

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202390801** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.08.22

(22) Дата подачи заявки
2021.09.29

(51) Int. Cl. *C07K 14/00* (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61P 17/06 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) РЕКОМБИНАНТНЫЕ ГИБРИДНЫЕ БЕЛКИ, СОДЕРЖАЩИЕ БЕЛОК, СВЯЗЫВАЮЩИЙ ИНТЕРЛЕЙКИН-18, И АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЙ ФРАГМЕНТ К СЫВОРОТОЧНОМУ АЛЬБУМИНУ, СОДЕРЖАЩИЕ ИХ КОМПОЗИЦИИ И ВАРИАНТЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) **10-2020-0127395**

(32) **2020.09.29**

(33) **KR**

(86) **PST/IB2021/058964**

(87) **WO 2022/070112 2022.04.07**

(71) Заявитель:
ЭЙПРИЛБИО КО., ЛТД. (KR)

(72) Изобретатель:
Ча Сан Хун (KR)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) Предложены рекомбинантные гибридные белки, содержащие белок, связывающий интерлейкин-18, и антигенсвязывающий фрагмент против сывороточного альбумина, и варианты их применения. Указанные рекомбинантные гибридные белки характеризуются улучшенным циклом введения за счет увеличения периода полужизни в организме. Кроме того, указанные рекомбинантные гибридные белки обладают низкой иммуногенностью и не вызывают побочных эффектов *in vivo*, и, следовательно, их можно эффективно применять для лечения различных злокачественных и иммунологических заболеваний и состояний.

A1

202390801

202390801

A1

**РЕКОМБИНАНТНЫЕ ГИБРИДНЫЕ БЕЛКИ, СОДЕРЖАЩИЕ БЕЛОК,
СВЯЗЫВАЮЩИЙ ИНТЕРЛЕЙКИН-18, И АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЙ ФРАГМЕНТ
К СЫВОРОТОЧНОМУ АЛЬБУМИНУ, СОДЕРЖАЩИЕ ИХ КОМПОЗИЦИИ И
ВАРИАНТЫ ИЗ ПРИМЕНЕНИЯ**

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании заявки KR № 10-2020-0127395, поданной 29 сентября 2020 г., содержание которой полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки.

**ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, ПРЕДСТАВЛЕННЫЙ В
ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ**

[0002] Содержание представленного в электронном виде перечня последовательностей в текстовом файле ASCII (имя файла: 2662-0005WO01_Sequence_Listing_ST25.txt; размер: 46 КБ; и дата создания: 29 сентября 2021 г.), поданного с заявкой, полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0003] Настоящее изобретение относится к рекомбинантным белкам, содержащим белок, связывающий интерлейкин-18, и антигенсвязывающий фрагмент, связывающийся с сывороточным альбумином, молекулам нуклеиновых кислот, кодирующим указанные рекомбинантные белки, векторам, клеткам, композициям и вариантам их применения.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0004] Аутоиммунные заболевания вызываются аутоиммунными явлениями, обусловленными патологиями иммунной системы организма, и приводят к тому, что иммунная система неправильно реагирует на нормальные химические вещества и некоторые клетки в организме. Иммунная система человека в основном распознает микроорганизмы, вторгающиеся в организм человека, и раковые клетки как чужеродные антигены и обычно атакует и удаляет их, но не атакует свои собственные клетки благодаря ауто толерантности. Однако при нарушениях ауто толерантности иммунной системы организм человека постоянно разрушает собственные клетки, что вызывает воспалительные и иммунные реакции по мере активации аутореактивных Т-клеток в ответ на собственные клетки (или аутоантигены) и выработки аутоантител.

[0005] Интерлейкин-18 (ИЛ-18) является провоспалительным цитокином, принадлежащим к семейству интерлейкина-1, и также известен как фактор, индуцирующий гамма-интерферон. В частности, в крови пациента с иммунным заболеванием повышена концентрация ИЛ-18, а концентрация белка, связывающего интерлейкин-18, являющегося антагонистом ИЛ-18, ниже, чем концентрация ИЛ-18. Это обуславливает необходимость снижения концентрации интерлейкина-18 в крови. В отчетах по клиническим исследованиям, проведенным на небольшом количестве пациентов, сообщалось, что при терапевтическом применении биологических агентов, мишенями которых являются воспалительные цитокины, например, интерлейкин-1, интерлейкин-1 β , интерлейкин-6, ФНО и т.д., они проявляли клинические эффекты при аутоиммунных заболеваниях. Поскольку биологические агенты могут вызывать образование антител против лекарственных препаратов (ADA), особенно при аутоиммунных заболеваниях, новые биологические структуры могут являться альтернативными вариантами для пациентов с ADA против существующих биологических агентов. Высокие уровни ИЛ-18 также ассоциированы с плохим прогнозом у пациентов с множественной миеломой (ММ) (Nakamura, K. et al., Cancer Cell. 2018 Apr 9;33(4):634-648.e5). Соответственно, существует потребность в разработке противовоспалительных и онкотерапевтических агентов, способных повысить удобство и эффективность введения для пациентов за счет снижения дозировки и частоты введения при минимизации побочных эффектов.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0006] В настоящем документе описаны рекомбинантные гибридные белки, включая белок, связывающий интерлейкин-18, и антигенсвязывающий фрагмент против сывороточного альбумина.

[0007] Кроме того, в настоящем документе описаны фармацевтические композиции для профилактики или лечения иммунных заболеваний, причем указанные фармацевтические композиции включают рекомбинантный гибридный белок в качестве действующего вещества.

[0008] Кроме того, в настоящем документе описаны фармацевтические композиции для профилактики или лечения рака, причем указанные фармацевтические композиции включают рекомбинантный гибридный белок в качестве активного ингредиента.

[0009] В настоящем документе описаны рекомбинантные гибридные белки, содержащие белок, связывающий интерлейкин-18 (IL-18BP), и антигенсвязывающий фрагмент (Fab) против сывороточного альбумина.

[0010] Гибридные белки могут дополнительно содержать линкер, соединяющий IL-18BP с Fab. В некоторых вариантах реализации линкер соединяет IL-18BP с С-концом константного домена тяжелой цепи, N-концом вариабельного домена тяжелой цепи, С-концом константного домена легкой цепи и/или N-концом вариабельного домена легкой цепи Fab. В некоторых вариантах реализации линкер соединяет IL-18BP с С-концом константного домена тяжелой цепи. В некоторых вариантах реализации линкер содержит от 1 до 50 аминокислот. В некоторых вариантах реализации линкер содержит аминокислотную последовательность согласно любой из SEQ ID NO:16 и 70-84.

[0011] В некоторых вариантах реализации в гибридных белках, описанных в настоящем документе, тяжелая цепь и легкая цепь Fab связаны нековалентной связью.

