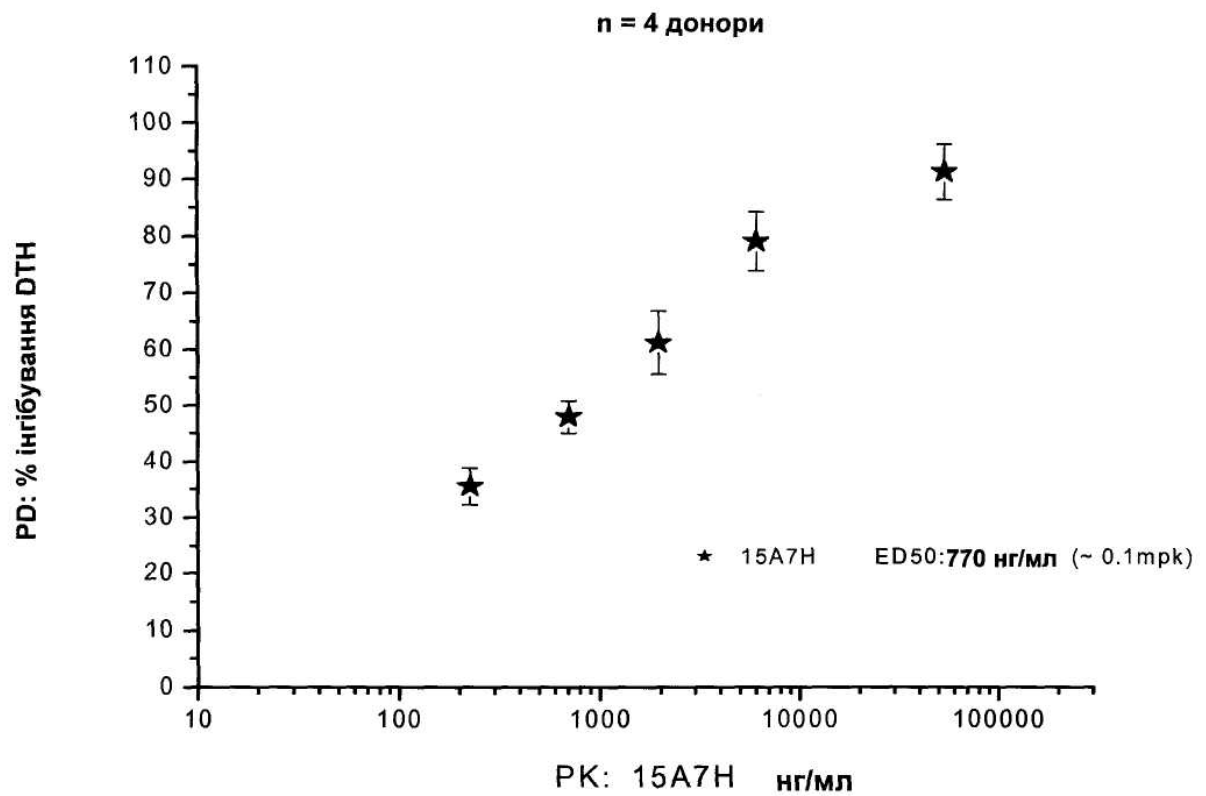
Фіг. 1



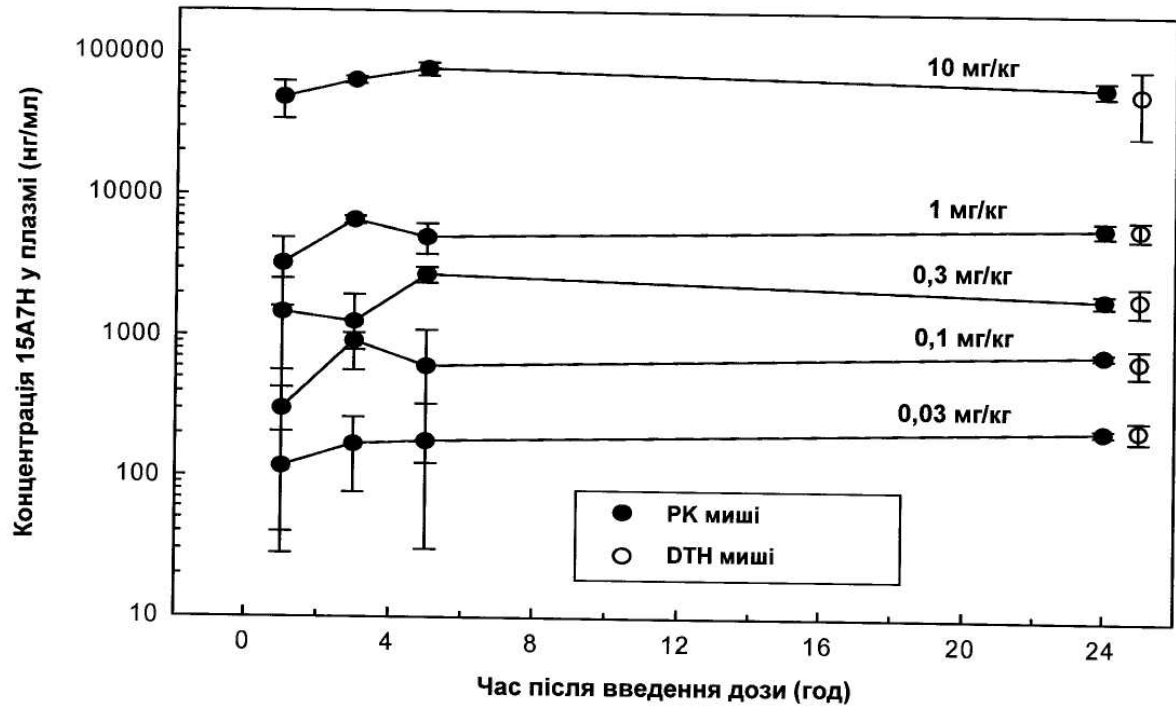
Фіг. 2



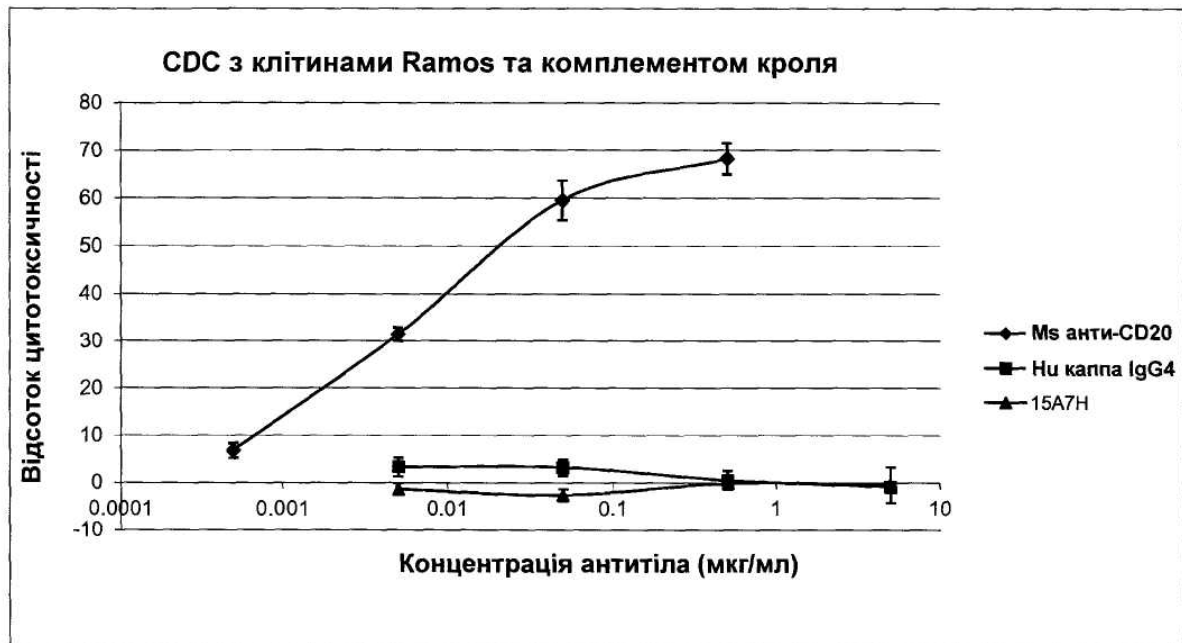
Фіг. 3



Фіг. 4



Фіг. 5



Фіг. 6

А. Важкий ланцюг

```

      (Варіабельна ділянка) FR1          CDR1          FR2
1  EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SEGMHWVRQA PGKGLEWVAY
      CDR2          FR3
51  INGGSSTIFY ANAVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMSLRAED TAVYYCARYA
      CDR3          FR4      }{
101 SYGGGAMDYW GQGLTVTVSS ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK

151 DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT
      (Шарнірна ділянка)
201 YTCNVDHKPS NTKVDKRV ES KYGPPCPPCP A PEFLGGPSV FLFPPKPKDT
      (Константна ділянка)
251 LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY

301 RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT

351 LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDS
      }
401 DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLGK

```

В. Легкий ланцюг

```

      {          FR1 (Варіабельна ділянка)          CDR1          FR2
1  DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRSSQSIV HNDGNTYFEW YQQKPGKAPK
      CDR2          FR3          CDR3
51  LLIYKVSNRF SGVPSRFSGS GSGTHFTLTI SSLQPEDFAT YYCFQGSYVP
      FR4          H
101 LTFGQGTKVE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVCL LNNFYPREAK
      (Константна ділянка)
151 VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE
      }
201 VTHQGLSSPV TKSFNREGC

```

Фіг. 7А - 7В

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

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

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