



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 108860

(13) C2

(51) МПК

C12P 21/08 (2006.01)

A61K 35/14 (2015.01)

G01N 33/53 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

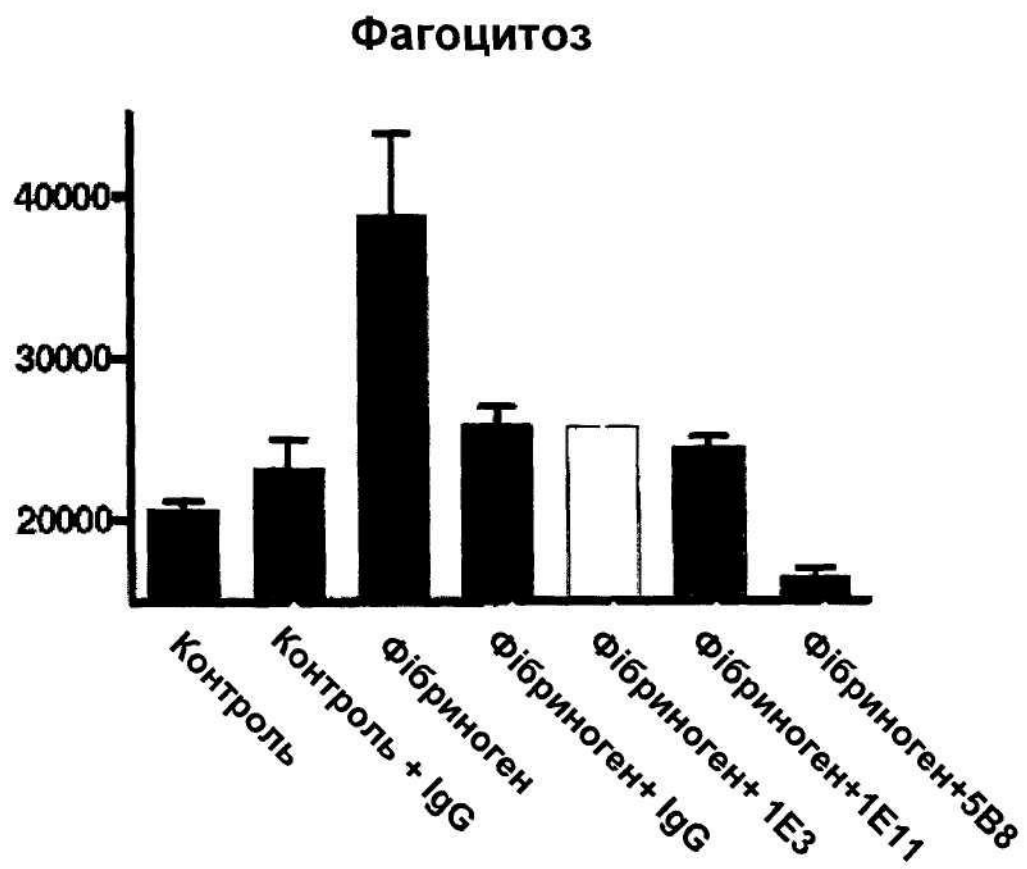
(21) Номер заявки:	а 2012 03044	(72) Винахідник(и):	Акассоглоу Катеріна (US)
(22) Дата подання заявки:	30.09.2010	(73) Власник(и):	ДЗЕ РІДЖЕНТС ОФ ДЗЕ ЮНІВЕРСІТІ ОФ КАЛІФОРНІЯ, 1111 Franklin Street, 8th Floor, Oakland, CA 94607-5200, United States of America (US)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	25.06.2015	(74) Представник:	Ошарова Ірина Олександрівна, реєстр. №9
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	61/248,014	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	US 20090221507 A1, 03.09.2009 ALTIERI ET AL.: 'The Structural Motif Glycine 190-Valine 202 of the Fibrinogen $\gamma$ Chain Interacts with CD11b/CD18 Integrin ( $\alpha$ Mp2, Mac-1) and Promotes Leukocyte Adhesion.' JBC vol. 268, no. 3, 1993, pages 1847 - 1853 ADAMS ET AL.: 'The Fibrin-Derived $\gamma$ 377-395 Peptide Inhibits Microglia Activation and Suppresses Relapsing Paralysis in Central Nervous System Autoimmune Disease.' JEM vol. 204, no. 3, 2007, pages 571 - 582
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	02.10.2009		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	US		
(41) Публікація відомостей про заявку:	11.06.2012, Бюл.№ 11		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	25.06.2015, Бюл.№ 12		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/US2010/050873, 30.09.2010		

## (54) МОНОКЛОНАЛЬНЕ АНТИТІЛО

### (57) Реферат:

Винахід належить до виділеного антитіла, що зв'язує домен  $\gamma$ C фібрину або фібриногену та інгібує адгезію мікроглій до домену  $\gamma$ C фібрину або фібронектину, інгібує зв'язування рецептора Мас-1 з доменом  $\gamma$ C фібрину або фібронектину, і/або інгібує клінічні симптоми експериментального аутоімунного енцефаломієліту (ЕАЕ) під час рецидиву захворювання.

UA 108860 C2



ФІГ. 3

# ПЕРЕХРЕСНЕ ПОСИЛАННЯ НА РОДИННІ ЗАЯВКИ

Цей опис винаходу заявляє перевагу пріоритету Патентної заявки США № 61/248 014, поданої 2 жовтня 2009 року, яка повністю включена в цей опис винаходу шляхом посилання.

## 5 ЗАЯВА ПРО НАУКОВО-ДОСЛІДНІ ТА ДОСЛІДНО-КОНСТРУКТОРСЬКІ РОБОТИ НА ФЕДЕРАЛЬНЕ ЗАМОВЛЕННЯ

Цей винахід частково фінансувався державою по гранту № NS052189 Національного інституту здоров'я. Держава має певні права на цей винахід.

## 10 ВКЛЮЧЕННЯ ПРЕДСТАВЛЕНОГО В ЕЛЕКТРОННОМУ ВИГЛЯДІ МАТЕРІАЛУ ШЛЯХОМ ПОСИЛАННЯ

Список послідовностей, що є невід'ємною частиною цього опису винаходу, включає послідовності, представлені в документі під назвою "RUC110WO\_ST25", створеному програмним забезпеченням Patentin Version 3.5 Управління США з патентів і товарних знаків, і містить нуклеотидні та/або амінокислотні послідовності, описані в цьому винаході. Зміст списку послідовностей повністю включено в цей опис винаходу шляхом посилання.

## 15 ГАЛУЗЬ ТЕХНІКИ

Цей винахід стосується загалом створення моноклональних антитіл і, зокрема, моноклональних антитіл, що розпізнають домен γC фібрину, і способів використання моноклональних антитіл як терапевтичних засобів.

## ВСТУП

20 Розсіяний склероз розвивається у випадках, коли імунна система атакує головний і спинний мозок, вражаючи мієлін, що ізолює і захищає нервові волокна. У цій атаці беруть участь клітини головного мозку під назвою "мікроглії", і такі клітини активуються, коли руйнується гематоенцефалічний бар'єр – шар вистеляючих клітин, який повинен захищати головний мозок від вторгнення небажаних елементів. Крім своєї відомої ролі в утворенні згустків крові, фібриноген активує клітини мікроглії і, таким чином, підсилює запальну реакцію у тваринних моделях розсіяного склерозу. Крім того, було встановлено, що фібриноген бере участь у патогенезі певних видів раку, ревматоїдного артриту та інших захворювань і патологій, при яких відбувається ушкодження тканини, через яке "витікає" фібриноген. Див., наприклад, Akassoglou et al., 2002, Neuron, 33: 861-875, Akassoglou et al., 2004, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101: 6698-6703, Adams et al., 2007, J. Exp. Med., 35: 2428-34. Було також встановлено, що специфічний рецептор, Мас-1, використовуваний фібриногеном у зазначених ефектах, не бере участі у корисних властивостях фібриногену, що сприяють утворенню згустків крові. Однак, до теперішнього часу не був розроблений жоден специфічний інгібітор зв'язування фібриногену з рецептором Мас-1.

35 Тому, необхідні специфічні інгібітори зв'язування фібриногену з рецептором Мас-1, які знижують вплив фібриногену на головний мозок та інші відповідні області, які сприяють запальному процесу, зберігаючи при цьому корисний вплив фібриногену на утворення згустків крові.

## СУТНІСТЬ ВИНАХОДУ

40 Цей винахід пропонує виділене антитіло, що зв'язує домен γC фібрину або фібриногену. У певних варіантах здійснення цього винаходу антитіло демонструє пригнічення адгезії мікроглії до домену γC фібрину або фібриногену більш ніж на 20 %. В іншому варіанті здійснення цього винаходу антитіло демонструє пригнічення адгезії Мас-1 до домену γC фібрину або фібриногену більш ніж на 50 %. Ще в одному варіанті здійснення цього винаходу антитіло інгібує клінічні симптоми експериментального аутоімунного енцефаломієліту (EAE) під час рецидиву захворювання.

45 У різних варіантах здійснення цього винаходу антитіло зв'язується з епітопом γ<sup>□□□□395</sup> домену γC фібрину або фібриногену. Антитіло, що є предметом цього винаходу, може, як альтернатива, зв'язуватися з епітопом γ<sup>190-202</sup> домену γC фібрину або фібриногену. Такі антитіла є моноклональними антитілами, і в різних варіантах здійснення цього винаходу - гуманізованими антитілами, або антитілами людини.

У різних варіантах реалізації цього винаходу антитіло містить легкий ланцюг із трьома гіперваріабельними ділянками, що визначають комплементарність, які містять амінокислотну послідовність, включаючи RSSKSLLHSSGITYLS (SEQ ID NO: 2), QMSNLAS (SEQ ID NO: 3), і AQNLELPLT (SEQ ID NO: 4). У різних варіантах реалізації цього винаходу антитіло містить важкий ланцюг із трьома гіперваріабельними ділянками, що визначають комплементарність, які містять амінокислотну послідовність, включаючи GYTFTSYWIH (SEQ ID NO: 6), LIDPSDSYTNYNQKFRG (SEQ ID NO: 7) і SDPTGC (SEQ ID NO: 8). У певних варіантах здійснення цього винаходу антитіло містить легкий ланцюг із трьома гіперваріабельними ділянками, що визначають комплементарність, які містять амінокислотну послідовність,

включаючи RSSKSLHSSGITYLS (SEQ ID NO: 2), QMSNLAS (SEQ ID NO: 3) і AQNLELPLT (SEQ ID NO: 4), і важкий ланцюг із трьома гіперваріабельними ділянками, що визначають комплементарність, які містять амінокислотну послідовність, включаючи GYTFTSYWIH (SEQ ID NO: 6), LIDPSDSYTNYNQKFRG (SEQ ID NO: 7) і SDPTGC (SEQ ID NO: 8).

5 У різних об'єктах цього винаходу зазначені вище антитіла містять варіабельний легкий ланцюг з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO: 1. У різних об'єктах цього винаходу зазначені вище антитіла містять варіабельний важкий ланцюг з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO: 5. В іншому об'єкті цього винаходу зазначені вище антитіла містять як варіабельний легкий ланцюг з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO: 1, так і варіабельний важкий ланцюг з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO: 5.

10 Ще в іншому об'єкті цього винаходу зазначені вище антитіла містять, кожне окремо, легкий ланцюг із трьома гіперваріабельними ділянками, що визначають комплементарність, які містять амінокислотну послідовність, що на 80 % відповідає таким послідовностям, як RSSKSLHSSGITYLS (SEQ ID NO: 2), QMSNLAS (SEQ ID NO: 3), і AQNLELPLT (SEQ ID NO: 4), і важкий ланцюг із трьома гіперваріабельними ділянками, що визначають комплементарність, які містять амінокислотну послідовність, що на 80 % відповідає таким послідовностям, як GYTFTSYWIH (SEQ ID NO: 6), LIDPSDSYTNYNQKFRG (SEQ ID NO: 7) і SDPTGC (SEQ ID NO: 8), причому ділянки комплементарності легкого ланцюга і ділянки комплементарності важкого ланцюга зберігають здатність зв'язувати рецептор Мас-1.

20 В іншому варіанті реалізації цього винаходу зазначені вище антитіла містять, кожне окремо, легкий ланцюг із трьома гіперваріабельними ділянками, що визначають комплементарність, які містять амінокислотну послідовність, що на 90 % відповідає таким послідовностям, як RSSKSLHSSGITYLS (SEQ ID NO: 2), QMSNLAS (SEQ ID NO: 3), і AQNLELPLT (SEQ ID NO: 4), і важкий ланцюг із трьома гіперваріабельними ділянками, що визначають комплементарність, які містять амінокислотну послідовність, що на 90 % відповідає таким послідовностям, як GYTFTSYWIH (SEQ ID NO: 6), LIDPSDSYTNYNQKFRG (SEQ ID NO: 7) і SDPTGC (SEQ ID NO: 8), причому ділянки комплементарності легкого ланцюга і ділянки комплементарності важкого ланцюга зберігають здатність зв'язувати рецептор Мас-1.

30 Ще в іншому варіанті реалізації цього винаходу зазначені вище антитіла містять, кожне окремо, легкий ланцюг із трьома гіперваріабельними ділянками, що визначають комплементарність, які містять амінокислотну послідовність, що на 95 % відповідає таким послідовностям, як RSSKSLHSSGITYLS (SEQ ID NO: 2), QMSNLAS (SEQ ID NO: 3), і AQNLELPLT (SEQ ID NO: 4), і важкий ланцюг із трьома гіперваріабельними ділянками, що визначають комплементарність, які містять амінокислотну послідовність, що на 95 % відповідає таким послідовностям, як GYTFTSYWIH (SEQ ID NO: 6), LIDPSDSYTNYNQKFRG (SEQ ID NO: 7) і SDPTGC (SEQ ID NO: 8), причому ділянки комплементарності легкого ланцюга і ділянки комплементарності важкого ланцюга зберігають здатність зв'язувати рецептор Мас-1.

40 Ще в іншому варіанті реалізації цього винаходу зазначені вище антитіла містять, кожне окремо, легкий ланцюг із трьома гіперваріабельними ділянками, що визначають комплементарність, які містять амінокислотну послідовність, що на 99 % відповідає таким послідовностям, як RSSKSLHSSGITYLS (SEQ ID NO: 2), QMSNLAS (SEQ ID NO: 3), і AQNLELPLT (SEQ ID NO: 4), і важкий ланцюг із трьома гіперваріабельними ділянками, що визначають комплементарність, які містять амінокислотну послідовність, що на 99 % відповідає таким послідовностям, як GYTFTSYWIH (SEQ ID NO: 6), LIDPSDSYTNYNQKFRG (SEQ ID NO: 7) і SDPTGC (SEQ ID NO: 8), причому ділянки комплементарності легкого ланцюга і ділянки комплементарності важкого ланцюга зберігають здатність зв'язувати рецептор Мас-1.

45 Пропонується також спосіб зниження виразності симптомів патології, що залежить від зв'язування Мас-1 з фібрином або зв'язування Мас-1 з фібриногеном, який полягає у введенні антитіла за п. 1 (формули винаходу) пацієнту, для якого потрібно домогтися зниження виразності симптомів такої патології, у кількості, достатній для зниження виразності симптомів патології у такого пацієнта. У різних варіантах реалізації цього способу пацієнтом є людина. У різних варіантах реалізації цього способу патологія включає розсіяний склероз, ушкодження спинного мозку, хворобу Альцгеймера, інсульт, ревматоїдний артрит і рак.

50 Пропонується також фармацевтична композиція, що містить зазначені вище антитіла і фармацевтично прийнятний носій. Іншим предметом цього винаходу є набір, який містить зазначені вище антитіла. Ще іншим предметом цього винаходу є вектор, який містить послідовність нуклеїнових кислот, що кодує епітоп  $\gamma^{377-395}$  фібрину, CKKTTMKIIPFNRLTIG (SEQ ID NO: 18), або його біологічно активне похідне.

55 Іншим предметом цього винаходу є спосіб створення антитіла, яке імуноспецифічно зв'язується з епітопом  $\gamma^{377-395}$  фібрину або його біологічно активним похідним, що полягає у

введенні пацієнту першої дози клітин за п. 23 (формули винаходу), причому така перша доза є достатньою для розвитку імунної реакції (утворення антитіл) у такого пацієнта. У різних варіантах здійснення цього винаходу зазначений спосіб може також включати етап введення пацієнту другої дози зазначених клітин, причому така друга доза є достатньою для розвитку імунної реакції (утворення антитіл) у такого пацієнта. У різних варіантах здійснення цього винаходу отримане антитіло інгібує зв'язування фібрину з рецептором Мас-1 в організмі пацієнта.

Іншим предметом цього винаходу є спосіб відбору ліганду, який зв'язується з рецептором Мас-1 і модулює активність рецептора Мас-1, що полягає в (а) одержанні антитіла за п. 1 (формули винаходу), (б) приведенні такого антитіла в контакт із епітопом  $\gamma^{377-395}$  фібрину, СККТТМКІІPFNRLTIG (SEQ ID NO: 18), або його біологічно активним похідним, з утворенням комплексу антитіло-поліпептид, (в) приведенні комплексу антитіло-поліпептид у контакт із композицією, яка містить сполуку, що є предметом відбору, і (г) визначенні того, чи зв'язується сполука, що є предметом відбору, з моноклональним антитілом, причому зв'язування сполуки, що є предметом відбору, вказує на те, що така сполука є лігандом, який модулює активність рецептора Мас-1.

Ці та інші особливості, характерні риси і переваги цього винаходу можна краще зрозуміти, звернувшись до наступного повного опису, прикладів і формули винаходу, що додається.

#### КОРОТКИЙ ОПИС ФІГУР

Фахівці в цій галузі розуміють, що наведені нижче рисунки є лише ілюстраціями. Ці рисунки жодним чином не обмежують обсяг цього винаходу.

Фігура 1. Зв'язування моноклонального антитіла, оцінюване вимірюванням поглинання на довжині хвилі 595 нм у порівнянні з комерційно доступним блокувальним антитілом до Мас-1 (M1/70).

Фігура 2. Результати твердофазного імуоферментного аналізу зв'язування антитіла з фібриногеном.

Фігура 3. Моноклональне антитіло 5B8 до модифікованого епітопу  $\gamma^{377-395}$  фібрину демонструє підвищену ефективність пригнічення фагоцитозу.

Фігура 4. Експерименти *in vivo* введення антифібринових антитіл у випадку викликаного протеоліпідним білком експериментального аутоімунного енцефаломієліту після першої появи клінічних симптомів, пов'язаних з антитілами (А) 4E11 і (В) 5B8. Моноклональне антитіло 5B8 викликає пригнічення симптомів під час рецидиву.

#### ДОКЛАДНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

##### Скорочення і визначення

Якщо не визначено іншого, наукові і технічні терміни, використовувані в цьому описі винаходу, мають значення, що є загальноприйнятими серед фахівців. Крім того, якщо контекст не вимагає іншого, терміни, наведені в однині, включають також і множину, і навпаки, терміни, наведені в множині, включають також і однину. Як правило, в описі методик, клітин і культур клітин, мікробіологічних характеристик і хімічних характеристик білків, оліго- і полінуклеотидів і гібридизації в цьому описі винаходу використовуються види номенклатури, добре відомі і широко використовувані фахівцями. У роботі з рекомбінантною ДНК, синтезі олігонуклеотидів, при роботі з культурами клітин і для трансформації клітин використовуються стандартні методики. Ферментативні реакції і методики очищення здійснювалися з використанням доступних у торгівлі наборів відповідно до технічних умов виробника або відповідно до загальноприйнятих серед фахівців методик або методик, представлених в цьому описі винаходу.