[0012] Fab может содержать

тяжелую цепь, содержащую вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий

(1) определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SYGIS (SEQ ID NO:22),

определяющий комплементарность домен 2 (CDR2) тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность WINTYSGGTKYAQKFQG (SEQ ID NO:23), и

определяющий комплементарность домен 3 (CDR3) тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность LGHCQRGICSDALDT (SEQ ID NO:24);

(2) CDR1 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SYGIS (SEQ ID NO:22),

CDR2 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность RINTYNGNTGYAQLQG (SEQ ID NO:25), и

CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность LGHCQRGICSDALDT (SEQ ID NO:24);

(3) CDR1 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность NYGIH (SEQ ID NO:26),

CDR2 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SISYDGSNKYYYADSVKG (SEQ ID NO:27), и

CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность DVHYYGSGYYNAFDI (SEQ ID NO:28);

(4) CDR1 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SYAMS (SEQ ID NO:29),

CDR2 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность VISHDGGGFQYYADSVKG (SEQ ID NO:30), и

CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность AGWLRQYGMDV (SEQ ID NO:31);

(5) CDR1 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность AYWIA (SEQ ID NO:32),

CDR2 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность MIWPPDADARYSPSFQG (SEQ ID NO:33), и

CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность LYSGSYSP (SEQ ID NO:34); или

(6) CDR1 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность AYSMN (SEQ ID NO:35),

CDR2 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SISSSGRYIHVADSVKG (SEQ ID NO:36), и

CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность ETVMAGKALDY (SEQ ID NO:37); и

легкую цепь, содержащую переменный домен легкой цепи, содержащий

(7) CDR1 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность RASQISRYLN (SEQ ID NO:38),

CDR2 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность GASRRLES (SEQ ID NO:39), и

CDR3 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность QQSDSVPVT (SEQ ID NO:40);

(8) CDR1 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность RASQISSYLN (SEQ ID NO:41),

CDR2 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность AASSLQS (SEQ ID NO:42), и

CDR3 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность QQSYSTPPYT (SEQ ID NO:43);

(9) CDR1 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность RASQSIFNYVA (SEQ ID NO:44),

CDR2 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность DASNRAT (SEQ ID NO:45), и

CDR3 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность QQRSKWPPTWT (SEQ ID NO:46);

(10) CDR1 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность RASETVSSRQLA (SEQ ID NO:47),

CDR2 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность GASSRAT (SEQ ID NO:48), и

CDR3 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность QQYGSSPRT (SEQ ID NO:49);

(11) CDR1 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность RASQSVSSSLA (SEQ ID NO:50),

CDR2 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность GASSRAT (SEQ ID NO:48), и

CDR3 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность QKYSSYPLT (SEQ ID NO:51); или

(12) CDR1 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность RASQSVGSNLA (SEQ ID NO:52),

CDR2 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность GASTGAT (SEQ ID NO:53), и

CDR3 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность QQYYSFLAKT (SEQ ID NO:54).

[0013] В некоторых вариантах реализации в гибридных белках, описанных в настоящем документе, переменный домен тяжелой цепи содержит CDR1 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:35, CDR2 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36, и CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:37; а переменный домен легкой цепи содержит CDR1 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:52, CDR2 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:53, и CDR3 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:54.

[0014] В некоторых вариантах реализации вариабельный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO:55, 56, 57, 58, 59 или 60. В некоторых вариантах реализации вариабельный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO:61, 62, 63, 64, 65, 66 или 67. В некоторых вариантах реализации вариабельный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:55, 56, 57, 58, 59 или 60, а вариабельный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:61, 62, 63, 64, 65, 66 или 67. В некоторых вариантах реализации константный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO:68. В некоторых вариантах реализации константный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO:69.

[0015] Белок, связывающий ИЛ-18, может содержать аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO:7. В некоторых вариантах реализации белок, связывающий ИЛ-18, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7.

[0016] В некоторых вариантах реализации тяжелая цепь Fab содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:19. В некоторых вариантах реализации гибридный белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:13 и аминокислотную последовательность SEQ ID NO:19.

[0017] Кроме того, в настоящем документе описаны молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие любой из рекомбинантных гибридных белков, описанных в настоящем документе.

[0018] В настоящем документе дополнительно описаны экспрессирующие векторы, содержащие любую из молекул нуклеиновой кислоты, описанных в настоящем документе.

[0019] В настоящем документе описаны клетки, трансформированные любым из экспрессирующих векторов, описанных в настоящем документе.

[0020] В настоящем документе описаны композиции, содержащие любой из рекомбинантных гибридных белков, описанных в настоящем документе. Кроме того, в настоящем документе описаны фармацевтические композиции, содержащие любую из композиций, описанных в настоящем документе, и фармацевтически приемлемое

вспомогательное вещество. Кроме того, описаны наборы, содержащие любую из композиций, описанных в настоящем документе, и этикетку, содержащую инструкции по применению.

[0021] В настоящем документе описаны способы лечения иммунного заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение указанному субъекту эффективного количества фармацевтической композиции по п. 23. В некоторых вариантах реализации указанное иммунное заболевание представляет собой воспалительное заболевание или аутоиммунное заболевание. В некоторых вариантах реализации воспалительное заболевание представляет собой атопический дерматит, псориаз, дерматит, аллергию, артрит, ринит, средний отит, боль в горле, тонзиллит, цистит, нефрит, воспаление органов таза, болезнь Крона, язвенный колит, анкилозирующий спондилит, системную красную волчанку (СКВ), астму, отек, аллергическую реакцию замедленного типа (аллергию IV типа), отторжение трансплантата, болезнь «трансплантат против хозяина», аутоиммунный энцефаломиелит, рассеянный склероз, воспалительное заболевание кишечника, муковисцидоз, диабетическую ретинопатию, ишемическое реперфузионное повреждение, рестеноз сосудов, гломерулонефрит или желудочно-кишечную аллергию. В некоторых вариантах реализации указанное аутоиммунное заболевание представляет собой болезнь Стилла, развившуюся во взрослом возрасте, системный ювенильный идиопатический артрит, синдром активации макрофагов, ревматоидный артрит, синдром Шегрена, системный склероз, полимиозит, системный ангиит, смешанное заболевание соединительной ткани, болезнь Крона, болезнь Хашимото, болезнь Грейвса, синдром Гудпасчера, синдром Гийена-Барре, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру, синдром раздраженного кишечника, миастению гравис, гипнолепсию, обыкновенную пузырчатку, пернициозную анемию, первичный билиарный цирроз, язвенный колит, васкулит, гранулематоз Вегенера или псориаз.