Якщо не зазначено іншого, у практичній реалізації цього винаходу використовуються традиційні методи молекулярної біології (включаючи методи рекомбінантних ДНК), мікробіології, клітинної біології, біохімії і імунології, знайомі фахівцям. Такі методи повністю описані в літературі, такий як: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* ("Молекулярне клонування: лабораторні інструкції"), second edition (Sambrook et al., 1989) Cold Spring Harbor Press; *Oligonucleotide Synthesis* ("синтез олігонуклеотидів") (M.J. Gait, ed., 1984); *Methods in Molecular Biology* ("Методи молекулярної біології"), Humana Press; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* ("Клітинна біологія: лабораторний журнал") (J.E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; *Animal Cell Culture* ("Культури тваринних клітин") (R.I. Freshney, ed., 1987); *Introduction to Cell and Tissue Culture* ("Вступ до клітин і культур тканин") (J.P. Mather and P.E. Roberts, 1998) Plenum Press; *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* ("Клітини і культури тканин: лабораторні процедури") (A. Doyle, J.B. Griffiths, and D.G. Newell, eds., 30 1993-1998) J. Wiley and Sons; *Methods in Enzymology* ("Методи ензимології") (Academic Press, Inc.); *Handbook of Experimental Immunology* ("Посібник з експериментальної імунології") (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds.);

Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells ("Вектори передачі генів у клітинах ссавців") (J.M. Miller and M.P. Calos, eds., 1987); Current Protocols in Molecular Biology ("Діючі протоколи в молекулярній біології") (F.M. Ausubel et al., eds., 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, ("ПЦР – полімеразна ланцюгова реакція") (Mullis et al., eds., 1994); Current Protocols in Immunology ("Діючі протоколи в імунології") (J.E. Coligan et al., eds., 1991); Short Protocols in Molecular Biology ("Короткі протоколи в молекулярній біології") (Wiley and Sons, 1999); Immunobiology ("Імунобіологія") (C.A. Janeway and P. Travers, 1997); Antibodies ("Антитіла") (P. Finch, 1997); Antibodies: a practical approach ("Антитіла: непрактичний підхід") (D. Catty, ed., IRL Press, 1988-1989); Monoclonal antibodies: a practical approach ("Моноклональні антитіла: непрактичний підхід") (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using antibodies: a laboratory manual ("Використання антитіл: лабораторні інструкції") (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies ("Антитіла") (M. Zanetti and J.D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995); i Cancer: Principles and Practice of Oncology ("Рак: практична онкологія") (V. T. DeVita et al., eds., J.B. Lippincott Company, 1993).

У зв'язку з лабораторними процедурами і методиками одержання антитіл, одержанням гібридом, методами аналітичної хімії, синтетичної органічної хімії та медичної і фармацевтичної хімії, представленими в цьому описі винаходу, використовується добре відома і широко використовувана фахівцями номенклатура. Для хімічного синтезу, хімічного аналізу, фармацевтичних препаратів, сполук і їхньої доставки і лікування пацієнтів використовуються стандартні методики.

Використовувані в цьому описі винаходу терміни, якщо не зазначено іншого, мають наступні значення:

Антитіло: У цьому описі винаходу термін "антитіло" означає молекули імуноглобуліну і імунологічно активні частини молекул імуноглобуліну (Ig), тобто молекули, що містять зв'язуючі антиген ділянки, які імунологічно зв'язують антиген. Антитіла включають, серед іншого, поліклональні, моноклональні, химерні, доменні, одностанцюгові фрагменти  $F_{ab}$ ,  $F_{ab}^*$  і  $F_{(ab)^*2}$ , одностанцюгові фрагменти  $F_v$  (scFvs) і експресійну бібліотеку  $F_{ab}$  (фрагментів антитіл). Основна структурна одиниця антитіла являє собою тетрамер. Кожний тетрамер складається з двох ідентичних пар поліпептидних ланцюгів, і кожна пара має один "легкий" ланцюг (приблизно 25 кДа) і один "важкий" ланцюг (приблизно 50-70 кДа). Амінотермінальна частина кожного ланцюга включає варіабельну ділянку (V-домен) приблизно з 100-110 або більшої кількості амінокислотних залишків, відповідальний, у першу чергу, за розпізнавання антигенів. Карбокситермінальна частина кожного ланцюга визначає постійну ділянку, відповідальну, у першу чергу, за ефекторну функцію. У загальному випадку молекули антитіл, отриманих від людини, відносяться до кожного із класів імуноглобулінів G, M, A, E і D (Ig, Ig, Ig, Ig і Ig), які відрізняються один від одного природою важкого ланцюга молекули. Деякі класи містять також підкласи, такі як імуноглобуліни Ig<sub>1</sub>, Ig<sub>2</sub> та інші. Крім того, легкими ланцюгами антитіл людини можуть бути каппа-ланцюг або лямбда-ланцюг.

Моноклональне антитіло: Термін "моноклональне антитіло" (MAb) або "композиція моноклональних антитіл", використовуваний у цьому описі винаходу, означає популяцію антитіл, що містить тільки один вид, який складається з унікального легкостанцюгового генного продукту і унікального важкостанцюгового генного продукту. Зокрема, гіперваріабельні ділянки, що визначають комплементарність (CDR) моноклонального антитіла, у всіх молекулах такої популяції є ідентичними. Моноклональні антитіла містять зв'язуючу антиген ділянку, що здатна імунологічно зв'язувати певний епітоп антигену і характеризується унікальною зв'язувальною здатністю стосовно такого антигену.

Ділянка, що зв'язує антиген/зв'язуюча ділянка: термін "зв'язуюча антиген ділянка" або "зв'язуюча ділянка" означає частину молекули антитіла, що бере участь у зв'язуванні антитіла. Зв'язуюча антиген ділянка утворюється амінокислотними залишками N-термінальних варіабельних (V) ділянок важких (H) і легких (L) ланцюгів. Три достатньо дивергуючих ділянки в межах V-ділянок важких і легких ланцюгів, що називаються "гіперваріабельні ділянки", розташовуються між менш мінливими ділянками під назвою "каркасні ділянки" (FR). Таким чином, термін "каркасна ділянка" означає амінокислотну послідовність, що у природних умовах перебуває між гіперваріабельними ділянками імуноглобулінів і примикає до них. У молекулі антитіла три гіперваріабельні ділянки легкого ланцюга і три гіперваріабельні ділянки важкого ланцюга так розташовуються в просторі відносно один одного, щоб утворити зв'язуючу антиген поверхню. Зв'язуюча антиген поверхня комплементарна тривимірній поверхні антигену, що зв'язується, і три гіперваріабельні ділянки кожної з важких і легких ланцюгів називаються також "ділянками, що визначають комплементарність" або "CDR". Віднесення амінокислот до кожного домену здійснюється відповідно до визначень "Послідовностей Кебета білків, що

представляють інтерес для імунології" (Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991)), i Chothia & Lesk J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987), Chothia et al. Nature 342: 878-883 (1989). Інструкції з ідентифікації гіперваріабельних ділянок, що визначають комплементарність, наведені на сайті: <http://www.bioinf.org.Uk/abs/#cdrid.>)

Епітоп: Використовуваний у цьому описі винаходу термін "епітоп" включає будь-яку білкову детермінанту антигену, здатну специфічно зв'язуватися з антитілом або рецептором Т-клітини. Детермінанти епітопа звичайно складаються з хімічно активних поверхневих груп молекул, таких як амінокислоти або бічні ланцюги цукрів, і звичайно мають специфічні об'ємні структурні характеристики і специфічні характеристики заряду. Наприклад, антитіла можуть бути піднятимися відносно N-термінальних і C-термінальних пептидів поліпептиду. Антитіло називають специфічно зв'язуючим певний антиген, якщо константа дисоціації становить величину  $\leq 1$  мкМ, краще -  $\leq 100$  нМ і ще краще -  $\leq 10$  нМ. Біологічно активні похідні епітопа  $\gamma^{377-395}$  СККТТМКІІPFNRLTIG (SEQ ID NO: 18) можна визначити як отримані фахівцями в даній галузі. Наприклад, див. Ugarova et al. Identification of a novel recognition sequence for integrin  $\alpha_M\beta_2$  within the  $\gamma$ -chain of fibrinogen. J Biol Chem. 1998;273: 22519-22527; Ugarova et al. Recognition of fibrinogen by leukocyte integrins. Ann N Y Acad Sci. 2001;936: 368-385.

Імунологічне зв'язування: Використовуваний у цьому описі винаходу термін "імунологічне зв'язування" і "властивості імунологічного зв'язування" означає нековалентну взаємодію такого типу як взаємодія між молекулою імуноглобуліну і антигену, по відношенню до якого такий імуноглобулін є специфічним. Сила або спорідненість взаємодій імунологічного зв'язування може виражатися у вигляді константи дисоціації ( $K_d$ ) продукту взаємодії, причому менші значення  $K_d$  відповідають більшій спорідненості. Властивості імунологічного зв'язування окремих поліпептидів можна визначити кількісно за допомогою методів, добре відомих фахівцям. Один з таких методів включає вимірювання швидкості комплексоутворення зв'язуючого антиген сайту з антигеном і швидкості дисоціації такого комплексу, причому такі швидкості залежать від концентрації часток, що утворюють комплекс, спорідненості взаємодіючих часток і їхніх геометричних параметрів, які рівною мірою впливають на швидкість як прямої, так і зворотної реакції комплексоутворення. Таким чином, "константа швидкості прямої реакції" (асоціації) ( $K_{on}$ ) і "константа швидкості зворотної реакції" (дисоціації) ( $K_{off}$ ) можуть визначатися розрахунком концентрацій і фактичних швидкостей комплексоутворення і дисоціації (див. Nature 361: 186-87 (1993)). Відношення констант швидкостей прямої і зворотної реакції дає змогу виключити всі параметри, не зв'язані зі спорідненістю молекул, і дорівнює константі дисоціації ( $K_d$ ) (див., загалом, Davies et al. (1990) Annual Rev Biochem 10 59: 439-473). Антитіло, що є предметом цього винаходу, специфічно зв'язується з епітопом  $\gamma^{377-395}$  фібриногену, якщо рівноважна константа зв'язування ( $K_d$ )  $\leq 1$  мкм, краще -  $\leq 100$  нм, ще краще -  $\leq 10$  нм і найкраще - від  $\leq 100$  пм до приблизно 1 пм при вимірюванні такими методами, як випробування зв'язування з радіоактивно-міченим лігандом, або іншими аналогічними методами, відомими фахівцям.

Фібрин і фібриноген: Використовувані в цьому описі винаходу терміни "фібрин" і "фібриноген" використовуються на взаємозамінній основі і означають поліпептид, його фрагмент або аналог, що володіє здатністю зв'язуватися з рецептором Мас-1. Фібриноген є розчинним прекурсором фібрину, і обидві речовини містять домен  $\gamma C$  і, таким чином, епітопи, що є предметом цього винаходу.

Ізольований полінуклеотид: Термін "ізольований полінуклеотид", використовуваний у цьому описі винаходу, означає полінуклеотид геномного (кДНК) або синтетичного походження, або змішаного (з цих двох типів) походження, що, у силу свого походження як "ізольований нуклеотид", (1) не зв'язаний ні з повним полінуклеотидом, ні із частиною полінуклеотиду, у якому такий "ізольований полінуклеотид" знаходять у природі, (2) функціонально пов'язаний з полінуклеотидом, з яким він не зв'язаний у природі, або (3) не зустрічається в природі у вигляді частини більшої послідовності.

Ізольований білок: Термін "ізольований білок", використовуваний у цьому описі винаходу, означає білок, що походить від кДНК або рекомбінантної РНК, або синтетичного походження, або змішаного походження, що, у силу свого походження, джерела або одержання у вигляді "ізольованого білка". (1) не пов'язаний із природними білками, (2) не містить інших білків з такого ж джерела, (3) виробляється клітинами іншого виду або (4) не зустрічається в природі.

Поліпептид: Термін "поліпептид", використовуваний у цьому описі винаходу, означає природні білки, фрагменти білків і фрагменти або аналоги поліпептидної послідовності. Фрагменти природних білків і аналоги вважаються видами певного поліпептидного роду. Приклади поліпептидів, представлених у цьому описі винаходу, включають легкий ланцюг молекули імуноглобуліну, представлений як послідовність SEQ ID NO: 1, і важкий ланцюг

молекули імуноглобуліну, представлений як послідовністю SEQ ID NO: 5, а також гіперваріабельні ділянки, представлені послідовностями SEQ ID №№ 2, 3, 4, 6, 7 і 8; молекули антитіл, утворених комбінаціями, що містять важкий ланцюг молекул імуноглобуліну, з легким ланцюгом молекул імуноглобуліну, такий як каппа-ланцюг молекул імуноглобуліну, і навпаки, а також фрагменти і аналоги таких молекул.

Що зустрічається в природі: Термін "що зустрічається в природі", використовуваний у цьому описі винаходу у зв'язку з різними об'єктами, означає той факт, що певний об'єкт можна знайти в природі. Наприклад, поліпептидна або полінуклеотидна послідовність, що присутня в організмі (включаючи вірус), яку можна виділити із природного джерела і яка не була спеціально модифікована людиною в лабораторії або іншим способом, є послідовністю, що зустрічається в природі.

Функціонально зв'язаний: Термін "функціонально зв'язаний", використовуваний у цьому описі винаходу, означає таке взаємне розташування компонентів, що дозволяє їм функціонувати заданим способом. Керуюча послідовність, "функціонально зв'язана" з кодувальною послідовністю, зв'язана таким чином, що експресія кодувальної послідовності досягається в умовах, порівнянних з умовами для керуючої послідовності.

Керуюча послідовність: Термін "керуюча послідовність", використовуваний у цьому описі винаходу, означає полінуклеотидну послідовність, необхідну для здійснення експресії і процесингу кодувальної послідовності, з якою вона зв'язана. Такі керуючі послідовності мають різну природу залежно від організму господаря. У прокаріотів такі керуючі послідовності, як правило, включають промотор, рибосомний зв'язувальний сайт і кодон, що термінує транскрипцію. Термін "керуюча послідовність" повинен включати, як мінімум, усі компоненти, чия присутність необхідна для експресії і процесингу, і може також включати додаткові компоненти, присутність яких є корисною, наприклад, лідерну послідовність і послідовності учасників злиття.

Полінуклеотид: Термін "полінуклеотид", використовуваний у цьому описі винаходу, означає полімерну сполуку нуклеотидів довжиною не менше 10 основ, причому або рибонуклеотидів, або дезоксирибонуклеотидів, або модифікованої форми кожного із цих двох типів нуклеотидів. Цей термін включає також одноланцюгову і дволанцюгову форму ДНК.

Олігонуклеотид: Термін "олігонуклеотид", використовуваний у цьому описі винаходу, означає нуклеотиди, що зустрічаються в природі і модифіковані нуклеотиди, зв'язані один з одним олігонуклеотидними зв'язками, що зустрічаються в природі і не зустрічаються в природі. Олігонуклеотиди – це підмножина полінуклеотидів, що містять, як правило, у довжину 200 або менше основ. Краще, коли олігонуклеотиди містять від 10 до 60 основ у довжину, і найкраще - від 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 або 20 до 40 основ у довжину. Олігонуклеотиди, як правило, є одноланцюговими, наприклад, олігонуклеотиди, використовувані як зонди; втім, олігонуклеотиди можуть бути і дволанцюговими, наприклад, використовувані для створення мутантів генів.

Нуклеотиди, що зустрічаються в природі: Термін "нуклеотиди, що зустрічаються в природі (природні)", використовуваний у цьому описі винаходу, включає дезоксирибонуклеотиди і рибонуклеотиди. Термін "модифіковані нуклеотиди", згаданий у цьому описі винаходу, включає нуклеотиди з модифікованими або заміщеними групами цукру тощо. Термін "олігонуклеотидні зв'язки", згаданий у цьому описі винаходу, включає такі олігонуклеотидні зв'язки як фосфотіоат, фосфоселеноат, фосфоанілотіоат, фосфоаніладат тощо. Див., наприклад, LaPlanche et al. Nucl. Acids Res. 14:9081 (1986); Stec et al. J. Am. Chem. Soc. 106:6077 (1984), Stein et al. Nucl. Acids Res. 16:3209 (1988), Zon et al. Anti Cancer Drug Design 6:539 (1991); Zon et al. Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, стор.87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England (1991)); Stec et al. Патент США № 5 151 510; Uhlmann and Peyman Chemical Reviews 90:543 (1990). Нуклеотид може включати також мітку для його виявлення, якщо буде потрібно.

Селективно гібридизувати: Термін "селективно гібридизувати", використовуваний у цьому описі винаходу, означає детектуванням чином і специфічно зв'язувати. Полінуклеотиди, олігонуклеотиди та їхні фрагменти, представлені в цьому описі винаходу, селективно гібридизуються до ниток нуклеїнових кислот в умовах гібридизації і відмивання, які мінімізують очікувані кількості детектуваного зв'язування з неспецифічними нуклеїновими кислотами. Для досягнення умов селективної гібридизації можуть використовуватися досить жорсткі умови, відомі фахівцям і представлені в цьому описі винаходу. Як правило, гомологія послідовностей нуклеїнових кислот у полінуклеотидах, олігонуклеотидах та їхніх фрагментах, представлених у цьому описі винаходу, із цільовою послідовністю нуклеїнових кислот становить не менше 80 %, більш типовою і переважно зростаючою гомологією – не менш ніж 85 %, 90 %, 95 %, 99 % і



100 % гомологія. Дві амінокислотні послідовності є гомологічними, якщо існує часткова або повна ідентичність їхніх послідовностей. Наприклад, 85 % гомологія означає, що 85 % амінокислот є ідентичними при зіставленні двох послідовностей з максимальною відповідністю. Допускаються пропуски (у кожній з двох послідовностей, що зіставляються) для забезпечення

5 максимальної відповідності довжиною 5 або менше залишків, ще краще - довжиною 2 або менше залишків. Як альтернатива і ще краще – дві білкові послідовності (або поліпептидні послідовності, похідні від них, довжиною не менше 30 амінокислотних залишків) є гомологічними, у значенні, використовуваному в цьому описі винаходу, якщо їхня оцінка вирівнювання перевищує 5 (стандартних одиниць розбіжності) за програмою "ALIGN" з

10 використанням матриці даних мутацій і штрафу за пропуск у послідовності, рівного 6 або вище. Див. See Dayhoff, M. O., в "Атласі білкових послідовностей і структур" (Atlas of Protein Sequence and Structure), стор. 101-110 (том 5, Національний фонд біомедичних досліджень (National Biomedical Research Foundation) (1972)) і Доповнення 2 до цього тому, стор. 1-10. Ще краще, коли дві послідовності або їхні частини є гомологічними, якщо їхньої амінокислоти на 50 % або

15 більше ідентичні при оптимальному зіставленні з використанням програми "ALIGN". Термін "відповідає" використовується в цьому описі винаходу для позначення того, що полінуклеотидна послідовність є гомологічною (тобто ідентичною, не обов'язково еволюційно родинною) всій або частині полінуклеотидної послідовності порівняння, або того, що поліпептидна послідовність є ідентичною поліпептидній послідовності порівняння. На відміну від цього, термін

20 "комплементарний" використовується в цьому описі винаходу для позначення того, що комплементарна послідовність є гомологічною стосовно всій або частини полінуклеотидної послідовності порівняння. Для прикладу, нуклеотидна послідовність "TATAC" відповідає послідовності порівняння "TATAC" і є комплементарною послідовності порівняння "GTATA".