[0022] В настоящем документе описаны способы лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение указанному субъекту эффективного количества фармацевтической композиции по п. 23. В некоторых вариантах реализации указанный рак представляет собой множественную миелому, рак легких, рак печени, рак желудка, рак ободочной и прямой кишки, рак толстой кишки, рак кожи, рак мочевого пузыря, рак предстательной железы, рак молочной железы, рак яичников, рак шейки матки, рак щитовидной железы, рак почек, фибросаркому, меланому или рак крови.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0023] ФИГ. 1А-1В. Векторы, экспрессирующие тяжелую цепь (ФИГ. 1А) и легкую цепь (ФИГ. 1В) для получения рекомбинантного гибридного белка.

[0024] ФИГ. 2. Схематическая структура белка АРВ-R3.

[0025] ФИГ. 3. Результаты анализа размера белка АРВ-R3 на основе электрофореза в ДСН-ПААГ в количестве 1 мкг/лунку и 2 мкг/лунку в восстанавливающих условиях (R), невосстанавливающих условиях с нагреванием (NR(B)) и невосстанавливающих условиях без нагревания (NR(NB)).

[0026] ФИГ. 4. Результаты ЭХ-ВЭЖХ-анализа чистоты белка АРВ-R3.

[0027] ФИГ. 5. Результаты анализа изоэлектрической точки белка АРВ-R3.

[0028] ФИГ. 6. График, демонстрирующий ингибирование ИЛ-18 в линии клеток KG-1 белком АРВ-R3.

[0029] ФИГ. 7. График, демонстрирующий ингибирование ИЛ-18 в CD4+ Т-клетках мыши белком АРВ-R3.

[0030] ФИГ. 8. График, демонстрирующий концентрации белка в крови после подкожного введения белка АРВ-R3 крысам.

[0031] ФИГ. 9. График, демонстрирующий концентрации белка в крови после внутривенного введения белка АРВ-R3 крысам.

[0032] ФИГ. 10. График, демонстрирующий массу тела мышей в модели синдрома активации макрофагов (MAS).

[0033] ФИГ. 11А-11В. Графики, демонстрирующие массу селезенки/массу тела и массу печени/массу тела мышей в модели синдрома активации макрофагов (MAS).

[0034] ФИГ. 12А-12В. Графики, демонстрирующие уровни аспартатаминотрансферазы (АСТ) и аланинаминотрансферазы (АЛТ) в сыворотке мышей в модели синдрома активации макрофагов (MAS).

[0035] ФИГ. 13А-13В. Графики, демонстрирующие уровни ИФН- γ и CXCL9 в сыворотке мышей в модели синдрома активации макрофагов (MAS).

[0036] ФИГ. 14. График, демонстрирующий популяцию клеток моноцитов/макрофагов в селезенке мышей в модели синдрома активации макрофагов (MAS).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Антитела и их фрагменты

[0037] В настоящем документе описаны рекомбинантные гибридные белки, содержащие белок, связывающий интерлейкин-18 (IL-18BP), и антигенсвязывающий фрагмент (Fab) против сывороточного альбумина. Гибридные белки могут дополнительно содержать линкер, соединяющий IL-18BP с Fab.

[0038] В некоторых вариантах реализации в гибридных белках, описанных в настоящем документе, тяжелая цепь и легкая цепь Fab связаны нековалентной связью.

[0039] Fab может содержать

тяжелую цепь, содержащую вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий

(1) определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SYGIS (SEQ ID NO:22),

определяющий комплементарность домен 2 (CDR2) тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность WINTYSGGTKYAQKFQG (SEQ ID NO:23), и

определяющий комплементарность домен 3 (CDR3) тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность LGHCQRGICSDALDT (SEQ ID NO:24);

(2) CDR1 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SYGIS (SEQ ID NO:22),

CDR2 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность RINTYNGNTGYAQLQG (SEQ ID NO:25), и

CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность LGHCQRGICSDALDT (SEQ ID NO:24);

(3) CDR1 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность NYGIH (SEQ ID NO:26),

CDR2 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SISYDGSNKYYYADSVKG (SEQ ID NO:27), и

CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность DVHYYGSGYYNAFDI (SEQ ID NO:28);

(4) CDR1 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SYAMS (SEQ ID NO:29),

CDR2 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность VISHDGGFQYYADSVKG (SEQ ID NO:30), и

CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность AGWLRQYGMDV (SEQ ID NO:31);

(5) CDR1 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность AYWIA (SEQ ID NO:32),

CDR2 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность MIWPPDADARYSPSFQG (SEQ ID NO:33), и

CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность LYSGSYSP (SEQ ID NO:34); или

(6) CDR1 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность AYSMN (SEQ ID NO:35),

CDR2 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SSSSGRYIHVADSVKG (SEQ ID NO:36), и

CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность ETVMAGKALDY (SEQ ID NO:37); и

легкую цепь, содержащую вариабельный домен легкой цепи, содержащий

(7) CDR1 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность RASQSI RYLN (SEQ ID NO:38),

CDR2 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность GASRRLES (SEQ ID NO:39), и

CDR3 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность QQSDSVPVT (SEQ ID NO:40);

(8) CDR1 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность RASQSISSYLN (SEQ ID NO:41),

CDR2 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность AASSLQS (SEQ ID NO:42), и

CDR3 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность QQSYSTPPYT (SEQ ID NO:43);

(9) CDR1 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность RASQSI FNYVA (SEQ ID NO:44),

CDR2 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность DASNRAT (SEQ ID NO:45), и

CDR3 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность QQRSKWPPTWT (SEQ ID NO:46);

(10) CDR1 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность RASET VSSRQLA (SEQ ID NO:47),

CDR2 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность GASSRAT (SEQ ID NO:48), и

CDR3 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность QQYGSSPRT (SEQ ID NO:49);

(11) CDR1 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность RASQSVSSSLA (SEQ ID NO:50),

CDR2 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность GASSRAT (SEQ ID NO:48), и

CDR3 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность QKYSSYPLT (SEQ ID NO:51); или

(12) CDR1 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность RASQSVGSNLA (SEQ ID NO:52),

CDR2 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность GASTGAT (SEQ ID NO:53), и

CDR3 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность QQYYSFЛАКТ (SEQ ID NO:54).

[0040] В некоторых вариантах реализации вариабельный домен тяжелой цепи содержит CDR1 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:35, CDR2 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36, и CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:37; а вариабельный домен легкой цепи содержит CDR1 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:52, CDR2 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:53, и CDR3 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:54.