Наведені нижче терміни - "послідовність порівняння", "інтервал порівняння", "ідентичність послідовностей", "відсоток ідентичності послідовностей" та "істотна ідентичність" - використовуються для опису співвідношення послідовностей двох або більше полінуклеотидних або амінокислотних послідовностей.

Послідовність порівняння: "Послідовність порівняння" - це певна послідовність, використовувана як основа для порівняння послідовностей. Послідовність порівняння може

30 бути частиною більшої послідовності, наприклад, сегментом повномірної кДНК або генної послідовності, наведеної в списку послідовностей, або може містити повну кДНК або генну послідовність. Як правило, послідовність порівняння містить не менше 18 нуклеотидів або 6 амінокислотних залишків, нерідко - не менше 24 нуклеотидів або 8 амінокислотних залишків, і часто - не менше 48 нуклеотидів або 16 амінокислотних залишків. Оскільки дві полінуклеотидні або амінокислотні послідовності можуть (кожна) (1) містити послідовність (тобто частину повної полінуклеотидної або амінокислотної послідовності), аналогічну в обох молекулах, і (2) можуть також містити послідовність, що відрізняється для двох полінуклеотидних або амінокислотних послідовностей, порівняння послідовностей двох (або більше) молекул, як правило, здійснюється шляхом порівняння послідовностей двох молекул у певному "інтервалі

40 порівняння" для визначення і порівняння окремих ділянок подібності послідовностей.

Інтервал порівняння: Використовуваний у цьому описі винаходу термін "інтервал порівняння" означає схематичну ділянку з не менш ніж 18 суміжних положень нуклеотидів або 6 амінокислот, на якій полінуклеотидну послідовність або амінокислотну послідовність можна порівнювати з послідовністю порівняння, що містить не менше 18 суміжних нуклеотидів або 6

45 амінокислотних залишків, і в якій частина полінуклеотидної послідовності в інтервалі порівняння може містити додавання, делеції, заміщення тощо (тобто пропуски), що не перевищують 20 % у порівнянні з послідовністю порівняння (яка не містить додавань або делецій) при оптимальному зіставленні обох послідовностей. Оптимальне зіставлення послідовностей для виставлення інтервалу порівняння можна здійснювати за допомогою алгоритму локальної гомології, представленого в Smith and Waterman Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), алгоритму вивірки гомології Needleman and Wunsch J. Mol. Biol. 48:443 (1970), методу пошуку подібності Pearson and Lipman Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 85:2444 (1988), комп'ютеризованої реалізації цих алгоритмів (програми GAP, BESTFIT, FASTA, і TFASTA у пакеті програм Wisconsin Genetics Software Package, випуск 7.0, (Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), Geneworks, або

50 в пакеті програмного забезпечення MacVector), або за допомогою перевірки і кращого зіставлення (тобто такого, що приводить до найбільшого відсотка гомології в інтервалі порівняння) різними обраними методами.

Споріднення послідовностей: Термін "ідентичність послідовностей" означає, що дві полінуклеотидні або амінокислотні послідовності є ідентичними (тобто на підставі порівняння нуклеотиду з нуклеотидом і залишку із залишком) у межах інтервалу порівняння. Термін

60

"відсоток ідентичності послідовностей" визначається порівнянням двох оптимально вирівняних послідовностей в інтервалі порівняння з підрахунком кількості положень, у яких знаходяться ідентичні основи нуклеїнових кислот (наприклад, А, Т, С, G, U або I) чи ідентичні амінокислотні залишки в обох послідовностях для визначення кількості співпадаючих положень; потім кількість співпадаючих положень ділиться на загальну кількість положень в інтервалі порівняння (тобто на розмір інтервалу порівняння) і результат множиться на 100 для одержання відсотка ідентичності послідовностей. Термін "істотна ідентичність", використовуваний у цьому описі винаходу, служить характеристикою полінуклеотидної або амінокислотної послідовності, відповідно до якої полінуклеотидна або амінокислотна послідовність демонструє не менш ніж 85-відсоткову ідентичність, краще – не менше ніж 90-95-відсоткову ідентичність, як правило, не менше ніж 99-відсоткову ідентичність послідовності порівняння в інтервалі порівняння довжиною не менше 18 положень нуклеотидів (6 положень амінокислот), часто – в інтервалі порівняння довжиною не менше 24-48 положень нуклеотидів (8-16 положень амінокислот), причому відсоток ідентичності послідовностей розраховується шляхом порівняння послідовності порівняння з послідовністю, що може включати не більше 20 % делецій або додавань відносно послідовності порівняння в інтервалі порівняння. Послідовність порівняння може бути частиною більшої послідовності.

Амінокислоти: У цьому описі винаходу використовуються двадцять традиційних амінокислот і їх скорочених загальноприйнятих назв. Див. "Імунологія – А Синтез" (Immunology-A Synthesis (2nd Edition, E. S. Golub and D. R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland Mass. (1991)). Стереоізомери (наприклад, D-амінокислоти) двадцяти традиційних амінокислот, амінокислоти, що не зустрічаються в природі, такі як  $\alpha$ - $\beta$ -дизаміщені амінокислоти, N-алкіламінокислоти, молочна кислота та інші нетрадиційні амінокислоти також можуть бути підходящими компонентами поліпептидів, що є предметом цього винаходу. Приклади нетрадиційних амінокислот включають: 4-гідроксипролін,  $\gamma$ -карбоксиглутамат,  $\epsilon$ -N, N, N-триметиллізин,  $\epsilon$ -N-ацетиллізин, O-фосфосерин, N-ацетилсерин, N-формілметионін, 3-метилгістидин, 5-гідроксилізин,  $\alpha$ -N-метиларгінін та інші подібні амінокислоти і імінокислоти (наприклад, 4-гідроксипролін). У записі поліпептидних послідовностей у цьому описі винаходу напрям вліво означає амінотермінальний напрям, а напрям вправо - карбокситермінальний напрям у відповідності зі стандартним (традиційним) написанням. Аналогічним чином, якщо не визначено іншого, лівий кінець одноланцюгових полінуклеотидних послідовностей є 5'-кінцем, а напрям дволанцюгових нуклеотидних послідовностей вліво - 5'-напрямом. Напрямок 5'-3' додавання транскриптів РНК, що утворюються, називається ділянкою послідовності в (прямому) напрямі транскрипції на нитці ДНК, що має таку ж послідовність, що й РНК, а напрям 5'-5' транскрипції РНК називається послідовністю транскрипції "у зворотному напрямі" або послідовністю "проти ходу транскрипції" ("лівим" елементом оперону) на нитці ДНК, що має таку ж послідовність, що й РНК, і 3'-положення відносно 3'-кінця транскрипту РНК називаються положеннями по ходу транскрипції (або "правим елементом оперону).

Істотна ідентичність: У застосуванні до поліпептидів термін "істотна ідентичність" означає, що дві пептидні послідовності при оптимальному зіставленні, наприклад, за допомогою програм GAP або BESTFIT, використовуючи стандартні (за замовчуванням) зважені кількості пропусків, дають не менше 80-відсоткової ідентичності послідовностей, краще – не менше 90-відсоткової ідентичності послідовностей, ще краще – не менше 95-відсоткової ідентичності послідовностей, і найкраще – не менше 99-відсоткової ідентичності послідовностей. Краще, коли неідентичні положення залишків розрізняються консервативними замінами амінокислот. Консервативною заміною амінокислот називається взаємозамінність залишків, що мають аналогічні бічні ланцюги. Наприклад, група амінокислот, що мають аліфатичні бічні ланцюги, включає гліцин, аланін, валін, лейцин і ізолейцин; група амінокислот, що має аліфатичні-гідроксильні бічні ланцюги, включає серін і треонін; група амінокислот, що має амідвмісні бічні ланцюги, включає аспарагін і глутамін; група амінокислот, що має амідароматичні бічні ланцюги, включає фенілаланін, тирозин і триптофан; група амінокислот, що має основні бічні ланцюги, включає лізин, аргінін і гістидин; група амінокислот, що має сірковмісні бічні ланцюги, включає цистеїн і метіонін. Кращими групами консервативного амінокислотного заміщення є: валін-лейцин-ізолейцин, фенілаланін-тирозин, лізин-аргінін, аланін-валін, глутамінова-аспарагінова кислота і аспарагін-глутамін.

Як наведено в цьому описі винаходу, зміни в амінокислотних послідовностях антитіл або молекул імуноглобулінів вважаються охопленими цим винаходом за умови, що зміни в амінокислотній послідовності зберігають ідентичність на рівні не менше 75 %, ще краще – не менше 80 %, 90 %, 95 %, і найкраще – 99 %. Включені також певні відсотки ідентичності послідовностей, що потрапляють у зазначений діапазон, такі як 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %

80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % і 99 %. Зокрема, передбачені консервативні амінокислотні заміни. Консервативні заміни – це заміни в межах родини амінокислот, що мають родинні бічні ланцюги. Генетично кодовані амінокислоти, як правило, поділяються на наступні родини: (1) кислі амінокислоти - аспартат, глутамат; (2) основні амінокислоти - лізин, аргінін, гістидин; (3) неполярні амінокислоти - аланін, валін, лейцин, ізолейцин, пролін, фенілаланін, метіонін, триптофан; і (4) незаряджені полярні амінокислоти - гліцин, аспарагін, глутамін, цистеїн, серін, треонін, тирозин. До гідрофільних амінокислот відносяться аргінін, аспарагін, аспартат, глутамін, глутамат, гістидин, лізин, серін і треонін. До гідрофобних амінокислот відносяться аланін, цистеїн, ізолейцин, лейцин, метіонін, фенілаланін, пролін, триптофан, тирозин і валін. Інші родини амінокислот включають (i) серін і треонін, що утворюють алифатично-гідроксильне родину; (ii) аспарагін і глутамін, що утворюють родину амідвмісних амінокислот; (iii) аланін, валін, лейцин і ізолейцин, що утворюють родину алифатических амінокислот; і (iv) фенілаланін, триптофан і тирозин, що утворюють родину ароматичних амінокислот. Наприклад, можна обґрунтовано очікувати, що окреме заміщення лейцину ізолейцином або валіном, аспартату глутаматом, треоніну серіном або аналогічне заміщення амінокислоти структурно родинною амінокислотою не вплине істотно на зв'язування або інші властивості отриманої молекули, особливо, якщо заміщення не стосується амінокислоти в каркасній ділянці. Чи приводить заміна амінокислоти до утворення функціонального пептиду, можна відразу ж визначити, кількісно аналізуючи питому активність поліпептидного похідного. Такі проби докладно представлені в цьому описі винаходу. Фрагменти або аналоги антитіл або молекул імуноглобулінів можуть легко приготувати фахівці в цій галузі. Кращі аміно- або карбокситермінальні фрагменти або аналоги перебувають поблизу границь функціональних доменів. Структурні і функціональні домени можуть бути ідентифіковані порівнянням даних про нуклеотидні і/або амінокислотні послідовності з відкритими або патентованими базами даних про послідовності. Краще, коли для ідентифікації мотивів послідовностей або передбачених доменів певних білкових конформацій, що зустрічаються в інших білках відомої структури та/або функції, будуть використовуватися комп'ютеризовані методи порівняння. Відомі методи ідентифікації білкових послідовностей, що згортаються у відомі об'ємні структури. Bowie et al. Science 253:164 (1991). Таким чином, представлені вище приклади показують, що фахівці в цій галузі можуть розпізнати мотиви послідовностей і структурні конформації, які можуть використовуватися для визначення структурних і функціональних доменів відповідно до цього опису винаходу.

Кращими амінокислотними замінами є заміни, які: (1) знижують сприйнятливості до протеолізу; (2) знижують сприйнятливості до окислювання; (3) змінюють здатність до зв'язування для утворення комплексів білків; (4) змінюють зв'язувальну здатність і (4) надають або змінюють інші фізико-хімічні або функціональні властивості таких аналогів. Аналоги можуть включати різні мутеїни, що мають послідовності, відмінні від пептидних послідовностей, що зустрічаються в природі. Наприклад, одиничне або множинне заміщення амінокислот (краще – консервативне амінокислотне заміщення) можна здійснити в послідовності, що зустрічається в природі (краще – у частині поліпептиду за межами домену (доменів), що утворюють міжмолекулярні контакти). Консервативне амінокислотне заміщення не повинно істотно змінювати структурні характеристики вихідної послідовності (наприклад, заміщальна амінокислота не повинна сприяти руйнуванню спіралі, присутньої у вихідній послідовності, або руйнуванню інших типів вторинної структури, характерних для вихідної послідовності). Приклади визнаних у цій галузі вторинних і третинних структур поліпептидів описані в: *Proteins, Structures and Molecular Principles* ("Білки, структури і молекулярні принципи") (Creighton, Ed., W.H. Freeman and Company, New York (1984)); *Introduction to Protein Structure* ("Вступ до структури білків") (C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)); і Thornton et al. Nature 354:105 (1991).

Поліпептидний фрагмент: Використовуваний у цьому описі винаходу термін "поліпептидний фрагмент" означає поліпептид, що має амінотермінальну і/або карбокситермінальну делецію, але при цьому амінокислотна послідовність, що залишається, ідентична відповідним положенням в послідовності, що зустрічається в природі, отриманій, наприклад, від повномірної послідовності кДНК. Фрагменти, як правило, містять у довжину не менше 5, 6, 8 або 10 амінокислотних залишків, краще, коли не менше 14 амінокислотних залишків, ще краще – не менше 20 амінокислотних залишків, як правило, не менше 50 амінокислотних залишків, і ще краще – не менше 70 амінокислотних залишків. Використовуваний у цьому описі винаходу термін "аналог" означає поліпептиди, що містять сегмент із не менше ніж 5 амінокислот, істотно ідентичний частині отриманої амінокислотної поверхні, що демонструє специфічне зв'язування з епітопом γ<sup>377-395</sup> фібрину, СККТТМКІІРNRLTIG (SEQ ID NO: 18), або його біологічно активним

похідним у придатних для зв'язування умовах. Як правило, поліпептидні аналоги містять консервативне амінокислотне заміщення (або додавання, або делецію) у порівнянні з послідовністю, що зустрічається в природі. Аналоги, як правило, мають у довжину не менше 5 амінокислот, краще – не менше 10 амінокислот або більше, і часто можуть по довжині

відповідати повномірному поліпептиду, що зустрічається в природі.

Пептидні аналоги, як правило, використовуються у фармацевтичній галузі як непептидні ліки, що володіють властивостями, аналогічними властивостям відповідного пептиду. Такі типи непептидних сполук називаються "пептидні міметики" або "пептидоміметики". Fauchere, J. Adv. Drug Res. 15:29 (1986), Veber and Freidinger TINS p. 392 (1985); і Evans et al. J. Med. Chem. 30:1229 (1987). Такі сполуки часто розробляють за допомогою комп'ютеризованого молекулярного моделювання. Пептидоміметики, структурно аналогічні терапевтично корисним пептидам, можуть використовуватися для досягнення еквівалентних терапевтичних і профілактичних ефектів. Як правило, пептидоміметики структурно аналогічні еталонному поліпептиду (тобто поліпептиду, що володіє певною біохімічною властивістю або фармакологічною активністю), такому як антитіло людини, але при цьому в ньому одна або кілька пептидних ланок заміщені ланкою, обраною із групи, що включає:  $-\text{CH}_2\text{NH}-$ ,  $-\text{CH}_2\text{S}-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}=\text{CH}-$  (цис- і транс-),  $-\text{COCH}_2-$ ,  $\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$  і  $-\text{CH}_2\text{SO}-$ , методами, добре відомими фахівцям. Для створення стабільніших пептидів може використовуватися систематичне заміщення однієї або декількох амінокислот консенсусної послідовності D-амінокислотою того ж типу (наприклад, введенням D-лізину замість L-лізину). Крім того, зв'язані пептиди, що містять консенсусну послідовність або варіацію послідовності, істотно ідентичну консенсусній послідовності, можуть створюватися методами, відомими фахівцям (Rizo and Gierasch Ann. Rev. Biochem. 61:387 (1992)); наприклад, додаванням внутрішніх залишків цистеїну, здатних утворювати дисульфідні містки, що роблять пептид циклічним.

Засіб: Використовуваний у цьому описі винаходу термін "засіб" означає хімічну сполуку, суміш хімічних сполук, біологічну макромолекулу або екстракт із біологічних матеріалів.

Мітка: Використовуваний у цьому описі винаходу термін "мітка" означає введення детектованого маркера, наприклад, шляхом введення радіоактивно міченої амінокислоти або додаванням до поліпептиду біотинильних груп, які можуть виявлятися маркованим авідином (наприклад, стрептавідином, що містить флуоресцентний маркер, або володіє ферментативною активністю, яку можна виявити оптичними або калориметричними методами). У певних випадках мітка або маркер можуть бути також терапевтичними. Відомі фахівцям і можуть використовуватися різні методи мічення поліпептидів і глікопротеїнів. Приклади міток для поліпептидів включають, серед іншого, такі мітки: радіоізотопи або радіонукліди (наприклад,  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ), флуоресцентні мітки (наприклад, флуоресцеїну ізотіоціанат, родамін, люмінофор на основі комплексів лантанидів), ферментні мітки (наприклад, пероксидаза хрину, п-галактозидаза, люцифераза, лужна фосфатаза), хемілюмінесцентні мітки, біотинильні групи, задані поліпептидні епітопи, що розпізнаються вторинним репортером (наприклад, парні послідовності лейцинової "блискавки", сайти зв'язування із вторинними антитілами, домени зв'язування з металом, епітопні мітки). У деяких варіантах здійснення цього винаходу мітки приєднують через містки різної довжини для подолання можливих стеричних перешкод.

Фармацевтичний засіб або ліки: Використовуваний у цьому описі винаходу термін "фармацевтичний засіб" або "ліки" означає хімічну сполуку або композицію, здатну викликати бажаний терапевтичний ефект при належному введенні пацієнту.

Інші хімічні терміни, використовувані в цьому описі винаходу, є традиційними в цій галузі і наведені, наприклад, в "Словнику хімічних термінів" (The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (Parker, S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco (1985))).

В основному чистий: Використовуваний у цьому описі винаходу термін "в основному чистий" означає цільовий продукт, що є переважно присутнім (тобто представлений найбільшою кількістю молів порівняно з будь-яким іншим компонентом композиції), і переважно в основному очищена фракція означає композицію, у якій цільовий продукт становить не менше приблизно 50 % (молей) від всіх присутніх у композиції макромолекулярних продуктів. Як правило, в основному чиста композиція містить більше ніж приблизно 80 % цільового продукту від всіх макромолекулярних продуктів, що присутні у композиції, ще краще – більше ніж приблизно 85 %, 90 %, 95 % і 99 %. Найкраще – цільовий продукт очищується до досягнення істотної однорідності (забруднюючі продукти при цьому вже не можуть виявлятися в композиції традиційними методами виявлення), при якій композиція складається, в основному, з одного макромолекулярного продукту.

Пацієнт: Використовуваний у цьому описі винаходу термін "пацієнт" означає людину або

тварину ("ветеринарний пацієнт/об'єкт").

#### Моноклональні антитіла

Цей винахід представляє моноклональні антитіла, що інгібують зв'язування фібриногену з рецептором Мас-1. Зокрема, цей винахід представляє моноклональні антитіла, які специфічно зв'язують епітоп  $\gamma^{377-395}$  домену  $\gamma$ С фібрину або фібриногену. Цей винахід також представляє антитіла, що зв'язують епітоп  $\gamma^{190-202}$  домену  $\gamma$ С фібрину або фібриногену. Такі антитіла блокують руйнуючий ефект фібрину на нервову систему, не впливаючи на його корисні ефекти щодо згортання крові. Такі антитіла можуть блокувати утворення бляшок розсіяного склерозу і розвиток певних видів раку. Приклади антитіл, що є предметом цього винаходу, включають, наприклад, антитіло 5B8 (що зв'язується з епітопом  $\gamma^{377-395}$ ). Крім того, антитіла, що є предметом цього винаходу, включають, наприклад, антитіло 1E3 (що зв'язується з епітопом  $\gamma^{190-202}$ ). У цьому описі винаходу представлені різні полінуклеотидні і поліпептидні послідовності, родинні антитілу 5B8, і способи використання таких послідовностей. Такі послідовності включають послідовність легкого ланцюга антитіла 5B8 (SEQ ID NO: 1), три гіперваріабельні ділянки, що визначають комплементарність послідовності легкого ланцюга (CDR-L1, SEQ ID NO: 2; CDR-L2, SEQ ID NO: 3 і CDR-L1, SEQ ID NO: 4), амінокислотну послідовність важкого ланцюга (SEQ ID NO: 5), три гіперваріабельні ділянки, що визначають комплементарність амінокислотної послідовності важкого ланцюга (CDR-H1, SEQ ID NO: 6; CDR-H2, SEQ ID NO: 7 і CDR-H3, SEQ ID NO: 8), легколанцюгову нуклеотидну послідовність (SEQ ID NO: 9), важколанцюгову нуклеотидну послідовність (SEQ ID NO: 10), нуклеотидні послідовності трьох гіперваріабельних ділянок легкого ланцюга (CDR-L1, SEQ ID NO: 11; CDR-L2, SEQ ID NO: 12 і CDR-L1, SEQ ID NO: 13), і нуклеотидні послідовності трьох гіперваріабельних ділянок важкого ланцюга (CDR-H1, SEQ ID NO: 14; CDR-H2, SEQ ID NO: 15 і CDR-H3, SEQ ID NO: 16).

Моноклональні антитіла, що є предметом цього винаходу, мають здатність інгібувати фагоцитоз *in vitro* і *in vivo*, блокувати виділення цитокінів і активацію макрофагів *in vitro* і *in vivo*, активацію мікроглій *in vitro* і *in vivo*, запальне руйнування мієлінового шару *in vitro* і *in vivo* і послабляти клінічні симптоми експериментального аутоімунного енцефаломієліту (EAE) у тваринних моделей розсіяного склерозу. Див., наприклад, Міжнародну патентну заявку (подану за процедурою PCT) WO 2007/038407, повністю включену в цей опис винаходу шляхом посилання. Фахівці в цій галузі також розуміють, що моноклональні антитіла, що є предметом цього винаходу, можуть також впливати на рак. Див., наприклад Міжнародну патентну заявку (подану за процедурою PCT) WO 2007/024817, повністю включену в цей опис винаходу шляхом посилання. Крім того, такі моноклональні антитіла могли б використовуватися при лікуванні захворювань, пов'язаних з витоком фібриногену з ушкоджених тканин, включаючи ревматоїдний артрит, ушкодження спинного мозку, хвороба Альцгеймера та інсульт. Див., наприклад, Flick et al., J. Clin. Investigation, 2007, 117, 11: 3224-3235; Akassoglou et al., 2002, Neuron, 33:861-875; Akassoglou et al., 2004, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101: 6698-6703; Adams et al., 2007, J. Exp. Med., 35: 2428-34. Слід відзначити, що моноклональні антитіла, що є предметом цього винаходу, знижують ефекти фібриногену, що сприяють запаленню, в головному мозку та в інших органах пацієнта, зберігаючи при цьому корисний вплив фібриногену на згортання крові, на відміну від сполук, які впливають на утворення згустків крові.

Предметом цього винаходу є також антитіла, що зв'язуються з тими ж епітопами, що й антитіла, представлені в цьому описі винаходу. Фахівці в цій галузі знають, що без зайвого експериментування можна визначити, чи володіють моноклональні антитіла такою ж специфічністю, що й моноклональне антитіло, що є предметом цього винаходу, з'ясувавши, чи запобігає перше зв'язуванню останнього з епітопом  $\gamma^{377-395}$  або епітопом  $\gamma^{190-202}$  домену  $\gamma$ С фібрину. Якщо випробуване моноклональне антитіло конкурує з моноклональним антитілом, що є предметом цього винаходу, про що свідчить зниження зв'язування моноклонального антитіла, що є предметом цього винаходу, то, швидше за все, обидва моноклональних антитіла зв'язуються з тим самим або близько схожим епітопом. Відбір моноклональних антитіл, що є предметом цього винаходу, можна здійснити, вимірюючи їхню здатність блокувати адгезію мікроглій за допомогою рецептора Мас-1 на повномірному поліпептиді фібриногену. Приклади такого відбору представлені в цьому описі винаходу.

Для виробництва поліклональних або моноклональних антитіл проти зв'язування фібриногену з рецептором Мас-1, або проти похідних, фрагментів, аналогів, гомологів або ортологів такого комплексу можуть використовуватися різні процедури, відомі фахівцям. (Див., наприклад, Antibodies: A Laboratory Manual ("Антитіла: лабораторні інструкції") див. вище).

Антитіла очищують добре відомими методами, такими як афінна хроматографія, використовуючи білок А або білок G, що забезпечує, у першу чергу, фракцію імуноглобуліну Ig імунної сироватки. Потім, або в якості альтернативи, специфічний антиген, що є мішенню для

отриманого імуноглобуліну, або його епітоп можуть закріплюватися на колонку для очищення імуноспецифічного антитіла методом імуноафінної хроматографії.

Антитіла, що є предметом цього винаходу (наприклад, антитіла 5B8 і 1E3), являють собою моноклональні антитіла. Моноклональні антитіла, що інгібують зв'язування фібриногену з рецептором Мас-1, створюються, наприклад, клонами, отриманими від тварин, які були імунізовані пептидним антигеном. Лінії клітин виходять злиттям В-клітин імунізованих тварин із клітинами міеломи. Антитіла очищують або *in vitro* від середовища, або від асцити мишей. Способи виробництва антитіл також наведені в розділі "Приклади" цього опису винаходу.

Моноклональні антитіла готують, наприклад, з використанням способів із застосуванням гібридами, таких як описані в: Kohler and Milstein, *Nature*, 256:495 (1975). У типовому способі з використанням гібридами, миша, хом'як або інша підходяща тварина-господар, як правило, імунізується імунізуючим засобом для одержання лімфоцитів, що виробляють або здатні виробляти антитіла, які б специфічно зв'язувалися з імунізуючим засобом. Як альтернатива, лімфоцити можна імунізувати *in vitro*.

Імунізуючий засіб, як правило, включає білковий антиген, його фрагмент або його білок злиття. Як правило, використовуються або лімфоцити периферичної крові, якщо потрібні клітини, що походять від людини, або клітини селезінки чи лімфатичних вузлів, якщо потрібні лімфоцити від інших ссавців. Потім лімфоцити зливаються з іморталізованою лінією клітин за допомогою підходящого засобу для злиття клітин, такого як поліетиленгліколь, з утворенням клітин лімфоми (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* ("Моноклональні антитіла: принципи і практика"), Academic Press, (1986) стор. 59-103). Іморталізованими лініями клітин, як правило, є трансформовані клітини ссавців, зокрема, клітини міеломи гризунів, великої рогатої худоби, і похідні від людини. Як правило, використовуються лінії клітин міеломи пацюка чи миші. Клітини гібридами можуть вирощуватися в підходящому живильному середовищі, яке бажано містить одне або кілька речовин, які інгібують ріст або виживання іморталізованих клітин, що не злилися. Наприклад, якщо в батьківських клітинах немає або недостатньо ферменту гіпоксантин-гуанін-фосфорибозилтрансферази (HGPRT або HPRT), живильне для гібридом середовище, як правило, містить гіпоксантин, аміноптерин і тимідин ("середовище ГАТ") - речовини, що запобігають росту клітин з дефіцитом гіпоксантин-гуанін-фосфорибозилтрансферази.

Кращими іморталізованими лініями клітин є лінії клітин, які ефективно зливаються, підтримують стабільно високий рівень експресії антитіла відібраними клітинами, що виробляють антитіла, і є чутливими до таких живильних середовищ, як ГАТ. Ще кращими іморталізованими лініями клітин є лінії мишачої міеломи, які можна одержати, наприклад, у Центрі розподілу клітин Інституту Солка, Сан-Дієго, Каліфорнія (Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif) і в Американській колекції типових культур, Манасса, Вірджинія (American Type Culture Collection, Manassas, Va). Були описані також клітини міеломи людини і гетероміеломи миші і людини як лінії клітин для одержання моноклональних антитіл. (Див. Kozbor, J. *Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications* (Методи одержання моноклональних антитіл та їхнє використання), Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) стор. 51-63)).

Живильне середовище, в якому культивуються клітини гібридами, може потім випробуватися на наявність моноклональних антитіл проти певного антигену. Переважно визначається специфічність зв'язування моноклональних антитіл, вироблених клітинами гібридами, за допомогою імунопреципітації або визначенням зв'язування *in vitro*, наприклад, радіоімунологічним аналізом (RIA) або твердофазним імуноферментним аналізом (ELISA). Такі методики і види аналізу відомі фахівцям. Зв'язувальну здатність моноклонального антитіла можна, наприклад, визначити методом Скетчарда, описаним в Munson and Pollard, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980); Patrono, C. and Peskar, B.A. (eds) *Radioimmunoassay in Basic and Clinical Pharmacology* ("Радіоімуноаналіз у фундаментальній і клінічній фармакології"). Heidelberg, Springer-Verlag, 1987; Dwenger, A. *Radioimmunoassay: An Overview*. ("Радіоімуноаналіз: огляд") *J Clin Biochem* 22:883, 1984. \*Крім того, при терапевтичному використанні моноклональних антитіл важливо визначити антитіла, що володіють високим ступенем специфічності і високою спорідненістю зв'язування з антигеном-мішенню.

Після ідентифікації необхідних клітин гібридами клони можна субклонувати методом серійних розведень і вирощувати стандартними методами. (Див. Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* ("Моноклональні антитіла: принципи і практика"), Academic Press, (1986) стор.59-103)). Підходящі для цих цілей живильні середовища включають, наприклад, модифіковане способом Дульбекко середовище Голка і середовище RPMI-1640. Як альтернатива, клітини гібридами можна вирощувати *in vivo* в асцитах ссавців.

Моноклональні антитіла, що виділяються субклонами, можна відокремити або очистити від живильного середовища або рідини асциту традиційними методами очищення імуноглобуліну, такими як, наприклад, метод з використанням білка А - сефарози, хроматографія на гідроксилапатиті, електрофорез у гелі, діаліз або афінна хроматографія.

Моноклональні антитіла можна також одержувати методами рекомбінантної ДНК, такими як описані в Патенті США № 4 816 567. ДНК, що кодує моноклональні антитіла, що є предметом цього винаходу, можна легко виділити і визначити її послідовність традиційними методами (наприклад, використовуючи олігонуклеотиди, здатні специфічно зв'язуватися з геном, що кодує важкі і легкі ланцюги мишачих антитіл). Наприклад, послідовності SEQ ID NO: 9 і № 10 являють собою нуклеотидні послідовності для моноклонального антитіла 5B8, що є предметом цього винаходу. Клітини гібридами за цим винаходом служать кращим джерелом такої ДНК. Після виділення ДНК її можна помістити в експресійні вектори, якими потім трансфектують клітини господаря, такі як клітини COS мавпи, клітини яєчника китайського хом'яка або клітини міеломи, які в іншому випадку не виробляють білок імуноглобулін, для досягнення синтезу моноклональних антитіл у рекомбінантних клітинах господаря. ДНК можна також модифікувати, наприклад, заміщаючи кодувальну послідовність важким і легким ланцюгом константного домену людини замість гомологічної мишачої послідовності (див. Патент США № 4 816 567; Morrison, Nature 368, 812-13 (1994)), і ковалентно приєднуючи до послідовності, що кодує імуноглобулін, або до частини кодувальної послідовності для неімуноглобулінового поліпептиду. Такий неімуноглобуліновий поліпептид можна замінити на константні домени антитіла, що є предметом цього винаходу, або на варіабельні домени одного антигензв'язуючого центра антитіла, що є предметом цього винаходу, для створення химерного бівалентного антитіла.

Повністю людськими антитілами є молекули антитіл, у яких всі послідовності як легкого ланцюга, так і важкого ланцюга, включаючи гіперваріабельні ділянки, що визначають комплементарність, отримані з генів людини. Такі антитіла називаються в цьому описі винаходу "людськими антитілами" або "повністю людськими антитілами". Моноклональні антитіла можна одержати, використовуючи методику тріомі; методику гібридами В-клітин людини (див. Kozbor, et al., 1983 Immunol Today 4:72); і методику гібридами вірусу Епштейна-Барр для одержання моноклональних антитіл (див. Cole, et al., 1985 In: Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy ("Моноклональні антитіла і терапія раку"), Alan R. Liss, Inc., стор. 77-96). Моноклональні антитіла можуть використовуватися і можуть одержуватися з використанням гібридом людини (див. Cote, et al., 1983. Proc Natl Acad Sci USA 80: 2026-2030) або трансформацією В-клітин людини вірусом Епштейна-Барр in vitro (див. Cole, et al., 1985 In: Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy ("Моноклональні антитіла і терапія раку"), Alan R. Liss, Inc., стор. 77-96).

Крім того, людські антитіла можна також одержати, використовуючи додаткові методики, включаючи бібліотеки фагового відображення (див. Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581 (1991)). Аналогічним чином, антитіла людини можна одержати, вводячи локуси імуноглобуліну людини трансгенним тваринам, наприклад, мишам, у яких гени ендogenous імуноглобуліну були частково або повністю дезактивовані. Після пробного введення антигену спостерігається утворення антитіл людини, що у всіх відношеннях, включаючи генне перегрупування, складання і спектр антитіл, сильно нагадує утворення таких антитіл у людини. Цей підхід описаний, наприклад, у Патентах США №№ 5 545 807; 5 545 806; 5 569 825; 5 625 126; 5 633 425; 5 661 016, і в: Marks et al., Bio/Technology, 779-783 (1992); Lonberg et al., Nature 368 856-859 (1994); Morrison, Nature 368, 812-13 (1994); Fishwild et al, Nature Biotechnology 14, 845-51 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14, 826 (1996); і Lonberg and Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13 65-93 (1995).

Антитіла людини можна також одержувати, використовуючи трансгенних тварин (не людину), модифікованих таким чином, щоб вони виробляли повністю людські антитіла, а не ендogenous антитіла тварин, у відповідь на пробне введення антигену. У таких тварин дезактивують ендogenous гени, що кодують важкі і легкі ланцюги імуноглобулінів в організмі господаря, і в геном господаря вводять активні локуси, що кодують важкі і легкі ланцюги імуноглобулінів людини. Наприклад, SEQ ID №№ 11-16 забезпечують послідовність нуклеотидів, що кодує всі три легкі ланцюги і три важкі ланцюги гіперваріабельних ділянок моноклонального антитіла 5B8. Гени людини вводять, наприклад, за допомогою штучних хромосом дріжджів, що містять необхідні сегменти ДНК людини. Тварину, що забезпечує всі шукані модифікації, потім одержують у вигляді потомства від кросбридінгу проміжних трансгенних тварин, що містять неповний набір модифікацій. Прикладом таких тварин служить миша під назвою "Ксеномиша" (Xenomouse<sup>®</sup>), надана компанією Amgen (Thousand Oaks, Каліфорнія). Ця тварина виробляє В-клітини, які виділяють повністю людські імуноглобуліни.

Антитіла можна одержувати безпосередньо з тварини після її імунізації цільовим імуногеном, таким як, наприклад, препарат поліклонального антитіла, або, як альтернатива, від іморталізованих В-клітин, отриманих від тварини, таких як гібридоми, що виробляють моноклональні антитіла. Крім того, гени, що кодують імуноглобуліни з варіабельними ділянками людини, можна виділити і можна забезпечити їхню експресію для безпосереднього одержання антитіл, або можна модифікувати такі гени додатково для одержання аналогів антитіл, таких як, наприклад, одноланцюгові молекули Fv (scFv).

Приклад способу одержання тваринного господаря, наприклад, миші, у якого відбувається недостатня експресія ендogenous важкого ланцюга імуноглобуліну, представлений у Патенті США № 5 939 598. Така тварина-господар може бути отримана видаленням сегмента J генів, принаймні, з одного локусу ендogenous важкого ланцюга в стовбурній клітині ембріона для запобігання перегрупованню локусу і запобігання утворенню транскрипту перегрупованого локусу важкого ланцюга імуноглобуліну, причому таке видалення здійснюється за допомогою спрямованого вектора, який містить ген, що кодує селектовуваний маркер; і одержанням зі стовбурної клітини ембріона трансгенної миші, соматичні і статеві клітини якої містять ген, що кодує селектовуваний маркер.

Один спосіб одержання цільового антитіла, такого як людське антитіло, описаний у Патенті США № 5 916 771. Цей метод включає введення експресійного вектора, який містить нуклеотидну послідовність, що кодує важкий ланцюг (наприклад, SEQ ID NO: 10), у клітину ссавця господаря, що знаходиться в культурі клітин, введення експресійного вектора, який містить нуклеотидну послідовність, що кодує легкий ланцюг (наприклад, SEQ ID NO: 9), в іншу клітину ссавця господаря, і злиття таких двох клітин з утворенням гібридної клітини. Гібридна клітина може виробляти антитіло, що містить важкий ланцюг і легкий ланцюг.

Антитіло може вироблятися вектором, що містить сегмент ДНК, що кодує одноланцюгове антитіло, описане вище.

Вони можуть включати вектори, ліпосоми, депротейнізовану ДНК, ДНК з ад'ювантом, генну гармату і катетери. Кращі вектори включають вірусні вектори, білки злиття і хімічні кон'югати. Ретровірусні вектори включають вірус мишачого лейкозу Молоні. Кращими є вірусні ДНК-вектори. Такі вектори включають вектори віспи, такі як вектори вірусу ортопокс або авіпокс, вектори вірусу герпесу, такі як вектор простого вірусу герпесу I (див. Geller, A. I. et al., J. Neurochem, 64:487 (1995); Lim, F., et al., in DNA Cloning: Mammalian Systems, D. Glover, Ed. (Oxford Univ. Press, Oxford England) (1995); Geller, A. I. et al., Proc Natl. Acad. Sci.: U.S.A. 90:7603 (1993); Geller, A. I., et al., Proc Natl. Acad. Sci USA 87:1149 (1990), вектори аденовірусів (див. LeGal LaSalle et al., Science, 259:988 (1993); Davidson, et al., Nat. Genet 3:219 (1993); Yang, et al., J. Virol. 69:2004 (1995) і вектори аденоасоційованих вірусів (див. Kaplitt, M. G. et al., Nat. 25 Genet. 8:148 (1994)).