[0041] В некоторых вариантах реализации вариабельный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO:55, 56, 57, 58, 59 или 60. В некоторых вариантах реализации вариабельный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO:61, 62, 63, 64, 65, 66 или 67. В некоторых вариантах реализации вариабельный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:55, 56, 57, 58, 59 или 60, а вариабельный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:61, 62, 63, 64, 65, 66 или 67. В некоторых вариантах реализации константный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную

последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO:68. В некоторых вариантах реализации константный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO:69.

[0042] В некоторых вариантах реализации тяжелая цепь Fab содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:19. В некоторых вариантах реализации гибридный белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:13 и аминокислотную последовательность SEQ ID NO:19.

[0043] В некоторых вариантах реализации рекомбинантных белков, описанных в настоящем документе, переменный домен тяжелой цепи содержит CDR1 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:35, CDR2 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36, и CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:37; а переменный домен легкой цепи содержит CDR1 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:52, CDR2 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:53, и CDR3 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:54.

[0044] В некоторых вариантах реализации переменный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичную последовательности SEQ ID NO:55, 56, 57, 58, 59 или 60.

[0045] В некоторых вариантах реализации переменный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичную последовательности SEQ ID NO:61, 62, 63, 64, 65, 66 или 67.

[0046] В некоторых вариантах реализации переменный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:55, 56, 57, 58, 59 или 60, а переменный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:61, 62, 63, 64, 65, 66 или 67.

[0047] В некоторых вариантах реализации Fab содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей

мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичную последовательности SEQ ID NO:55, 56, 57, 58, 59 или 60, и переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичную последовательности SEQ ID NO:61, 62, 63, 64, 65 или 66 или 67, соответственно, или любые комбинации переменного домена тяжелой цепи и переменного домена легкой цепи, описанные в настоящем документе. Например, Fab может содержать переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичную последовательности SEQ ID NO:60, и переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичную последовательности SEQ ID NO:67.

[0048] В некоторых вариантах реализации константный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичную последовательности SEQ ID NO:68.

[0049] В некоторых вариантах реализации константный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичную последовательности SEQ ID NO:69.

[0050] В некоторых вариантах реализации рекомбинантный гибридный белок может содержать тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичную последовательности SEQ ID NO:19. В некоторых вариантах реализации Fab содержит домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере

мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичную последовательности SEQ ID NO:10 (домен V_H-C_{H1}). В некоторых вариантах реализации Fab содержит домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичную последовательности SEQ ID NO:13 (домен V_L-C_к).

[0051] В некоторых вариантах реализации рекомбинантный гибридный белок может содержать тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичную последовательности SEQ ID NO:19; и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичную последовательности SEQ ID NO:13. Рекомбинантный белок может обладать значительно улучшенными фармакокинетическими свойствами при сохранении биологической активности, присущей IL-18BP.

[0052] В некоторых вариантах реализации Fab содержит домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичную последовательности SEQ ID NO:10 (домен V_H-C_{H1}), и домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичную SEQ ID NO: 13 (домен V-L_к).

[0053] В настоящем документе рекомбинантный гибридный белок содержит белок, связывающий интерлейкин-18, и антигенсвязывающий фрагмент против сывороточного альбумина. В некоторых вариантах реализации рекомбинантный гибридный белок содержит тяжелую цепь, содержащую 395 аминокислот, и легкую цепь, содержащую 215 аминокислот. В некоторых вариантах реализации гликозилирование в антигенсвязывающем фрагменте против сывороточного альбумина отсутствует, а в белке, связывающем ИЛ-18, присутствует 1, 2, 3 или 4 сайта N-гликозилирование и один

сайт О-гликозилирования. Таким образом, в некоторых вариантах реализации указанный рекомбинантный гибридный белок может включать гликозилирование.

[0054] В настоящем документе термин "белок, связывающий интерлейкин-18 (IL-18BP)" относится к белку, связывающемуся с ИЛ-18 и ингибирующему связывание ИЛ-18 и рецепторов ИЛ-18, т.е. проявляющему антагонистическое действие. Известно, что в крови здорового человека концентрация белка, связывающего ИЛ-18, в 20 раз превышает концентрацию ИЛ-18. У человека существует четыре изоформы белка, связывающего ИЛ-18: a, b, c и d. Известно, что среди этих четырех изоформ белки типа a и c, связывающие ИЛ-18, обладают высокой биологической активностью, т.е. высокой способностью связывать ИЛ-18, и демонстрируют перекрестную реакцию между ИЛ-18 человека и ИЛ-18 мыши. Изоформа a характеризуется количественным показателем связывания с ИЛ-18 человека, составляющим 399 пМ, что указывает на высокие уровни связывающей способности. IL-18BP может представлять собой немутированный природный белок или изоформу, которую можно получить из общедоступных баз данных или публикаций, см., например, Kim S.-H. et al., PNAS 97:1190-1195 (2000). В некоторых вариантах реализации IL-18BP содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичную последовательности SEQ ID NO:7. Белок, связывающий ИЛ-18, может содержать аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO:7. В некоторых вариантах реализации белок, связывающий ИЛ-18, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7. В некоторых вариантах реализации молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая белок, связывающий ИЛ-18, содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:8 или SEQ ID NO:9.

[0055] В настоящем документе термин «линкер» относится к пептиду, вставленному между белками, так что при получении рекомбинантного гибридного белка путем соединения белка, связывающего ИЛ-18, и Fab-фрагмента антитела против сывороточного альбумина можно повысить структурную гибкость этих белков для усиления активности каждого связанного белка. Ограничения на тип линкера или количество аминокислот отсутствуют, если это может свести к минимуму иммунные реакции. Например, линкер может содержать от 1 аминокислоты до 20 аминокислот, от 1 аминокислоты до 15 аминокислот, от 1 аминокислоты до 10 аминокислот или от 1 аминокислоты до 8 аминокислот. В некоторых вариантах реализации линкер может

присоединять белок, связывающий ИЛ-18, к С-концу области тяжелой цепи антигенсвязывающего фрагмента против сывороточного альбумина. Например, линкер может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO:16. Нуклеиновая кислота, кодирующая линкер, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:16, может быть представлена последовательностью SEQ ID NO:17 или SEQ ID NO:18.

[0056] В некоторых вариантах реализации линкер соединяет IL-18BP с С-концом константного домена тяжелой цепи, N-концом переменного домена тяжелой цепи, С-концом константного домена легкой цепи и/или N-концом переменного домена легкой цепи Fab. В некоторых вариантах реализации линкер соединяет IL-18BP с С-концом константного домена тяжелой цепи. В некоторых вариантах реализации линкер содержит от 1 до 50 аминокислот. В некоторых вариантах реализации линкер содержит аминокислотную последовательность согласно любой из SEQ ID NO:16 и 70-84.