Вектори вірусу віспи вводять ген у цитоплазму клітини. Вірус пташиної віспи (авіпокс) приводить лише до короткочасної експресії нуклеїнової кислоти. Аденовірусні вектори, аденоасоційовані вірусні вектори і вектори вірусу простого герпесу є кращими для введення нуклеїнової кислоти в нервові клітини. Аденовірусний вектор приводить до менш тривалої експресії (приблизно, протягом 2 місяців), ніж вектор аденоасоційованого вірусу (експресія нуклеїнової кислоти приблизно протягом 4 місяців), що, у свою чергу, приводить до менш тривалої експресії, ніж вектор простого герпесу. Конкретний обраний вектор залежить від клітини-мішені і стану, що підлягає лікуванню. Введення нуклеїнової кислоти може здійснюватися стандартними методами, наприклад, шляхом інфекції, трансфекції, трансдукції або трансформації. Приклади режимів передачі гена включають, наприклад, використання депротейнізованої ДНК,  $\text{CaPO}_4$ , преципітації, ДЕАЕ-декстрану, електропорації, злиття протопластів, ліпофекції, клітинної мікроін'єкції і вірусних векторів.

Вектор може використовуватися для впливу практично на будь-яку цільову клітину. Наприклад, стереотаксична ін'єкція може використовуватися для спрямування векторів (наприклад, аденовірусів або вірусу простого герпесу) у бажане положення. Крім того, частинки можуть доставлятися за допомогою інтрацеребровентрикулярної інфузії з використанням інфузійної системи з мікронасосом, такий як інфузійна система SynchroMed Infusion System (Medtronic, Миннеаполіс, MN). Інші способи, які можуть використовуватися, включають використання катетерів, внутрішньовенної, парентеральної, внутрішньоочеревної або підшкірної ін'єкції, орального або іншого відомого способу введення.

Ці вектори можуть використовуватися для експресії більших кількостей антитіл, які можуть використовуватися різними способами. Наприклад, антитіла можуть використовуватися для виявлення наявності фібриногену і зв'язування фібриногену з рецептором Мас-1.

Методики можуть адаптуватися для одержання одноланцюгових антитіл, специфічних до



антигенного білка за цим винаходом (див., наприклад, Патент США № 4 946 778). Крім того, методики можуть адаптуватися для конструкції експресійних бібліотек фрагментів  $F_{ab}$  (див., наприклад, Huse, et al., 1989 Science 246: 1275-1281) для забезпечення швидкої і ефективної ідентифікації фрагментів  $F_{ab}$  моноклональних антитіл з заданою специфічністю до білка або його похідних, фрагментів, аналогів чи гомологів. Фрагменти антитіл, що містять ідіотипи білка антигену, можуть бути отримані способами, відомими фахівцям, включаючи, серед іншого такі способи: (i) фрагмент  $F_{(ab)2}$  одержують ферментацією молекули антитіла пепсином; (ii) фрагмент  $F_{ab}$  одержують відновленням дисульфідних містків фрагмента  $F_{(ab)2}$ ; (iii) фрагмент  $F_{ab}$  одержують обробкою молекули антитіла папаїном і відновником; і (iv) одержання варіабельних фрагментів  $F_v$ . Цей винахід також включає фрагменти  $F_v$ ,  $F_{ab}$ ,  $F_{ab'}$  і  $F_{(ab)2}$ , антифібринові фрагменти  $\gamma^{190-202}$  і  $\gamma^{377-395}$ , одноланцюгові антифібринові антитіла до епітопів  $\gamma^{190-202}$  і  $\gamma^{377-395}$ , біспецифічні антифібринові антитіла до епітопів  $\gamma^{190-202}$  і  $\gamma^{377-395}$ , і гетерокон'югати антифібринових антитіл до епітопів  $\gamma^{190-202}$  і  $\gamma^{377-395}$ .

Біспецифічні антитіла – це антитіла, що володіють специфічністю зв'язування, принаймні, двох різних антигенів. У представленому випадку одним об'єктом специфічного зв'язування служать епітопи  $\gamma^{190-202}$  і  $\gamma^{377-395}$  фібрину. Іншим об'єктом специфічного зв'язування служить будь-який інший антиген, переважно, білок на поверхні клітини або рецептор, або субодинаця рецептора.

Способи одержання біспецифічних антитіл відомі фахівцям у цій галузі. Традиційно, рекомбінантне одержання біспецифічних антитіл базується на спільній експресії двох пар важкий ланцюг/легкий ланцюг імуноглобуліну, причому два важкі ланцюги мають різну специфічність (Milstein and Cuello, Nature, 305: 537-539 (1983)). Через випадкову розбіжність важких і легких ланцюгів імуноглобуліну такі гібридами (квадрами) виробляють можливу суміш десяти різних молекул антитіл, з яких тільки одна володіє належною біспецифічною структурою. Очищення підходящої молекули, як правило, здійснюється методом афінної хроматографії.

Варіабельні домени антитіл з цільовою специфічністю зв'язування (сайти зв'язування антитіло - антиген) можуть зливатися з послідовностями константних доменів імуноглобулінів. Краще, коли злиття здійснюється з важколанцюговим константним доменом імуноглобуліну, що містить, принаймні, частину шарнірної галузі, і важколанцюгові константні ділянки CH2 і CH3. Краще також мати першу важколанцюгову константну ділянку (CH1), що містить сайт, необхідний для зв'язування легкого ланцюга, хоча б в одному з продуктів злиття. Молекули ДНК, що кодують злиття важких ланцюгів імуноглобуліну, і, за бажанням, легкий ланцюг імуноглобуліну, вводять в окремі експресійні вектори і паралельно трансфектують у підходящий організм господаря. Більш докладне одержання біспецифічних антитіл описано, наприклад, в Suresh et al., Methods in Enzymology ("Методи ензимології"), 121:210 (1986).

Біспецифічні антитіла можна одержувати як повномірні антитіла або фрагменти антитіл (наприклад, фрагменти  $F_{(ab)2}$  біспецифічних антитіл). Методики одержання біспецифічних антитіл з фрагментів антитіл описані в літературі. Наприклад, біспецифічні антитіла можна одержати, використовуючи хімічне зв'язування. У статті Brennan et al., Science 229:81 (1985) описана процедура, за допомогою якої інтактні антитіла протеолітично розщеплюють з утворенням фрагментів  $F_{(ab)2}$ . Такі фрагменти відновлюють у присутності арсеніду натрію, який утворює комплекс з дитіолом, для стабілізації вицинальних дитіолів і запобігання утворенню міжмолекулярних дисульфідних містків. Утворені фрагменти  $F_{ab}$  потім перетворюються в похідні тіонітробензоата (ТНБ). Одне з похідних  $F_{ab}$ -ТНБ потім знову перетворюється в  $F_{ab}$ -тіол відновленням меркаптоетиламіном і змішується з еквімолярною кількістю іншого похідного  $F_{ab}$ -ТНБ з утворенням біспецифічного антитіла. Отримані біспецифічні антитіла можуть використовуватися як засоби для селективної іммобілізації ферментів.

Крім того, фрагменти  $F_{ab}$  можуть безпосередньо виділятися з *E. coli* і хімічно сполучатися з утворенням біспецифічних антитіл. У статті Shalaby et al., J. Exp. Med. 175:217-225 (1992) описується одержання повністю гуманізованого біспецифічного антитіла  $F_{(ab)2}$ .

Були також описані різні методики одержання і виділення фрагментів біспецифічних антитіл безпосередньо з культури рекомбінантних клітин. Наприклад, біспецифічні антитіла одержують з використанням лейцинової "блискавки". Kostelny et al., J. Immunol. 148(5): 1547-1553 (1992). Цей спосіб також можна використовувати для одержання гомодимерів антитіл. Технологія "діатіл", описана Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993), являє собою альтернативний механізм одержання фрагментів біспецифічних антитіл. Такі фрагменти містять важколанцюговий варіабельний домен ( $V_H$ ), з'єднаний з легколанцюговим варіабельним доменом ( $V_L$ ) занадто короткою ланкою, що не дозволяє утворюватися парам обох доменів на одному і тому ж ланцюзі. Відповідно, домени  $V_H$  і  $V_L$  одного фрагмента змушені утворювати пари з комплементарними доменами  $V_L$  і  $V_H$  іншого фрагмента, таким чином, утворюючи два

антигензв'язуючих сайти. Була представлена також інша стратегія одержання фрагментів біспецифічних антитіл з використанням одноланцюгових димерів sFv: див. Gruber et al., J. Immunol. 152:5368 (1994).

Передбачені також антитіла з більш ніж двома антигенними детермінантами. Наприклад, можна одержати триспецифічні антитіла: Tutt et al., J. Immunol. 147:60 (1991).

Цей винахід також має відношення до імунокон'югат, що містять антитіло, сполучене з цитотоксичним засобом, таким як токсин (наприклад, хіміотерапевтичний засіб, який впливає на ракові клітини, токсин з ферментною активністю бактеріального, грибового, рослинного або тваринного походження, або їхні фрагменти), або радіоактивний ізотоп (наприклад, радіокон'югат). Приклади хіміотерапевтичних засобів включають алкілюючі засоби, нітрозосечовину, антиметаболіти, антрацикліни і родинні ліки, інгібітори топоізомераз, інгібітори мітозу, кортикостероїдні гормони та інші хіміотерапевтичні ліки.

Токсини з ферментною активністю та їхні фрагменти, які можна використовувати для реалізації цього винаходу, включають ланцюг А дифтерії, незв'язувальні активні фрагменти дифтерійного токсину, ланцюг А *Pseudomonas* (з *Pseudomonas aeruginosa*), ланцюг А рицини, ланцюг А абрину, ланцюг А модецину, альфа-сарцин, білки *Aleurites fordii*, білки лаконосу, білки лаконосу американського (PAPI, PAP-S, і PAP-S), інгібітор китайського гіркого гарбуза (*Momordica charantia*), курцин, кротин, інгібітор мильнянки лікарської (*Saponaria officinalis*), гелонін, мітогеллін, рестрикціон, феноміцин, еноміцин та трихотетин. Для одержання радіоспряжених антитіл можуть використовуватися різні радіонукліди. Приклади таких радіонуклідів включають:  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{131}\text{In}$ ,  $^{90}\text{Y}$  і  $^{186}\text{Re}$ .

Кон'югати антитіла і цитотоксичного засобу одержують, використовуючи різні біфункціональні засоби білкового сполучення, такі як N-сукцинимідил-3-(2-піридилдитіол)пропіонат (SPDP), імінотиолан (IT), біфункціональні похідні імідоєфірів (таких як диметиладипимідат HCL), активні складні ефіри (такі як дисукцинимідил суберат), альдегіди (такі як глутаральдегід), біс-азидосполуки (такі як (п-азидобензол)гександіамін), похідні біс-діазонію (такі як біс-(п-діазонійбензоїл)-етилендіамін), діізоціанати (такі як толуол-2,6-діізоціанат), і біс-активні фторвмісні сполуки (такі як 1,5-дифтор-2, 4-динітробензол). Наприклад, рициновий імунотоксин можна одержати так, як описано в: Vitetta et al., Science 238: 1098 (1987). Прикладом хелатуючого засобу для кон'югації радіонуклідів з антитілом служить мічена ізотопом  $^{14}\text{C}$  ізотиоціанатобензил-3-метилдиетилентриамін пентаоцтова кислота (MX-DTPA).

Фахівці в цій галузі виявляють, що в сполученні з антитілами, що є предметом цього винаходу, може брати участь велике розмаїття часток. (Див., наприклад, "Conjugate Vaccines" ("Кон'юговані вакцини"), Contributions to Microbiology and Immunology, J. M. Cruse and R. E. Lewis, Jr (eds), Carger Press, New York, (1989), повністю включену в цей опис винаходу шляхом посилання).

Сполучення можна здійснити за допомогою будь-якої хімічної реакції, що приводить до зв'язування двох молекул, при якому антитіло та інша частка зберігають свою активність. Такий зв'язок може включати багато хімічних механізмів, наприклад, ковалентне зв'язування, афінне зв'язування, інтеркаляцію, координаційний зв'язок і комплексоутворення. Кращим видом зв'язку, однак, є ковалентний зв'язок. Ковалентне зв'язування досягається або прямою конденсацією існуючих бічних ланцюгів, або включенням зовнішніх місткових молекул. Багато які бівалентні або полівалентні сполучні засоби можуть використовуватися для сполучення білкових молекул, таких як антитіла, що є предметом цього винаходу, з іншими молекулами. Наприклад, характерні засоби сполучення можуть включати органічні сполуки, такі як тіоефіри, карбодііміди, сукцинимідні ефіри, діізоціанати, глутаральдегід, діазобензоли і гексаметилендіаміни. Цей список не є вичерпним списком різних класів засобів сполучення, відомих фахівцям, а являє собою приклад найпоширеніших засобів сполучення. (Див. See Killen and Lindstrom, Jour. Immun. 133: 1335-2549 (1984); Jansen et al., Immunological Reviews 62: 185-216 (1982); and Vitetta et al., Science 238:1098 (1987)).

Лінкери описані в літературі. (Див., наприклад, Ramakrishnan, S. et al., Cancer Res. 44: 201-208 (1984), у якій описується використання MBS (М-малеїмідобензоїл-N-гідроксисукцинимідний ефір). Див. також Патент США № 5 030 719, у якому описується використання похідних галогенованого ацетилгідрозиду, сполученого з антитілом за допомогою олігопептидного лінкера. Приклади лінкерів включають: (i) EDC (1-етил-3-(3-диметиламінопропіл) карбодііміду гідрохлорид; (ii) SMPT (4-сукцинимідилоксикарбоніл-альфа-метил-альфа-(2-піридилдитіо)-толуол (Pierce Chem. Co., номер за каталогом: 21558G); (iii) SPDP (сукцинимідил-6[3-3-(2-піридилдитіо)пропіонамід]гексаноат (Pierce Chem. Co., номер за каталогом: 21651G); (iv) Sulfo-LC-SPDP (сульфосукцинимідил 6[3-3-(2-піридилдитіо)-пропіонамід]гексаноат (Pierce Chem. Co., номер за каталогом: 2165-G); і (v) сульфо-NHS (N-гідроксисульфосукцинимід: Pierce Chem. Co.,

номер за каталогом: 24510), сполучений з EDC.

Описані вище лінкери містять компоненти, що володіють різними властивостями, таким чином, приводячи до утворення кон'югатів з відмінними фізико-хімічними властивостями. Наприклад, складні ефіри N-гідроксисульфосукциніміду і алкілкарбоксилатів є більше стійкими, ніж складні ефіри N-гідроксисульфосукциніміду і ароматичних карбоксилатів. Ефіри N-гідроксисукуциніміду, що містять лінкери, менш розчинні, ніж ефіри N-гідроксисульфосукциніміду. Крім того, лінкер SMPT містить стерично ускладнений дисульфідний зв'язок і може утворювати кон'югати з підвищенням стабільності. Дисульфідні місткові зв'язки, як правило, є менш стійкими, ніж інші місткові зв'язки, тому що дисульфідний зв'язок розщеплюється *in vitro*, зменшуючи кількість наявного кон'югата. Зокрема, N-гідроксисукуцинімід може збільшити стійкість карбодіімідної сполуки. Речовини з карбодіімідними зв'язками (такі як EDC), використовувані разом з N-гідроксисукуцинімідом, утворюють складні ефіри, більш стійкі до гідролізу, ніж речовини лише з карбодіімідними зв'язками.

Представлені в цьому описі винаходу антитіла можуть також входити до складу імуноліпосом. Ліпосоми, що містять антитіло, одержують способами, відомими фахівцям, такими як описані в: Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); і патенти США № 4 485 045 і 4 544 545. Ліпосоми зі збільшеним часом перебування в кровообігу, описані в Патенті США № 5 013 556.

Особливо корисні ліпосоми можна одержати методом обернено-фазового випарювання ліпідної композиції, що містить фосфатидилхолін, холестерин і фосфатидилетаноламін, що утворює похідний ПЕГ (ПЕГ-ПЕ). Ліпосоми продавляють крізь фільтри з відомим діаметром пор для одержання ліпосом заданого діаметра. Фрагменти F<sub>ab</sub> антитіла, що є предметом цього винаходу, можна кон'югувати з ліпосомами так, як описано в Martin et al., J. Biol. Chem., 257: 286-288 (1982), за допомогою реакції дисульфідної перестановки.

Використання антитіл проти епітопів  $\gamma^{190-202}$  і  $\gamma^{377-395}$  фібрину.

Терапевтично препарати, що є предметом цього винаходу, які містять моноклональне антитіло, що є предметом цього винаходу, використовуються для лікування або ослаблення симптомів захворювань, пов'язаних з фібрином (наприклад, розсіяного склерозу, загоєння ран, легеневої ішемії, ушкодження спинного мозку, хвороби Альцгеймера, інсульту, ревматоїдного артриту і раку), переважно, не впливаючи при цьому на згортання крові. Цей винахід також пропонує способи лікування або ослаблення симптомів захворювань, пов'язаних з фібрином (наприклад, розсіяного склерозу, загоєння ран, легеневої ішемії, ушкодження спинного мозку, хвороби Альцгеймера, інсульту, ревматоїдного артриту і раку), переважно, не впливаючи при цьому на згортання крові. Терапевтичний режим здійснюється після визначення суб'єкта, наприклад, пацієнта (людини), що страждає на (або має ризик розвитку) захворювання, пов'язане з фібрином (наприклад, розсіяного склерозу, загоєння ран, легеневої ішемії, ушкодження спинного мозку, хвороби Альцгеймера, інсульту, ревматоїдного артриту і раку), використовуючи стандартні способи. Симптоми таких пов'язаних з фібрином захворювань включають, наприклад, запалення, біль і втрату почуттєвого сприйняття. Ефективність лікування визначається у зв'язку з будь-якими відомими способами діагностики або лікування конкретних захворювань, пов'язаних з фібрином. Ослаблення одного або декількох симптомів захворювань, пов'язаних з фібрином, вказує на те, що антитіло має корисний клінічний ефект. Препарат антитіла, а краще, якщо антитіла, що володіє високою специфічністю і високою спорідненістю до антигену-мішені, вводиться пацієнту і, як правило, проявляє ефект завдяки своєму зв'язуванню з мішенню. Введення антитіла може знищити або пригнітити сигнальну функцію мішені, або перешкодити їй (наприклад, епітопів  $\gamma^{190-202}$  і  $\gamma^{377-395}$  фібрину). Введення антитіла може знищити або пригнітити, або перешкодити зв'язуванню антигену-мішені (наприклад, фібрину) з ендogenous лінгандом (наприклад, рецептором Мас-1), з яким такий антиген зв'язується в природних умовах. Наприклад, антитіло зв'язується з мішенню і інгібує зв'язування фібрину з рецептором Мас-1.

Слід розуміти, що введення терапевтичних засобів відповідно до цього винаходу здійснюється разом з підходящими носіями, допоміжними речовинами та іншими засобами, що входять до складу препаратів для забезпечення поліпшеного переносу, доставки, стерпності тощо. Велику кількість підходящих лікарських форм можна знайти у формулярі Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed, Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1995)), особливо в його Главі 87, складеній Blaug, Seymour. Такі лікарські форми включають, наприклад, порошки, пасти, мазі, желе, віск, олії, ліпіди, середовища, що містять ліпіди (катіонні або аніонні) (такі як ліпофектин<sup>TM</sup>), ДНК-кон'югати, безводні поглинаючі пасти, емульсії типу "олія у воді" і "вода в олії", емульсії карбоваксу (поліетиленгліколів різної молекулярної ваги), напіврідкі гелі і напіврідкі суміші, що містять карбовакс. Будь-які з зазначених вище сумішей можуть підходити

для використання в способах лікування і терапії відповідно до цього винаходу за умови, що активний інгредієнт сполуки не дезактивується іншими інгредієнтами і такий склад фізіологічно сумісний і переноситься при використанні певного способу введення. Додаткову інформацію про лікарські форми, допоміжні речовини і носії, добре відомі фахівцям у фармацевтичній хімії, можна знайти також в: Baldrick P. "Pharmaceutical excipient development: the need for preclinical guidance." ("Розробка фармацевтичних допоміжних речовин: необхідність у доклінічному керівництві") Regul. Toxicol Pharmacol. 32(2): 210-8 (2000), Wang W. "Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals." ("ліофілізація і розробка твердих білкових фармацевтичних препаратів") Int. J. Pharm. 203(1-2): 1-60 (2000), Charman W N "Lipids, lipophilic drugs, and oral drug delivery-some emerging concepts." ("Ліпіди, ліпофільні ліки, і оральна доставка ліків – деякі нові ідеї") J Pharm Sci. 89(8): 967-78 (2000), Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" ("Каталог допоміжних речовин для парентеральних препаратів") PDA J Pharm Sci Technol. 52: 238-311 (1998) і в наведених в них посиланнях на спеціальну літературу.

Антитіла, що є предметом цього винаходу (які також в цьому описі винаходу називаються "активні речовини"), та їхні похідні, фрагменти, аналоги і гомологи можуть входити до складу фармацевтичних композицій, які можуть містити фармацевтично прийнятний носій. Використовуваний у цьому описі винаходу термін "фармацевтично прийнятний носій" включає будь-які і всі розчинники, середовища для диспергування, покриття, антибактеріальні і протигрибкові засоби, ізотонічні засоби і засоби, що сповільнюють всмоктування, і т.п., сумісні з фармацевтичним введенням. Підходящі носії описані в останньому виданні Remington's Pharmaceutical Sciences, стандартному довіднику, використовуваному в цій галузі, що включений у цей опис винаходу шляхом посилання. Кращі приклади таких носіїв або розріджувачів включають, серед іншого, воду, розчин солі, розчин Рінгера, розчин декстрази і 5 % розчин сироваткового альбуміну людини. Можуть також використовуватися ліпосоми і неводні середовища, такі як жирна олія. Використання таких середовищ і засобів з фармацевтичними активними речовинами добре відомо в цій галузі. За винятком випадків, коли традиційні середовища або засоби несумісні з активною сполукою, передбачене використання таких середовищ і засобів у фармацевтичних композиціях. У композиції також можна включати додаткові активні сполуки.

Склад фармацевтичної композиції за цим винаходом підібраний так, щоб відповідати передбачуваному шляху введення композиції. Приклади шляхів введення включають парентеральне введення, наприклад, внутрішньовенне, внутрішньошкірне, підшкірне, оральне (наприклад, інгаляція), кризьшкірне (наприклад, зовнішнє), через слизову оболонку і ректальне введення. Розчини або суспензії, використовувані для парентерального, внутрішньошкірного або підшкірного введення, можуть містити такі компоненти: стерильний розріджувач, такий як вода для ін'єкцій, ізотонічний розчин солі, жирні олії, поліетиленгліколі, гліцерин, пропіленгліколь або інші синтетичні розчинники; антибактеріальні засоби, такі як бензиловий спирт або метилпарабени; антиоксиданти, такі як аскорбінова кислота або натрію бісульфіт; хелатуючі агенти, такі як етилендіамінтетраоцтова кислота (ЕДТА); буферні розчини, такі як ацетати, цитрати або фосфати, і засоби регулювання тоничності, такі як соляна кислота або натрію гідроксид. Парентеральні препарати можуть вміщуватися в ампули, одноразові шприци або флакони з декількома дозами, виготовлені зі скла або пластмаси.

Фармацевтичні композиції, що підходять для ін'єкцій, включають стерильні водяні розчини (якщо композиція розчинна у воді) або дисперсії і стерильні порошки для приготування стерильних ін'єкційних розчинів чи дисперсій безпосередньо перед введенням. Для внутрішньовенного введення підходящими носіями є фізіологічний розчин солі, бактеріостатична вода, кремофор EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) або фізіологічний розчин з фосфатним буфером. У всіх випадках композиція може бути стерильною і повинна бути рідкою, щоб її можна було вводити за допомогою шприца. Вона може бути стійкою в умовах виготовлення і зберігання та повинна бути захищена від забруднення мікроорганізмами, такими як бактерії і гриби. Носієм може бути розчинник або середовище для диспергування, що містить, наприклад, воду, етанол, поліол (наприклад, гліцерин, пропіленгліколь і рідкий поліетиленгліколь і т.п.) і підходящу суміш зазначених речовин. Підходящу плинність / сипкість можна забезпечити, наприклад, використовуючи покриття, такі як лецитин, забезпечуючи необхідний розмір часток у випадку дисперсій, і використовуючи поверхово активні речовини. Дії мікроорганізмів можна запобігти за допомогою різних антибактеріальних і протигрибкових засобів, наприклад, парабенів, хлорбутанолу, фенолу, аскорбінової кислоти, тимеросалу тощо. У багатьох випадках бажано включати до складу композиції ізотонічні засоби, наприклад, цукри, багатоатомні спирти, такі як манніт, сорбіт, натрію хлорид. Тривале всмоктування ін'єкційних

композицій можна забезпечити, включивши до складу композиції засіб, що сповільнює всмоктування, наприклад, алюмінію моностеарат і желатин.

Стерильні ін'єкційні розчини можна приготувати введенням активної сполуки в необхідній кількості в підходящий розчинник разом з одним або декількома інгредієнтами, перерахованими вище, за необхідності, з наступною стерилізацією. Як правило, дисперсії готують введенням активної сполуки в стерильний розчин, що містить основне середовище для диспергування та інші необхідні інгредієнти з перерахованих вище. У випадку стерильних порошків для приготування стерильних ін'єкційних розчинів, використовуються такі способи готування як вакуумне сушіння і ліофілізація для одержання порошку активного інгредієнта, плюс будь-які додаткові необхідні інгредієнти у вигляді їх попередньо стерильно відфільтрованих розчинів.

Оральні композиції, як правило, включають інертний розріджувач або їстівний носій. Вони можуть міститися в желатинові капсули або пресуватися в таблетки. Для орального терапевтичного введення активна сполука може включатися в допоміжні речовини і використовуватися у формі таблеток, пастилок або капсул. Оральні композиції також можна приготувати з використанням рідкого носія для використання у вигляді засобу для полоскання рота, у якому сполука в рідкому носії вводиться в ротову порожнину для її полоскання і випльовується чи проковтується. Фармацевтично сумісні сполучні засоби та/або ад'юванти також можуть входити до складу фармацевтичної композиції. Таблетки, пігулки, капсули, пастилки і т.п. можуть містити кожний з наступних інгредієнтів або сполук аналогічної природи: зв'язувальна речовина, така як мікрокристалічна целюлоза, трагакантова камедь або желатин; допоміжна речовина, така як крохмаль або лактоза, засіб, що сприяє руйнуванню, такий як альгінова кислота, примогель або кукурудзяний крохмаль; змашувальна речовина, така як магнію стеарат або стерот; глідант, такий як колоїдний діоксид кремнію; підсолоджувач, такий як сахароза або сахарин; або смакова добавка, така як перцева м'ята, метилсаліцилат або апельсиновий ароматизатор.

Для введення шляхом інгаляції, сполуки подаються у вигляді аерозольного спрею з флакона під тиском або дозатора, що містить підходящий газ-витискач, наприклад, діоксид вуглецю, або розпилювач.

Системне введення також може здійснюватися через слизову оболонку або шкіру. Для введення через слизову оболонку або для кризьшкірного введення у складі композиції використовуються речовини, які підвищують проникність, що відповідає бар'єру, кризь який вони повинні проникнути. Такі проникаючі речовини відомі фахівцям і включають, наприклад, для введення через слизову оболонку – поверхнево-активні речовини, солі жовчних кислот і похідні фузидової кислоти. Введення через слизову оболонку можна здійснити за допомогою розпилювачів у ніс або супозиторіїв. Для кризьшкірного введення активну речовину вводять до складу мазі, бальзаму, гелю або крему, як добре відомо фахівцям.

Сполуки також можна підготувати у формі супозиторіїв (наприклад, з використанням традиційних основ для супозиторіїв, таких як масло какао та інші гліцериди) або мікроклізм з утриманням для ректального введення.

В одному з варіантів здійснення цього винаходу активні сполуки готують з носіями, які захищають сполуки від швидкого виведення з організму, такими як носії для сполук контрольованого виділення, включаючи імпланти і мікрокапсульні системи. Можуть використовуватися біорозкладані і біосумісні полімери, такі як етилен-вінілацетат, поліангідриди, полігліколева кислота, колаген, поліортоєфіри і поліоцтова кислота. Способи приготування таких препаратів очевидні для фахівців у цій галузі. Такі матеріали можна також придбати, наприклад, у компаніях Alza Corporation і Nova Pharmaceuticals, Inc. У якості фармацевтично прийнятних носіїв можуть використовуватися також ліпосомні суспензії (включаючи ліпосоми, націлені на інфіковані клітини, з моноклональними антитілами або вірусним антигеном). Такі суспензії можна приготувати способами, відомими фахівцям, наприклад, такими, як описані в Патенті США № 4 522 811.

Особливі переваги має створення оральних або парентеральних лікарських форм завдяки простоті їхнього введення і однорідності дозування. Використовуване в цьому описі винаходу поняття одиниці дозування означає фізично дискретні одиниці, пропоновані як окремі дози введення препарату пацієнту; кожна одиниця дозування містить задану кількість активної сполуки, розрахована так, щоб давати бажаний терапевтичний ефект, і необхідний фармацевтичний носій. Технічні умови на певні одиниці дозування визначаються унікальними характеристиками активної речовини і конкретним терапевтичним ефектом, якого слід досягти, а також, обмеженнями, властивими способу готування такої активної речовини для лікування пацієнтів.

Фармацевтичні композиції можуть вміщуватися в контейнери, пачки або дозатори разом з

інструкціями для застосування.

Якщо використовуються фрагменти антитіл, краще, коли використовується найменший інгібувальний фрагмент, що специфічно зв'язується з доменом зв'язування цільового білка. Наприклад, ґрунтуючись на послідовностях варіабельної ділянки антитіла, можуть розроблятися пептидні молекули, що зберігають здатність зв'язувати послідовність цільового білка. Такі пептиди можуть синтезуватися хімічно та/або одержуватися з використанням методики рекомбінантної ДНК. (Див., наприклад, Marasco et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889-7893 (1993)). До складу препарату може також входити кілька активних сполук, необхідних для лікування за певними показниками; краще, коли такі активні сполуки доповнюють активність один одного і не впливають один на одного небажаним чином. Як альтернатива або доповнення, композиція може також містити засіб, що підсилює функцію такої композиції, наприклад, цитотоксичний засіб, цитокін, хіміотерапевтичний засіб або засіб пригнічення росту. Такі молекули можуть бути присутні у комбінації в кількостях, ефективних для досягнення заданої мети.

Активні інгредієнти можуть також вміщуватися в мікрокапсули, приготовлені, наприклад, з використанням методик коацервації або міжфазної полімеризації, наприклад, гідроксиметилцелюлозні або желатинові мікрокапсули і поліметилметакрилатні мікрокапсули відповідно, у колоїдних системах доставки ліків (наприклад, у ліпосомах, альбумінових мікросферах, мікроемульсіях, наночастинках і нанокапсулах) або в макроемульсіях.

Препарати, призначені для введення *in vivo*, можуть бути стерильними. Це легко забезпечується фільтруванням крізь стерильні мембранні фільтри.

Можна приготувати препарати безперервного вивільнення. Підходящі приклади препаратів безперервного вивільнення включають напівпроникні матриці твердих гідрофобних полімерів, що містять антитіло, причому такі матриці мають певну форму, наприклад, форму плівок або мікрокапсул. Приклади матриць для препаратів безперервного вивільнення включають поліефіри, гідрогелі (наприклад, полі-2-гідроксиетилметакрилат або полівініловий спирт), полілактиди (Патент США № 3 773 919), сополімери L-глутамінової кислоти і етил-L-глутамату, нерозкладаний етиленвінілацетат, розкладані сополімери молочної кислоти і гліколевої кислоти, такі як LUPRON DEPOT™ (ін'єкційні мікросфери, що складаються з сополімера молочної і гліколевої кислоти і лейпролід ацетату), і полі-D-D(-)-3-гідроксимасляну кислоту. У той час як полімери, такі як етилен-вінілацетат та сополімер молочної і гліколевої кислоти, забезпечують виділення молекул протягом більше 100 днів, певні гідрогелі вивільняють білки протягом коротших періодів часу.

Терапевтично ефективна кількість антитіла, що є предметом цього винаходу, у загальному випадку, означає кількість, необхідну для досягнення терапевтичної мети. Як відзначалося вище, така мета може полягати у зв'язуванні антитіла з антигеном-мішенню, що, у певних випадках, порушує функції мішені. Кількість препарату, який необхідно ввести пацієнту, також залежить від зв'язувальної здатності антитіла з його специфічним антигеном, і від швидкості, з якою виснажуються запаси введеного антитіла у вільному обсязі в організмі пацієнта, якому таке антитіло було введене. Як правило, діапазон терапевтично ефективних доз антитіла або фрагмента антитіла, що є предметом цього винаходу, може становити, наприклад, серед іншого, від приблизно 0,1 мг/кг ваги тіла до приблизно 50 мг/кг ваги тіла. Звичайна частота введення доз препарату може змінюватися, наприклад, від двох разів на день до одного разу на тиждень.

Способи відбору антитіл

Способи відбору антитіл, що володіють певною специфічністю, включають, серед іншого, твердофазний імуоферментний аналіз (ELISA) та інші імунологічні методики, відомі фахівцям.

Антитіла проти епітопів  $\gamma^{190-202}$  і  $\gamma^{377-395}$  фібрину можуть використовуватися в способах, відомих фахівцям, що стосуються локалізації та/або кількісного визначення фібрину. В одному з варіантів здійснення цього винаходу антитіла, специфічні до епітопів  $\gamma^{190-202}$  і  $\gamma^{377-395}$  фібрину, або їхні похідні, фрагменти, аналоги або гомологи, що містять антигензв'язуючий домен антитіла, використовуються як фармакологічні активні речовини (що далі в цьому описі винаходу називаються "терапевтичні засоби").

Антитіла, специфічні до епітопів  $\gamma^{190-202}$  і  $\gamma^{377-395}$  фібрину, можуть використовуватися для виділення фібринового поліпептиду стандартними методами, такими як імуоафінна хроматографія або імуопреципітація. Виявлення можна полегшити, сполучаючи (наприклад, за допомогою фізичного зв'язування) антитіло з детектовуваною речовиною. Приклади детектовуваних речовин включають різні ферменти, простетичні групи, флуоресцентні матеріали, люмінесцентні матеріали, біоломінесцентні матеріали і радіоактивні матеріали. Приклади підходящих ферментів включають пероксидазу хрину, лужну фосфатазу, бета-

галактозидазу або ацетилхолінстеразу; приклади підходящих комплексів з простетичними групами включають стрептавідин/біотин і авідин/біотин; приклади підходящих флуоресцентних матеріалів включають умбелліферон, флуоресцеїн, флуоресцеїну ізотіоціанат, родамін, дихлортриазиніламін флуоресцеїн, дансил хлорид або фикоеритрин; прикладом люмінесцентного матеріалу служать люмінол; приклади біолюмінесцентних матеріалів включають люциферазу, люциферин і екворин, а приклади підходящих радіоактивних матеріалів включають  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$  або  $^3\text{H}$ .

Антитіло, що є предметом цього винаходу, можна використовувати як засіб виявлення наявності в зразку епітопов  $\gamma^{190-202}$  і  $\gamma^{377-395}$  фібрину. У деяких варіантах здійснення цього винаходу, антитіло містить детектовану мітку. Антитіла є поліклональними або краще – моноклональними. Використовується інтактне антитіло або його фрагмент (наприклад, фрагмент  $F_{ab}$ ,  $scFv$  чи  $F_{(ab)2}$ ). Термін "мічений" у застосуванні до зонда або антитіла охоплює безпосереднє введення мітки шляхом зв'язування (наприклад, фізичного зв'язування) детектованої речовини з зондом або антитілом, а також опосередковане введення мітки зонда або антитіла за рахунок реакції з іншим реактивом, у який безпосередньо була введена мітка. Приклади опосередкованого введення мітки включають детектування первинного антитіла з використанням вторинного антитіла з флуоресцентною міткою і кінцеве введення мітки біотину в зонд ДНК так, щоб його можна було виявити за допомогою стрептавідину з флуоресцентною міткою. Термін "біологічний зразок" включає тканини, клітини і біологічні рідини, виділені з пацієнта, а також тканини, клітини і рідини в організмі пацієнта. Таким чином, у термін "біологічний зразок" включені кров і фракції або компоненти крові, включаючи сироватку крові, плазму або лімфу. Таким чином, метод детектування, що є предметом цього винаходу, може використовуватися для виявлення аналізованої іРНК, білка або геномної ДНК у біологічному зразку *in vitro* і *in vivo*. Наприклад, методики виявлення аналізованої іРНК *in vitro* включають нозерн гібридизацію і гібридизацію *in situ*. Методики виявлення аналізованого білка *in vitro* включають твердофазний імуноферментний аналіз (ELISA), вестерн-блотинг, імунопреципітацію та імунофлуоресценцію. Методики *in vitro* виявлення аналізованої геномної ДНК включають саузерн-гібридизацію. Порядок проведення імуноферментного аналізу описаний, наприклад в: "ELISA: Theory and Practice: Methods in Molecular Biology" ("Твердофазний імуноферментний аналіз: теорія і практика: Методи молекулярної біології"), Vol. 42, J. R. Crowther (Ed.) Human Press, Totowa, N.J., 1995; "Immunoassay" ("імунологічний аналіз"), E. Diamandis and T. Christopoulos, Academic Press, Inc., San Diego, Calif., 1996; and "Practice and Theory of Enzyme Immunoassays" ("Теорія і практика імуноферментного аналізу"), P. Tijssen, Elsevier 35 Science Publishers, Amsterdam, 1985. Крім того, методики виявлення аналізованого білка *in vivo* включають введення в організм пацієнта міченого антитіла до аналізованого білка. Наприклад, антитіло можна маркувати радіоактивним маркером, присутність і локалізацію якого в організмі пацієнта можна визначити стандартними методиками візуалізації.

#### Методи відбору інгібіторів

У цьому винаході пропонуються способи (що далі в цьому описі винаходу називаються також "аналізом для відбору") ідентифікації модуляторів, наприклад, потенційних або випробуваних сумішей чи засобів (наприклад, пептидів, пептидоміметиків, невеликих молекул або інших ліків), які модулюють або іншим способом впливають на зв'язування фібрину з рецептором Мас-1, чи потенційних або випробуваних сумішей або засобів, які іншим способом впливають на сигнальну функцію фібрину, рецептора Мас-1 або комплексу фібрин/Мас-1. Цей винахід також включає сполуки, ідентифіковані в ході відбору, представленого в цьому описі винаходу.