[0057] Кроме того, линкер при необходимости можно соответствующим образом модифицировать для применения. Например, линкер может представлять собой полипептид, состоящий из от 1 до 50 или от 1 до 20 произвольно выбранных или конкретных аминокислот. Пептидный линкер может включать остатки Gly, Asn и Ser, а также может включать нейтральные аминокислоты, например, Thr и Ala. Аминокислотная последовательность, подходящая для пептидного линкера, известна в данной области техники. Регулировка количества копий «n» позволяет оптимизировать линкер для достижения соответствующего разрыва между функциональными фрагментами или для поддержания необходимого межгруппового взаимодействия. В данной области техники известны и другие линкеры, например, линкеры G и S, содержащие дополнительные аминокислотные остатки, например, T и A, для поддержания гибкости, а также полярные аминокислотные остатки для улучшения растворимости. Следовательно, линкер может представлять собой гибкий линкер, содержащий остатки G, S и/или T, A. Линкер может иметь общую формулу $(GpSs)_n$ или $(SpGs)_n$, где независимо друг от друга p представляет собой целое число от 1 до 10, s равен 0 или целому числу от 0 до 10, p + s представляет собой целое число, составляющее 20 или менее, а n представляет собой целое число от 1 до 20. Конкретнее, примеры линкера могут включать $(GGGGS)_n$ (SEQ ID NO:72), $(SGGGG)_n$ (SEQ ID NO:73), $(SRSSG)_n$ (SEQ ID NO:74), $(SGSSC)_n$ (SEQ ID NO:75), $(GKSSGSGSESKS)_n$ (SEQ ID NO:76), $(RPPPPC)_n$ (SEQ ID NO:77), $(SSPPPPC)_n$ (SEQ ID NO:78),

(GSTSGSGKSSEGKG)_n (SEQ ID NO:79), (GSTSGSGKSSEGSSTKG)_n (SEQ ID NO:80), (GSTSGSGKPGSGEGSTKG)_n (SEQ ID NO:81) или (EGKSSGSGSESKEF)_n (SEQ ID NO:82), где n может представлять собой целое число от 1 до 20 или от 1 до 10.

[0058] В настоящем документе термин «сывороточный альбумин» представляет собой один из белков, составляющих основные материалы клеток и играющих важную роль в поддержании осмотического давления между кровеносными сосудами и тканями, позволяя физиологическим жидкостям оставаться в кровеносных сосудах. Кроме того, термин «антигенсвязывающий фрагмент против сывороточного альбумина» может относиться к антителу против сывороточного альбумина или антигенсвязывающему фрагменту молекулы антитела, специфически связывающемуся с эпитопом сывороточного альбумина.

[0059] Антигенсвязывающий фрагмент антитела или фрагмент антитела относится к фрагменту, сохраняющему антигенсвязывающую функцию, и включает Fab, F(ab'), F(ab')₂, F_v и т.д. Fab-фрагмент антитела обладает структурой, включающей переменные области легкой цепи и тяжелой цепи, константную область легкой цепи и константную область (CH) тяжелой цепи с одним антигенсвязывающим сайтом. Fab' отличается от Fab тем, что содержит шарнирную область, содержащую один или более остатков цистеина на С-конце CH-домена тяжелой цепи. F(ab')₂-антитело получают, когда остаток цистеина шарнирной области Fab' образует дисульфидную связь. Рекомбинантные методики получения F_v-фрагментов с минимальными фрагментами антител, содержащими только переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, описаны в международных публикациях РСТ № WO88/10649, WO88/106630, WO88/07085, WO88/07086 и WO88/09344. В двуцепочечном F_v переменная область тяжелой цепи и переменная область легкой цепи соединены посредством нековалентной связи. В одноцепочечном F_v (scF_v) переменная область тяжелой цепи и переменная область легкой цепи обычно связаны ковалентной связью через пептидный линкер или непосредственно по С-концу. Таким образом, одноцепочечный F_v (scF_v) может характеризоваться такой структурой, как димер, аналогично двуцепочечному F_v. Такой фрагмент антитела можно получить с использованием фермента, гидролизующего белки (например, при расщеплении целого антитела папаином можно получить Fab, а при расщеплении целого антитела пепсином можно получить F(ab')₂-фрагмент), а также можно получить с помощью технологии рекомбинантных генов.

[0060] В некоторых вариантах реализации антигенсвязывающий фрагмент против сывороточного альбумина может содержать область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:10; и область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:13. В некоторых вариантах реализации молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:10, может характеризоваться нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:11 или 12. В некоторых вариантах реализации молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:13, может характеризоваться нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:14 или 15.

[0061] В настоящем документе термин «рекомбинантный гибридный белок» или «гибридный белок» относится к белку, в котором искусственно соединены два или более белков. В некоторых вариантах реализации рекомбинантный гибридный белок относится к белку, в котором белок, связывающий ИЛ-18, и антигенсвязывающий фрагмент против сывороточного альбумина, т.е. Fab-фрагмент антитела против сывороточного альбумина, соединены друг с другом. Такой рекомбинантный гибридный белок можно получить путем его экспрессии и очистки с помощью химического синтеза или способа генетической рекомбинации после определения каждого партнера. В некоторых вариантах реализации рекомбинантный гибридный белок можно получить путем экспрессии в клеточной системе экспрессии гибридного гена (экспрессирующем векторе), в котором соединены последовательность гена, кодирующего белок, связывающий ИЛ-18, и последовательность гена, кодирующего антигенсвязывающий фрагмент антитела против сывороточного альбумина. В указанном рекомбинантном гибридном белке белок, связывающий ИЛ-18, и Fab-фрагмент антитела против сывороточного альбумина соединены друг с другом непосредственно или посредством линкера. В некоторых вариантах реализации рекомбинантный гибридный белок может содержать тяжелую цепь, содержащую белок, связывающий ИЛ-18, линкер, область тяжелой цепи антигенсвязывающего фрагмента против сывороточного альбумина; и легкую цепь, содержащую область легкой цепи антигенсвязывающего фрагмента против сывороточного альбумина через нековалентную связь. Например, рекомбинантный гибридный белок может содержать пептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:19, и пептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:13.

[0062] В настоящем документе термины «антитело» и «антитела» являются терминами, используемыми в данной области техники, могут использоваться взаимозаменяемо в настоящем документе и относятся к молекуле, содержащей антигенсвязывающий сайт, специфично связывающийся с антигеном. Антитела могут включать, например, моноклональные антитела, антитела, полученные рекомбинантным путем, антитела человека, гуманизированные антитела, антитела с измененной поверхностью, химерные антитела, иммуноглобулины, синтетические антитела, тетрамерные антитела, содержащие две молекулы тяжелой цепи и две молекулы легкой цепи, мономер легкой цепи антитела, мономер тяжелой цепи антитела, димер легкой цепи антитела, димер тяжелой цепи антитела, пару "легкая цепь-тяжелая цепь антитела", интратела, антитела, представляющие собой гетероконъюгаты, однодоменные антитела, одновалентные антитела, одноцепочечные антитела или одноцепочечные Fv (scFv), камелизированные антитела, аффитела, Fab-фрагменты, F(ab')₂-фрагменты, Fv, связанные дисульфидными связями (sdFv), антиидиотипические (анти-Id) антитела (включая, например, антитела против анти-Id антител), биспецифичные антитела и мультиспецифичные антитела.

[0063] Антитела могут представлять собой молекулы иммуноглобулина любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA или IgY), любого класса (например, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ или IgA₂) или любого подкласса (например, IgG_{2a} или IgG_{2b}).

[0064] В настоящем документе термины «биоэффекторный фрагмент», «антигенсвязывающий домен», «антигенсвязывающая область», «антигенсвязывающий сайт» и аналогичные термины относятся к фрагментам рекомбинантного белка, содержащим аминокислотные остатки, обеспечивающие специфичность рекомбинантного белка по отношению к антигену (например, области, определяющие комплементарность (CDR)). Антигенсвязывающая область может происходить от животного любого вида, например, кошачьих, грызунов (например, мыши, крысы или хомяка) и человека.

[0065] В настоящем документе термины «вариабельная область» или «вариабельный домен» используются взаимозаменяемо и являются общепринятыми в данной области техники. Вариабельная область, как правило, относится к фрагменту антитела, обычно фрагменту легкой или тяжелой цепи, как правило, приблизительно к 110 - 120 аминокислотам на N-конце зрелой тяжелой цепи и приблизительно к 90 - 115 аминокислотам в зрелой легкой цепи, последовательность которого значительно различается между антителами и который используют для связывания и обеспечения специфичности конкретного антитела в отношении конкретного антигена.

Вариабельность последовательности сконцентрирована в областях, которые называются областями, определяющими комплементарность (CDR), в то время как более высококонсервативные области в вариабельном домене называются каркасными областями (FR). Без привязки к какому-либо конкретному механизму или теории, считается, что CDR легких и тяжелых цепей главным образом отвечают за взаимодействие и специфичность взаимодействия антитела с антигеном. В конкретных вариантах реализации вариабельная область представляет собой вариабельную область человека. В конкретных вариантах реализации вариабельная область содержит CDR грызуна или мыши и каркасные области (FR) человека. В конкретных вариантах реализации вариабельная область представляет собой вариабельную область примата (например, примата, не являющегося человеком). В конкретных вариантах реализации вариабельная область содержит CDR иммуноглобулина грызуна или мыши и каркасные области (FR) иммуноглобулина примата (например, примата, не являющегося человеком).

[0066] Термины «VL» и «VL-домен» применяются взаимозаменяемо и относятся к вариабельной области легкой цепи антитела. Термины «VH» и «VH-домен» применяются взаимозаменяемо и относятся к вариабельной области тяжелой цепи антитела.

[0067] В настоящем документе термин «тяжелая цепь (HC или CH)» относится как к полноразмерной тяжелой цепи, так и к ее фрагменту, причем полноразмерная тяжелая цепь содержит домен вариабельной области VH, включающий аминокислотную последовательность, содержащую последовательность вариабельной области (VR), достаточную для придания специфичности по отношению к антигену, и три домена константной области CH1, CH2 и CH3. В настоящем документе термин «легкая цепь (LC или CL)» относится как к полноразмерной легкой цепи, так и к ее фрагменту, причем полноразмерная легкая цепь содержит домен вариабельной области VL, включающий аминокислотную последовательность, содержащую последовательность VR, достаточную для придания специфичности по отношению к антигену, и домен константной области CL.

[0068] Константный домен тяжелой цепи и константный домен легкой цепи могут быть производными константного домена антитела IgG1, и в любом одном или более из них остаток цистеина, который представляет собой аминокислоту, используемую в дисульфидной связи между легкой цепью и доменом тяжелой цепи, может быть сохранен, удален или заменен аминокислотным остатком, отличным от цистеина.

Например, константный домен тяжелой цепи может содержать аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичную последовательности SEQ ID NO:68, а константный домен легкой цепи может содержать аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичную последовательности SEQ ID NO:69. Делеция или замена цистеина в указанном домене может способствовать повышению уровня экспрессии рекомбинантного белка в трансформированных клетках в процессе получения вышеупомянутого рекомбинантного белка. В некоторых вариантах реализации (i) один или более из остатков цистеина в константном домене тяжелой цепи и/или (ii) один или более из остатков цистеина в константном домене легкой цепи, расположенные в межцепочечной дисульфидной связи между легкой цепью и тяжелой цепью, сохранены, удалены и/или замещены аминокислотным остатком, отличным от цистеина.

[0069] Термин «нумерация по Кэбату (Kabat)» и подобные термины общеприняты в данной области техники и относятся к системе нумерации аминокислотных остатков в переменных областях тяжелой и легкой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. В конкретных аспектах CDR антитела можно определять в соответствии с системой нумерации по Кэбату (см., например, Kabat EA & Wu TT (1971) *Ann NY Acad Sci* 190: 382-391 and Kabat EA *et al.*, (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242). При использовании системы нумерации по Кэбату CDR в тяжелой цепи молекулы антитела, как правило, присутствуют в аминокислотных положениях от 31 до 35, которые необязательно могут включать одну или две дополнительные аминокислоты после 35 аминокислоты (называемые в системе нумерации по Кэбату 35A и 35B) (CDR1), аминокислотных положениях от 50 до 65 (CDR2) и аминокислотных положениях от 95 до 102 (CDR3). При использовании системы нумерации по Кэбату CDR в легкой цепи молекулы антитела, как правило, присутствуют в аминокислотных положениях от 24 до 34 (CDR1), аминокислотных положениях от 50 до 56 (CDR2) и аминокислотных положениях от 89 до 97 (CDR3). В некоторых вариантах реализации CDR антител, описанных в настоящем документе, определены в соответствии со схемой нумерации по Кэбату.

[0070] В настоящем документе термин «константная область» или «константный домен» являются взаимозаменяемыми и имеют общепринятое в данной области техники значение. Константная область представляет собой фрагмент антитела, например, С-концевой фрагмент легкой и/или тяжелой цепи, не вовлеченный непосредственно в связывание антитела с антигеном, но способный осуществлять различные эффекторные функции, например, взаимодействие с Fc-рецептором. Константная область молекулы иммуноглобулина в целом характеризуется более консервативной аминокислотной последовательностью по сравнению с вариабельным доменом иммуноглобулина.