В одному з варіантів здійснення цього винаходу, пропонується спосіб відбору потенційних речовин або випробуваних сумішей, які модулюють сигнальну функцію комплексу фібрин/Мас-1 і/або взаємодію між фібрином і рецептором Мас-1. Випробувані суміші, що є предметом цього винаходу, можна одержати, використовуючи різні підходи методів комбінаторного синтезу бібліотек, відомих фахівцям, включаючи: біологічні бібліотеки; просторово-доступні паралельні твердофазні бібліотеки або бібліотеки розчинів; методи синтетичних бібліотек, що вимагають проведення деконволюційного аналізу; бібліотеки, отримані методом комбінаторного синтезу "одна гранула – одна сполука"; методи синтетичних бібліотек, що використовують відбір за допомогою афінної хроматографії. Підхід з використанням біологічних бібліотек обмежується бібліотеками пептидів, а інші чотири підходи можна застосувати до бібліотек пептидів, непептидних олігомерів або малих молекул чи до окремих сполук (див., наприклад, Lam, 1997. *Anticancer Drug Design* 12: 145).

Використовуваний у цьому описі винаходу термін "мала молекула" означає композицію, що має молекулярну масу менше приблизно 5 кДа, найкраще – менше ніж приблизно 4 кДа.

Малими молекулами можуть бути, наприклад, нуклеїнові кислоти, пептиди, поліпептиди, пептидоміметики, вуглеводи, жири або інші органічні чи неорганічні молекули. Бібліотеки хімічних і/або біологічних сумішей, таких як суміші грибів, бактерій або екстрактів водоростей, відомі фахівцям і можуть аналізуватися за допомогою кожного зі способів відбору, представлених у цьому винаході.

Приклади способів, використовуваних для синтезу молекулярних бібліотек, відомі в цій галузі, і включають, наприклад: DeWitt, et al., 1993. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 6909; Erb, et al., 1994. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91: 11422; Zuckermann, et al., 30 1994. J. Med. Chem. 37: 2678; Cho, et al., 1993. Science 261: 1303; Carrell, et al., 1994. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33: 2059; Carell, et al., 1994. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33: 2061; and Gallop, et al., 1994. J. Med. Chem. 37:1233.

Бібліотеки сполук можуть бути представлені в розчині (див., наприклад, Houghten, 1992. Biotechniques 13: 412-421), або в гранулах (див. Lam, 1991. Nature 354: 35 82-84), на пластинках (див. Fodor, 1993. Nature 364: 555-556), бактеріях (див. Патент США № 5 223 409), спорах (див. Патент США № 5 233 409), плазмідах (див. Cull, et al., 1992. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 1865-1869) або на фармах (див. Scott and Smith, 1990. Science 249: 386-390; Devlin, 1990. Science 249: 404-406; Cwirla, et al., 1990. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87: 6378-6382; Felici, 1991. J. Mol. Biol. 222: 301-310; and Патент США № 5 233 409).

В одному з варіантів здійснення цього винаходу потенційна сполука вводиться в комплекс антиген-антитіло і визначається, чи руйнує потенційна сполука такий комплекс, причому руйнування комплексу вказує на те, що потенційна сполука модулює сигнальну функцію комплексу фібрин/Мас-1 і/або взаємодію між фібрином і рецептором Мас-1. Наприклад, комплекс моноклонального антитіла 5В8 з антигеном фібриногеном. Як альтернатива – моноклональним антитілом є антитіло 1Е3, а антигеном - фібриноген.

В іншому варіанті здійснення цього винаходу, одержують комплекс фібрин/Мас-1 і вводять його в контакт з не менш ніж одним нейтралізуючим моноклональним антитілом. Детектується утворення комплексу антитіло-антиген, і в цей комплекс вводиться одна або кілька потенційних (випробуваних) сполук. Якщо комплекс антитіло/антиген руйнується після введення однієї або декількох випробуваних сполук, така випробувана сполука придатна для лікування захворювань, що залежать від зв'язування фібрину з рецептором Мас-1.

В іншому варіанті здійснення цього винаходу пропонується розчинний химерний білок, що вводиться в контакт з не менш ніж одним нейтралізуючої моноклональним антитілом. Детектується утворення комплексу антитіло-антиген, і в цей комплекс вводиться одна або кілька потенційних (випробуваних) сполук. Якщо комплекс антитіло/антиген руйнується після введення однієї або декількох випробуваних сполук, така випробувана сполука придатна для лікування захворювань, що залежать від зв'язування фібрину з рецептором Мас-1.

Здатність випробуваної сполуки впливати або руйнувати комплекс антитіло/антиген можна визначити, наприклад, приєднуючи до випробуваної сполуки радіоізотопну або ферментативну мітку, так щоб зв'язування випробуваної сполуки з антигеном або його біологічно активною частиною можна було визначити шляхом виявлення міченої сполуки в комплексі. Наприклад, випробувані сполуки можна маркувати ізотопами  $^{125}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{14}\text{C}$  або  $^3\text{H}$  безпосередньо або опосередковано, і детектувати радіоізотоп прямим підрахунком радіоактивності чи за допомогою сцинтиляційного лічильника. Як альтернатива, випробувані речовини можна маркувати ферментами, наприклад, пероксидазою хрому, лужною фосфатазою або люциферазою, і детектувати ферментну мітку визначенням ступеня перетворення відповідного субстрату в продукт реакції.

В одному з варіантів здійснення цього винаходу аналіз для відбору полягає в контакті комплексу антитіло-антиген з випробуваною сполукою і визначенні здатності випробуваної сполуки взаємодіяти з антигеном або іншим способом руйнувати існуючий комплекс антитіло-антиген. У такому варіанті здійснення цього винаходу визначення здатності випробуваної сполуки взаємодіяти з антигеном і/або руйнувати комплекс антитіло-антиген полягає у визначенні здатності випробуваної сполуки конкурентно зв'язуватися з антигеном або його біологічно активною частиною в порівнянні з антитілом.

В іншому варіанті здійснення цього винаходу аналіз для відбору полягає в контакті комплексу антитіло-антиген з випробуваною сполукою і визначенні здатності випробуваної сполуки модулювати комплекс антитіло-антиген. Здатність випробуваної сполуки модулювати комплекс антитіло-антиген можна визначити, наприклад, визначаючи здатність антигену зв'язуватися або взаємодіяти з антитілом у присутності випробуваної сполуки.

Фахівці в цій галузі розуміють, що в кожному з методів відбору, представлених у цьому описі винаходу, антитіло може бути нейтралізуючим антитілом, таким як моноклональне антитіло 5В8



i/або 1Е3, кожне з яких модулює або іншим способом впливає на зв'язування фібрину з рецептором Мас-1.

В одному з варіантів здійснення цього винаходу може виявитися бажаним іммобілізувати або антитіло, або антиген для полегшення відділення зв'язаних у комплекс форм від незв'язаних у комплекс форм антитіла, антигену або обох після введення випробуваної сполуки, а також для забезпечення можливості проведення автоматичного аналізу. Наявність комплексу антитіло-антиген у присутності або під час відсутності випробуваної сполуки можна спостерігати в будь-якій судині, придатній для розміщення реагентів. Прикладами таких судин служать панелі мікротитратора, пробірки і мікроцентрифужні пробірки. В одному з варіантів здійснення цього винаходу використовується білок злиття, що додає домен, який дає змогу одному або обом білкам зв'язуватися з матрицею. Наприклад, білки злиття глутатіон-S-трансферази (GST)-антитіло або білки злиття GST-антиген можуть поглинатися на поверхні глутатіон-сефарозних гранул (Sigma Chemical, St. Louis, Mo.) або на панелі мікротитратора, вкритої похідним глутатіону, і потім об'єднуватися з випробуваною сполукою, після чого суміш інкубується в умовах, що підходять для комплексоутворення (наприклад, в умовах фізіологічного розчину солі і при фізіологічних значеннях рН). Після інкубації, гранули або стінки планшета мікротитратора промиваються для видалення незв'язаних компонентів і матриці, у випадку гранул, і комплекс визначається або безпосередньо, або непрямим методом. Як альтернатива, комплекси можуть відокремлювати від матриці і рівень комплексоутворення антитіло/антиген може визначатися стандартними методами.

В аналізі для відбору за цим винаходом можуть застосовуватися й інші методики іммобілізації білків на матрицях. Наприклад, або антитіло (наприклад, антитіло 5В8 і/або 1Е3), або антиген (наприклад, фібрин) можна іммобілізувати, використовуючи сполучення з біотином або стрептавідином. Сполучені з біотином молекули антитіла або антигену можна одержати, використовуючи біотин-NHS (NHS: N-гідроксисукцинімід) і добре відому фахівцям методику (наприклад, використовуючи набір для сполучення з біотином, Pierce Chemicals, Rockford, Ill), та іммобілізувати їх на стінках планшета з 96 лунками, вкритого стрептавідином (Pierce Chemical). Як альтернатива, на стінки лунок планшета можна нанести інші антитіла, що реагують з таким антитілом або антигеном, але не заважають утворенню такого комплексу антитіло/антиген, і незв'язане антитіло або антиген будуть закріплюватися на стінках планшета за рахунок кон'югації з антитілом. Методи виявлення таких комплексів, крім описаних вище для комплексів, іммобілізованих GST, включають імунодетектування комплексів за допомогою інших антитіл, що реагують з антитілом або антигеном.

Цей винахід також стосується нових засобів, ідентифікованих за допомогою кожного з зазначених вище способів відбору, і способів використання таких засобів у лікуванні пацієнтів, представлених у цьому описі винаходу.

#### Діагностичний аналіз

Антитіла, що є предметом цього винаходу, можуть детектуватися за допомогою підходящих методів аналізу, наприклад, за допомогою традиційних типів імунологічного аналізу. Наприклад, можна провести сендвіч-аналіз, для реалізації якого повномірний фібриноген, фібрин або їхній фрагмент кріпиться на твердій фазі. Потім проводять інкубацію протягом часу, достатнього, щоб антитіло в зразку зв'язалося з іммобілізованим на твердій фазі поліпептидом. Після першої інкубації тверду фазу відокремлюють від зразка. Тверду фазу промивають для видалення незв'язаних матеріалів і речовин, що заважають, таких як неспецифічні білки, які також можуть бути присутні у зразку. Тверда фаза, що містить цільове антитіло (тобто, моноклональне антитіло 5В8 і/або 1Е3), пов'язане з іммобілізованим поліпептидом, потім інкубують з іншим, маркованим антитілом або антитілом, пов'язаним з таким засобом сполучення, як біотин або авідин. Таке інше антитіло може бути іншим антифібриновим антитілом. Мітки для антитіл добре відомі фахівцям і включають радіонукліди, ферменти (наприклад, малакдегідрогеназу, пероксидазу хрому, глюкозо-оксидазу, каталазу), флуоресцентні мітки (флуоресцеїн ізоціанат, родамін, фікоціанін, фторескармін), біотин і т.п. Марковані антитіла інкубують з антитілом на твердій фазі, і вимірюють кількість мітки, пов'язаної із твердою фазою. Ці та інші способи імунологічного аналізу легко реалізуються фахівцями.

Прикладом способу визначення наявності або відсутності білка фібрину в біологічному зразку служить спосіб з використанням біологічного зразка, отриманого від випробуваного пацієнта, приведенням такого зразка в контакт із міченим моноклональним антитілом, що є предметом цього винаходу, і визначенням наявності фібрину в біологічному зразку.

Використовуваний у цьому описі винаходу термін "мічений" у зв'язку з зондом або антитілом охоплює пряме мічення зонда або антитіла шляхом приєднання (наприклад, фізичного зв'язування) детектовуваної речовини до зонда або антитіла, а також опосередковане введення

мітки зонда або антитіла за рахунок реакції з іншим реактивом, у який безпосередньо була введена мітка. Приклади опосередкованого введення мітки включають детектування первинного антитіла з використанням вторинного антитіла з флуоресцентною міткою і кінцеве введення мітки біотину в зонд ДНК так, щоб його можна було виявити за допомогою стрептавідину із флуоресцентною міткою. Термін "біологічний зразок" включає тканини, клітини і біологічні рідини, виділені з пацієнта, а також тканини, клітини і рідини в організмі пацієнта. Таким чином, метод детектування, що є предметом цього винаходу, може використовуватися для виявлення аналізованої іРНК, білка або геномної ДНК у біологічному зразку *in vitro* та *in vivo*. Наприклад, методики виявлення фібрину включають твердофазний імуноферментний аналіз (ELISA), вестерн-блотинг, імунопреципітацію і імуофлуоресценцію. Крім того, методики виявлення фібрину *in vivo* включають введення в організм пацієнта міченого антитіла до фібрину. Наприклад, антитіло можна маркувати радіоактивним маркером, присутність і локалізацію якого в організмі пацієнта можна визначити стандартними методиками візуалізації.

В одному з варіантів здійснення цього винаходу біологічний зразок містить молекули білків з організму пацієнта. Одним кращим біологічним зразком служить зразок лейкоцитів периферичної крові, взятий у пацієнта традиційним способом.

#### Набори

Цей винахід також стосується наборів для виявлення наявності фібрину в біологічному зразку. Наприклад, набір може включати: мічену сполуку або засіб, що дозволяє виявляти фібрин у біологічних зразках; засоби визначення кількості фібрину в зразку; засоби порівняння кількості фібрину в зразку зі стандартом. Сполука або засіб може бути упакований у підходящий контейнер. Набір може також містити інструкції для використання набору для виявлення фібрину в зразку.

Цей винахід буде далі описано в наступних прикладах, які не обмежують обсягу винаходу, описаного у формулі винаходу.

#### Приклади

Різні аспекти цього винаходу можна краще зрозуміти за наступними прикладами, які не слід розглядати як такі, що обмежують обсяг цього винаходу.

#### Приклад 1 - Одержання моноклональних антитіл

Були синтезовані пептидні послідовності, що точно відповідають амінокислотам у гамма-ланцюзі фібриногену, які, як було показано, мають вирішальне значення для взаємодії фібриногену з рецептором Мас-1 (пептид № 1: CGWTVLQKRIDGSL (SEQ ID NO: 17) і пептид №2: CKKTTMKIIPFNRLTIG (SEQ ID NO: 18)). Ці два пептиди були синтезовані з відповідними N-термінальними залишками цистеїну, що дають змогу виконувати кон'югацію з носієм білка – гемоціаніном лімфи равлика, що сприяє стійкому антитілоутворенню *in vivo*. Обидва пептиди використовувалися для імунізації трьох мишей, викликаючи в них антитілоутворення. Попередній аналіз сироватки виявив значний титр антитіл до цих пептидів і привів до наступного одержання гібридом, що виробляють клональні антитіла до цих двох пептидних послідовностей. Вихідний скринінг 480 клонів гібридами проводився методом твердофазного імуноферментного аналізу (ELISA) для обох пептидів, а також, для білка-носія. Позитивні клони накопичувалися і повторно аналізувалися для підтвердження реакції з епітопами пептидів методом твердофазного імуноферментного аналізу (ELISA). Остаточні результати такого вихідного аналізу показали, що 46 клонів були специфічними до одного з пептидів № 1 або № 2. Докладний аналіз таких результатів твердофазного імуноферментного аналізу (ELISA) дозволив ідентифікувати 16 цільових кандидатів на подальше дослідження. Ці 16 клонів були випробувані на їхню здатність блокувати адгезію мікроглії за допомогою рецептора Мас-1 на повномірному фібриногені. Культури клітин покривали розчином 50 мкг/мл фібриногену, на який потім наносили клітини мікроглії (200 000 клітин/мл) у присутності таких клонів антитіл. Через 30 хвилин лунки промивали, і приклеєні клітини, що залишилися, фарбували 0,1 % розчином кристалічного фіолетового. Пофарбовані клітини фіксували за допомогою 1 % розчину параформальдегіду і солюбілізували 0,5 % розчином Тритон X-100. П'ять з цих клонів продемонстрували значну, аналогічну комерційно доступному блокувальному антитілу до Мас-1 (M1/70), здатність запобігати адгезії мікроглії до фібриногену, оцінювану вимірюванням поглинання на 595 нм (Фігура 1; по зсуву поглинання, ступінь пригнічення перевищила 20 %). Передбачено, що антитіла, які є предметом цього винаходу, можуть інгібувати адгезію мікроглії до фібриногену більш ніж на 30 %, 40 % або 50 %. Клон 1A5, 1D6 і 1E3 розпізнають епітоп пептиду № 1, а клони 4E11 і 5B8 розпізнають епітоп пептиду № 2. Ці п'ять клонів потім були проаналізовані на їхню здатність розпізнавати фібриноген методом вестерн-блотингу. Всі п'ять антитіл однаковою мірою розпізнавали γ-ланцюг фібриногену. Для вивчення того, чи розпізнають ці антитіла фібриноген залежно від дози, був проведений твердофазний

імуноферментний аналіз (ELISA) повномірного фібриногену (Фігура 2). Було виявлено, що всі п'ять антитіл специфічно зв'язують повномірний фібриноген більшою мірою зі зростанням концентрації фібриногену. З цих п'яти антитіл були обрані три антитіла (1E3, 4E11 і 5B8, що забезпечують більш ніж 50 % пригнічення зв'язування рецептора Мас-1 з доменом  $\gamma$ С фібрину або фібриногену, що вимірюється за зсувом поглинання) для виділення і повного очищення. У цьому винаході передбачено, що антитіла, які є предметом цього винаходу, можуть інгібувати зв'язування Мас-1 з фібрином більш ніж на 50 %, 60 % або 70 %. На початку по 20 мг кожного з трьох антитіл були очищені для використання в аналізі фагоцитозу *in vitro* і в експериментах з ЕАЕ.

Приклад 2 – Моноклональні антитіла до  $\gamma$ -ланцюга фібриногену придушують фагоцитоз мікрогліями.

Фагоцитоз є важливою функцією активованих мікроглій і макрофагів, у якій бере участь рецептор Мас-1. Аналіз фагоцитозу був проведений з мікрогліями так, як описувалося раніше. Див. Adams et al., 2007, J. Exp. Med. 204: 571-582, повністю включену в цей опис винаходу шляхом посилання. Похідний від фібрину пептид  $\gamma^{377-395}$  інгібує активацію мікроглій і інгібує рецидив паралічу при аутоімунному захворюванні центральної нервової системи. Моноклональне антитіло 5B8 до модифікованого епітопу  $\gamma^{377-395}$  фібрину виявило кращу ефективність у пригніченні фагоцитозу *in vitro*. Це антитіло в дослідженнях *in vivo* продемонструвало ефекти профілактики і лікування на тваринних моделях розсіяного склерозу, як раніше було показано для пептиду  $\gamma^{377-395}$ .

Приклад 3 - Моноклональне антитіло 5B8 знижує частоту рецидивів на тваринних моделях рецидивуючого експериментального аутоімунного енцефаломієліту.

Для оцінки впливу антифібринових антитіл на регуляцію активації мікроглій і руйнування мієлінового шару *in vivo*, два з клонів, ідентифікованих в аналізі фагоцитозу, були введені мишам після розвитку викликаного піридоксальфосфатом (PLP) ЕАЕ. Антитіла 5B8 і 4E11 вводили три рази на тиждень у дозах по 250 мкг на мишу. Як показано на Фігурі 4, антитіло 4E11 не чинило істотного впливу на розвиток ЕАЕ. На відміну від цього, антитіло 5B8 продемонструвало пригнічення клінічних симптомів під час рецидиву.