[0071] В настоящем документе термин «тяжелая цепь» по отношению к антителу может относиться к тяжелой цепи любого отдельного типа, например, альфа (α), дельта (δ), эпсилон (ϵ), гамма (γ) и мю (μ), на основе аминокислотной последовательности константного домена, дающей начало классам антител IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, соответственно, включая подклассы IgG, например, IgG₁, IgG₂, IgG₃ и IgG₄.

[0072] В настоящем документе термин «легкая цепь» по отношению к антителу может относиться к легкой цепи любого отдельного типа, например, каппа (κ) или лямбда (λ), на основе аминокислотной последовательности константных доменов. Аминокислотные последовательности легких цепей хорошо известны в данной области техники. В конкретных вариантах реализации легкая цепь представляет собой легкую цепь иммуноглобулина человека.

[0073] «Аффинность связывания» в целом относится к суммарной силе нековалентных взаимодействий между одним сайтом связывания молекулы (например, антитела) и его партнером по связыванию (например, антигеном). Если не указано иное, в настоящем документе «аффинность связывания» относится к присущему молекулам сродству связывания, которое отражает взаимодействие между членами пары по связыванию (например, антителом и антигеном) при их соотношении 1:1. Аффинность молекулы X в отношении ее партнера Y в общем случае можно выражать с помощью константы диссоциации (K_D). Аффинность можно измерить и/или выразить с помощью ряда способов, известных в данной области техники, включая равновесную константу диссоциации (K_D) и равновесную константу ассоциации (K_A), но не ограничиваясь ими. K_D рассчитывают из отношения k_{off}/k_{on} , в то время как K_A рассчитывают из отношения k_{on}/k_{off} . k_{on} относится к константе скорости ассоциации, например, антитела с антигеном, а k_{off} относится к диссоциации, например, антитела с антигеном. k_{on} и k_{off} можно определить с помощью методик, известных специалисту в данной области техники, например, BIAcore[®] или KinExA.

[0074] В некоторых вариантах реализации средство связывания рекомбинантных гибридных белков, описанных в настоящем документе, представляет собой средство связывания, по меньшей мере в 1,5 раза, по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 6 раз, по меньшей мере в 7 раз, по меньшей мере в 8 раз, по меньшей мере в 9 раз, по меньшей мере в 10 раз или в пределах любого из этих диапазонов превышает средство IL-18BP_а человека, например, превышает его в 2 - 10 раз.

[0075] В настоящем документе «консервативная аминокислотная замена» представляет собой замену, при которой аминокислотный остаток замещен аминокислотным остатком со сходной боковой цепью. Семейства аминокислотных остатков, содержащих боковые цепи, заданы в данной области техники. Указанные семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислыми боковыми цепями (например, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин, триптофан), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). В конкретных вариантах реализации один или более аминокислотных остатков в CDR или в каркасной(ых) области(ях) антитела можно заменить аминокислотным остатком со сходной боковой цепью.

[0076] В настоящем документе «эпитоп» представляет собой термин, принятый в данной области техники, и относится к локализованной области антигена, с которой может специфично связываться антитело. Эпитоп может представлять собой, например, следующие друг за другом аминокислоты полипептида (линейный или непрерывный эпитоп), или эпитоп может, например, собираться из двух или более не следующих друг за другом областей полипептида или полипептидов (конформационный, нелинейный, прерывистый или не непрерывный эпитоп). В конкретных вариантах реализации эпитоп, с которым связывается антитело, можно определить, например, с помощью ЯМР-спектроскопии, исследований на основе рентгеноструктурной кристаллографии, твердофазного ИФА, масс-спектрометрии водородно-дейтериевого обмена (например, жидкостной хроматографии - масс-спектрометрии с электрораспылением), сканирующего анализа олигопептидов на основе чипа и/или картирования при мутагенезе (например, картирования при сайт-

специфическом мутагенезе). В случае рентгеноструктурной кристаллографии кристаллизацию можно выполнять с использованием способов, известных в данной области техники (см., например, Giegé R *et al.*, (1994) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 50(Pt 4):339-350; McPherson A (1990) *Eur J Biochem* 189:1-23; Chayen NE (1997) *Structure* 5:1269-1274; McPherson, A. (1976) *J. Biol. Chem.* 251:6300-6303). Кристаллы антитело:антиген можно изучать с использованием хорошо известных методик рентгеноструктурного анализа, их структуру можно уточнять с использованием компьютерного программного обеспечения, например, X-PLOR (Йельский Университет, 1992 г., поставляется компанией Molecular Simulations, Inc.; см., например, *Meth Enzymol* (1985) volumes 114 & 115, eds Wyckoff HW *et al.*,; U.S. 2004/0014194) и BUSTER (Bricogne G (1993) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 49 (Pt 1):37-60; Bricogne G (1997) *Meth Enzymol* 276A:361-423, ed Carter CW; Roversi P *et al.*, (2000) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 56 (Pt 10):1316-1323). Исследования по картированию при мутагенезе можно выполнять с использованием способов, известных специалисту в данной области техники. Описание методик мутагенеза, включая методики мутагенеза со сканированием аланином, см., например, в источниках Champe M *et al.*, (1995) *J Biol Chem* 270:1388-1394, и Cunningham BC & Wells JA (1989) *Science* 244:1081-1085. В некоторых вариантах реализации эпитоп антитела определяют с помощью исследований на основе мутагенеза со сканированием аланином.

[0077] В настоящем документе термины «иммуноспецифично связывается», «иммуноспецифично распознает», «специфично связывается» и «специфично распознает» являются аналогичными терминами при употреблении в отношении антител и относятся к молекулам, связывающимся с антигеном (например, эпитопом, иммунным комплексом или партнером антигенсвязывающего сайта по связыванию) в соответствии с понятием связывания с точки зрения специалиста в данной области техники. Например, молекула, специфично связывающаяся с антигеном, может связываться с другими пептидами или полипептидами, обычно с более низким сродством по результатам определения, например, с помощью иммуноанализа, прибора VIAcore[®], KinExA 3000 (Sapidyne Instruments, Бойсе, штат Айдахо, США) или других анализов, известных в данной области техники. В некоторых вариантах реализации молекулы, иммуноспецифично связывающиеся с антигеном, связываются с антигеном с K_A , которая по меньшей мере на 2 порядка, 2,5 порядка, 3 порядка, 4 порядка или более превышает K_A при связывании указанной молекулы с другим антигеном.