Інші варіанти здійснення цього винаходу

Наведений вище докладний опис призначається для того, щоб допомогти фахівцям з практичною реалізацією цього винаходу. Однак описаний в цьому документі винахід і його формула не повинні обмежувати обсяг винаходу конкретними варіантами його здійснення, представленими в цьому описі винаходу, тому що такі варіанти призначені лише для ілюстрації деяких аспектів цього винаходу. Будь-які еквівалентні варіанти здійснення цього винаходу входять до його обсягу. Дійсно, різні модифікації цього винаходу, крім представлених у цьому описі, стануть очевидними для фахівців у цій галузі, виходячи з наведеного вище опису, не відхиляючись від сутності і обсягу цього винаходу. Такі модифікації також потрапляють в обсяг формули винаходу, що додається.

Цитована література

Цитування літератури в цьому описі винаходу не повинно тлумачитися як опис прототипу цього винаходу.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСЕЙ

<110> The Regents of the University of California  
Akassoglou, Katerina

<120> МОНОКЛОНАЛЬНІ АНТИТІЛА

<130> RUC-110WO

<150> US 61/248,014

<151> 2009-10-02

<160> 18

<170> Патентна версія 3.5

<210> 1

<211> 158

<212> білок

<213> Mus musculus

<400> 1

Thr Phe Asp Ser Pro Tyr Gln Val Arg Arg Met Arg Phe Ser Ala Gln  
1 5 10 15

Leu Leu Gly Leu Leu Val Leu Trp Ile Pro Gly Ser Thr Ala Asp Ile  
20 25 30

Val Met Thr Gln Ala Ala Phe Ser Asn Pro Ile Thr Leu Gly Thr Ser  
35 40 45

Ala Ser Met Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Ser Gly  
50 55 60

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

Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg  
85 90 95

Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile Ser Arg  
100 105 110

Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn Leu Glu  
115 120 125

Leu Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala  
130 135 140

Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ala Cys Thr Lys Gly Glu Phe  
145 150 155

```

<210> 2
<211> 16
<212> Білок
<213> Mus musculus

<400> 2
Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Ser Gly Ile Thr Tyr Leu Ser
1          5          10          15

<210> 3
<211> 7
<212> Білок
<213> Mus musculus

<400> 3
Gln Met Ser Asn Leu Ala Ser
1          5

<210> 4
<211> 9
<212> Білок
<213> Mus musculus

<400> 4
Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Leu Thr
1          5

<210> 5
<211> 166
<212> Білок
<213> Mus musculus

<400> 5
Asn Thr Ala Phe Ala Gly Phe Gly Arg Asn Met Arg Ser Leu Phe Ser
1          5          10          15

Leu Gln Leu Leu Ser Thr Gln Asp Leu Ala Met Gly Trp Ser Cys Ile
20          25          30

Ile Val Leu Leu Val Ser Thr Ala Thr Gly Val His Ser Gln Val Gln
35          40          45

Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr Ser Val Lys
50          55          60

Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Ile His
65          70          75          80

```

Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Leu Ile  
85 90 95

Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Arg Gly Lys  
100 105 110

Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu  
115 120 125

Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Ser  
130 135 140

Asp Pro Thr Gly Cys Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Pro  
145 150 155 160

Ala Ser Thr Thr Pro Pro  
165

<210> 6  
<211> 10  
<212> Билок  
<213> Mus musculus

<400> 6

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Ile His  
1 5 10

<210> 7  
<211> 17  
<212> Билок  
<213> Mus musculus

<400> 7

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

Gly

<210> 8  
<211> 6  
<212> Билок  
<213> Mus musculus

<400> 8

Ser Asp Pro Thr Gly Cys  
1 5

<210> 9  
<211> 474  
<212> ДНК  
<213> Mus musculus

<400> 9  
acttttgact caccatatca agttcgcaga atgaggttct ctgctcagct tctggggctg 60  
cttgtgctct ggatccctgg atccactgca gatattgtga tgacgcaggc tgcattctcc 120  
aatccaatca ctcttggaac atcagcttcc atgtcctgca ggtctagtaa gagtctccta 180  
catagtagtg gcatcactta ttgtcttgg tatctgcaga agccaggcca gtctctcag 240  
ctcctgattt atcagatgtc caaccttgcc tcaggagtcc cagacagggt cagtagcagt 300  
gggtcagaa ctgattttcac actgagaatt agccgagtgg aggctgagga tgtgggtgtt 360  
tattactgtg ctcaaaatct agaacttccg ctcacgttcg gtgtgggac caagctggag 420  
ctgaaacggg ctgatgctgc accaactgta tccgcatgca ccaagggcga attc 474

<210> 10  
<211> 499  
<212> ДНК  
<213> Mus musculus

<400> 10  
gaacactgct ttgtctggct ttggaagaaa catgagatca ctgttctctc tacagttact 60  
gagcacacag gacctcgcca tgggatggag ctgtatcatt gtctcttgg tatcaacagc 120  
tacagggtgc cactcccagg tccaactgca gcagcctggg gctgagctgg tgaggcctgg 180  
gacttcagtg aagttgtcct gcaaggcttc tggctacacc ttcaccagct actggataca 240  
ctgggtaaaag cagaggcctg gacaaggcct tgagtggatc ggactgattg atccttctga 300  
tagttatact aactacaatc aaaagtccag gggcaaggcc acattgactg tagacacatc 360  
ctccagcaca gcctacatgc agctcagcag cctgacatct gaggactctg cggtctatta 420  
ctgtgcaagc tccgatccta caggctgctg gggccaaggc accactctca cagtctcccc 480  
agctagcaca acaccccca 499

<210> 11  
<211> 48  
<212> ДНК  
<213> Mus musculus

<400> 11  
aggcttagta agagtctcct acatagtagt ggcatacctt atttgtct 48

<210> 12  
<211> 21  
<212> ДНК

```

<213> Mus musculus

<400> 12
cagatgtcca accttgccctc a
21

<210> 13
<211> 27
<212> ДНК
<213> Mus musculus

<400> 13
gctcaaaatc tagaacttcc gctcagc
27

<210> 14
<211> 30
<212> ДНК
<213> Mus musculus

<400> 14
ggctacacct tcaccagcta ctggatacac
30

<210> 15
<211> 51
<212> ДНК
<213> Mus musculus

<400> 15
ctgatgtgac cttctgatag ttatactaac tacaatcaaa agttcagggg c
51

<210> 16
<211> 18
<212> ДНК
<213> Mus musculus

<400> 16
tccgataccta caggctgc
18

<210> 17
<211> 14
<212> Білок
<213> Mus musculus

<400> 17
Cys Gly Trp Thr Val Leu Gln Lys Arg Ile Asp Gly Ser Leu
1 5 10

<210> 18
<211> 17
<212> Білок
<213> Mus musculus

<400> 18
Cys Lys Lys Thr Thr Met Lys Ile Ile Pro Phe Asn Arg Leu Thr Ile

1 5 10 15
Gly

```

## ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

5

1. Виділене антитіло, що зв'язує домен γС фібрину або фібриногену, причому зазначене антитіло інгібує адгезію мікроглії до домену γС фібрину або фібриногену більше ніж на 20 %, та при цьому зазначене антитіло містить варіабельну ділянку легкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність LCDR 1 - RSSKSLHSSGITYLS (SEQ ID NO: 2), LCDR 2 - QMSNLAS (SEQ ID NO: 3) і LCDR 3 - AQNLELPLT (SEQ ID NO: 4), і варіабельну ділянку важкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність HCDR 1 - GYTFTSYWIH (SEQ ID NO: 6), HCDR 2 - LIDPSDSYTNYNQKFRG (SEQ ID NO: 7) і HCDR 3 - SDPTGC (SEQ ID NO: 8).

10

2. Виділене антитіло, що зв'язує домен γС фібрину або фібриногену, причому зазначене антитіло інгібує зв'язування рецептора Мас-1 з доменом γС фібрину або фібриногену більше ніж на 50 %, та

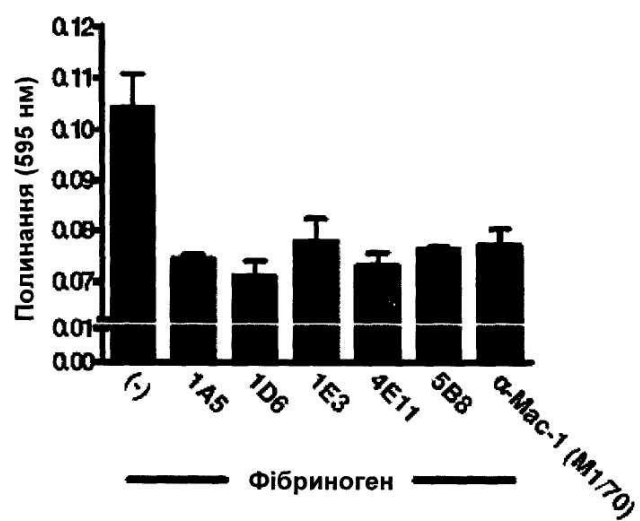
15

при цьому зазначене антитіло містить варіабельну ділянку легкого ланцюга, що включає

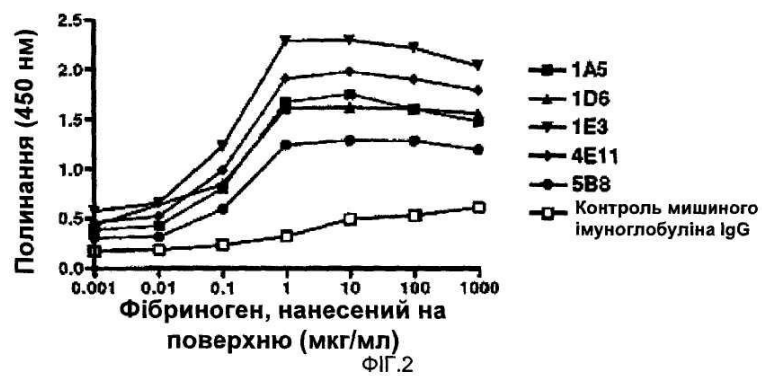


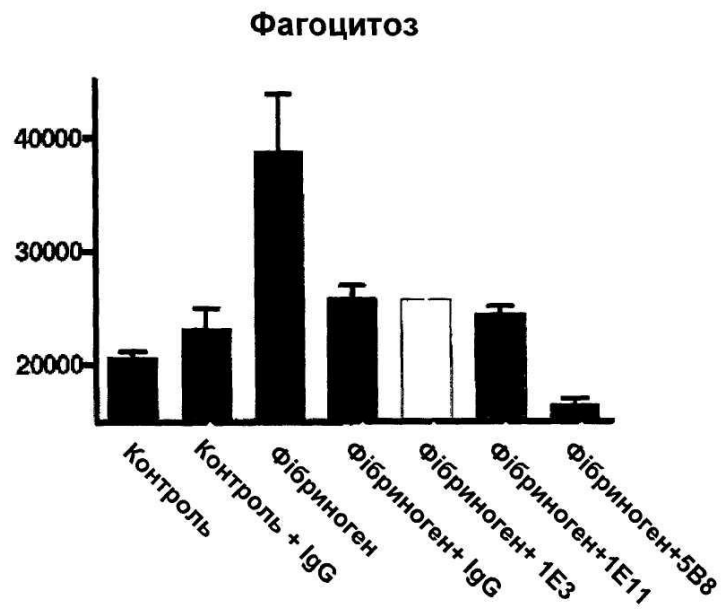
амінокислотну послідовність LCDR 1 - RSSKSLHSSGITYLS (SEQ ID NO: 2), LCDR 2 - QMSNLAS (SEQ ID NO: 3) і LCDR 3 - AQNLELPLT (SEQ ID NO: 4), і варіабельну ділянку важкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність HCDR 1 - GYTFTSYWIH (SEQ ID NO: 6), HCDR 2 - LIDPSDSYTNYNQKFRG (SEQ ID NO: 7) і HCDR 3 - SDPTGC (SEQ ID NO: 8).

- 5 3. Виділене антитіло, що зв'язує домен  $\gamma$ C фібрину або фібриногену, причому зазначене антитіло інгібує клінічні симптоми експериментального аутоімунного енцефаломієліту (EAE) під час рецидиву захворювання, та  
при цьому зазначене антитіло містить варіабельну ділянку легкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність LCDR 1 - RSSKSLHSSGITYLS (SEQ ID NO: 2), LCDR 2 - QMSNLAS (SEQ ID NO: 3) і LCDR 3 - AQNLELPLT (SEQ ID NO: 4), і варіабельну ділянку важкого ланцюга, що включає амінокислотну послідовність HCDR 1 - GYTFTSYWIH (SEQ ID NO: 6), HCDR 2 - LIDPSDSYTNYNQKFRG (SEQ ID NO: 7) і HCDR 3 - SDPTGC (SEQ ID NO: 8).
- 10 4. Антитіло за будь-яким з пп. 1-3, де зазначене антитіло зв'язує епітоп  $\gamma^{377-395}$  домену  $\gamma$ C фібрину або фібриногену.
- 15 5. Антитіло за будь-яким з пп. 1-4, де зазначене антитіло є моноклональним антитілом.
6. Антитіло за будь-яким з пп. 1-5, де зазначене антитіло є гуманізованим антитілом.
7. Антитіло за будь-яким з пп. 1-5, де зазначене антитіло є антитілом людини.
8. Антитіло за будь-яким з пп. 1-7, де зазначене антитіло містить варіабельний легкий ланцюг з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO: 1.
- 20 9. Антитіло за будь-яким з пп. 1-7, де зазначене антитіло містить варіабельну амінокислотну послідовність важкого ланцюга SEQ ID NO: 5.
10. Антитіло за будь-яким з пп. 1-7, де зазначене антитіло містить варіабельний легкий ланцюг з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO: 1 і варіабельний важкий ланцюг з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO: 5.
- 25 11. Антитіло за будь-яким з пп. 1-10, для застосування у зниженні виразності симптомів патології, що асоціюється зі зв'язуванням Mac-1 з фібрином або Mac-зв'язуванням з фібриногеном у пацієнта, для якого таке зниження виразності є бажаним.
12. Антитіло за п. 11, де зазначеним пацієнтом є людина.
13. Антитіло за п. 11, де зазначена патологія вибрана з групи, що включає: розсіяний склероз, ушкодження спинного мозку, хвороба Альцгеймера, інсульт, ревматоїдний артрит і рак.
- 30 14. Фармацевтична композиція, що містить антитіло за будь-яким з пп. 1-13 та фармацевтично прийнятний носій.
15. Набір, що містить антитіло за будь-яким з пп. 1-13.
16. Вектор, що містить послідовність нуклеїнових кислот, яка кодує епітоп  $\gamma^{377-395}$  фібрину, СККТТМКІІPFNRLTIG (SEQ ID NO: 18), або його біологічно активну похідну.
- 35 17. Клітина, що містить вектор за п. 16.
18. Спосіб створення антитіла, яке імуноспецифічно зв'язується з епітопом  $\gamma^{377-395}$  фібрину або його біологічно активною похідною, у якому:  
пацієнту вводять першу дозу клітин за п. 17, причому така перша доза є достатньою для розвитку імунної реакції у пацієнта.
- 40 19. Спосіб за п. 18, який додатково включає етап введення пацієнту другої дози зазначених клітин, причому така друга доза є достатньою для розвитку імунної реакції у пацієнта.
20. Спосіб за п. 18 або 19, у якому одержане антитіло інгібує зв'язування фібрин/Mac-1 у пацієнта.
- 45 21. Спосіб відбору ліганду, що модулює активність рецептора Mac-1, у якому:  
(а) забезпечують антитіла за будь-яким з пп. 1-13,  
(б) приводять у контакт з епітопом  $\gamma^{377-395}$  фібрину, СККТТМКІІPFNRLTIG (SEQ ID NO: 18) або його біологічно активною похідною, з утворенням комплексу антитіло/поліпептид,  
(в) приводять у контакт комплекс антитіло/поліпептид з композицією, що містить сполуку, що є предметом відбору, і
- 50 (г) визначають, чи зв'язується сполука, що є предметом відбору, з моноклональним антитілом, причому зв'язування сполуки, що є предметом відбору, вказує на те, що така сполука є лігандом, який модулює активність рецептора Mac-1.

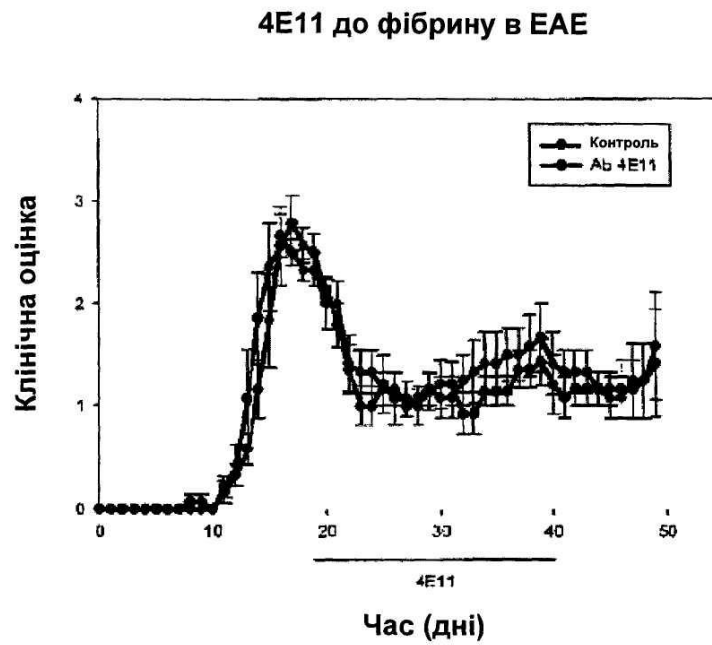


ФІГ. 1

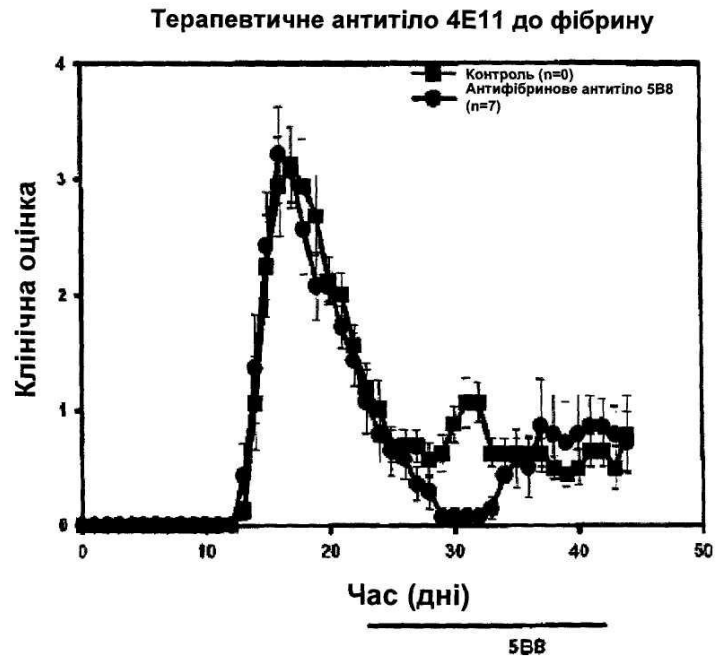




ФІГ. 3



ФІГ. 4А



ФІГ. 4В

---

Комп'ютерна верстка Л. Бурлак

---

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

---

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