[0078] В некоторых вариантах реализации молекулы, иммуноспецифично связывающиеся с антигеном, не реагируют перекрестно с другими белками при сходных условиях связывания. В некоторых вариантах реализации молекулы, иммуноспецифично связывающиеся с антигеном, не реагируют перекрестно с другими белками. В некоторых вариантах реализации рекомбинантные белки связываются с указанным антигеном с более высоким сродством по сравнению с другим неродственным антигеном. В конкретных вариантах реализации в настоящем документе предложен рекомбинантный белок, связывающийся с указанным антигеном (например, человеческим сывороточным альбумином) со сродством, на 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или более превышающим сродство связывания с другим неродственным антигеном по результатам измерения, например, с помощью радиоиммуноанализа, поверхностного плазмонного резонанса или анализа кинетического исключения. В некоторых вариантах реализации степень связывания рекомбинантного белка, описанного в настоящем документе, с неродственным белком составляет менее 10%, 15% или 20% от связывания антитела с указанным антигеном по результатам измерения с помощью, например, радиоиммуноанализа.

[0079] В некоторых вариантах реализации в настоящем документе предложены рекомбинантные белки, связывающиеся с антигеном различных видов животных, например, кошачьих, грызунов (например, мыши, крысы или хомяка) и человека. В некоторых вариантах реализации в настоящем документе предложены рекомбинантные белки, связывающиеся с антигеном человека с более высоким сродством по сравнению с антигенами других видов животных. В конкретных вариантах реализации в настоящем документе предложены рекомбинантные белки, связывающиеся с антигеном человека со сродством, на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% или более превышающим сродство связывания с антигенами других видов животных по результатам измерения, например, с помощью радиоиммуноанализа, поверхностного плазмонного резонанса или анализа кинетического исключения. В некоторых вариантах реализации рекомбинантные белки, описанные в настоящем документе, связывающиеся с антигеном человека, связываются с антигенными белками других видов животных со сродством, составляющим менее чем 10%, 15% или 20% от сродства связывания антитела с антигенным белком человека, по результатам измерения с помощью, например, радиоиммуноанализа, поверхностного плазмонного резонанса или анализа кинетического исключения.

[0080] В настоящем документе термин «клетка-хозяин» может представлять собой клетку любого типа, например, первичную клетку, клетку в культуре или клетку из линии клеток. В некоторых вариантах реализации термин «клетка-хозяин» относится к клетке, трансфицированной молекулой нуклеиновой кислоты, и потомству или потенциальному потомству такой клетки. Потомство такой клетки может не быть идентичным исходной клетке, трансфицированной молекулой нуклеиновой кислоты, например, в связи с мутациями или воздействием окружающей среды, которые могут возникать в последующих поколениях, или встраиванием молекулы нуклеиновой кислоты в геном клетки-хозяина.

[0081] В конкретных аспектах рекомбинантный белок, описанный в настоящем документе, можно описать только по его VL-домену или только по его VH-домену или только по его 3 CDR VL или только по его 3 CDR VH. См., например, статью Rader C *et al.*, (1998) PNAS 95: 8910-8915, полностью включенную в настоящий документ посредством ссылки, в которой описана гуманизация антитела мыши против $\alpha\beta 3$ путем идентификации комплементарной легкой цепи или тяжелой цепи, соответственно, из библиотеки легких цепей или тяжелых цепей человека с получением вариантов гуманизированного антитела, обладающих столь же высоким или более высоким сродством по сравнению с исходным антителом. См. также статью Clackson T *et al.*, (1991) Nature 352:624-628, полностью включенную в настоящий документ посредством ссылки, в которой описаны способы получения антител, связывающихся со специфичным антигеном с помощью специфичного VL-домена (или VH-домена), и скрининга библиотеки для поиска комплементарных переменных доменов. В результате скрининга получили 14 новых партнеров для специфичного VH-домена и 13 новых партнеров для специфичного VL-домена, которые представляли собой сильные связывающие агенты по результатам твердофазного ИФА. См. также статью Kim SJ & Hong HJ, (2007) J Microbiol 45:572-577, полностью включенную в настоящий документ посредством ссылки, в которой описаны способы получения антител, связывающихся со специфичным антигеном с помощью специфичного VH-домена, и скрининга библиотеки (например, библиотеки VL человека) для поиска комплементарных VL-доменов; выбранные VL-домены, в свою очередь, можно применять как руководство при выборе дополнительных комплементарных VH-доменов (например, человека).

[0082] В конкретных аспектах CDR антитела можно определять в соответствии с системой нумерации Чотиа, которая относится к расположению структурных петель иммуноглобулина (см., например, Chothia C & Lesk AM, (1987), J Mol Biol 196: 901-917;

Al-Lazikani B *et al.*, (1997) J Mol Biol 273: 927-948; Chothia C *et al.*, (1992) J Mol Biol 227: 799-817; Tramontano A *et al.*, (1990) J Mol Biol 215(1): 175-82; и патент США №. 7709226). Как правило, при использовании правил нумерации Кэбата, петля CDR-H1 по нумерации Чотиа находится в области аминокислот 26 - 32, 33 или 34 тяжелой цепи, петля CDR-H2 по нумерации Чотиа находится в области аминокислот 52 - 56 тяжелой цепи, а петля CDR-H3 по нумерации Чотиа находится в области аминокислот 95 - 102 тяжелой цепи, в то время как петля CDR-L1 по нумерации Чотиа находится в области аминокислот 24 - 34 легкой цепи, петля CDR-L2 по нумерации Чотиа находится в области аминокислот 50 - 56 легкой цепи, а петля CDR-L3 по нумерации Чотиа находится в области аминокислот 89 - 97 легкой цепи. Конец петли CDR-H1 по нумерации Чотиа (Chothia) при нумерации с использованием правил Кэбата варьирует между H32 и H34 в зависимости от длины петли (в связи с тем, что в соответствии с системой нумерации Кэбата в H35A и H35B внесены инсерции; если отсутствуют и 35A, и 35B, петля заканчивается на 32; если присутствует только 35A, петля заканчивается на 33; если присутствуют 35A и 35B, петля заканчивается на 34 аминокислоте).

[0083] В конкретных аспектах в настоящем документе предложены рекомбинантные белки, специфично связывающиеся с сывороточным альбумином (например, человеческим сывороточным альбумином) и содержащие CDR VL согласно Чотиа в составе VL. В конкретных аспектах в настоящем документе предложены антитела, специфично связывающиеся с сывороточным альбумином (например, человеческим сывороточным альбумином) и содержащие в CDR VH согласно Чотиа в составе VH. В конкретных аспектах в настоящем документе предложены антитела, специфично связывающиеся с сывороточным альбумином (например, человеческим сывороточным альбумином), содержащие CDR VL согласно Чотиа в составе VL и содержащие в CDR VH согласно Чотиа в составе VH. В конкретных вариантах реализации антитела, специфично связывающиеся с сывороточным альбумином (например, человеческим сывороточным альбумином), содержат один или более CDR, причем CDR по системе нумерации Чотиа и по системе нумерации Кэбата содержат одинаковую аминокислотную последовательность. В конкретных вариантах реализации в настоящем документе предложены антитела, специфично связывающиеся с сывороточным альбумином и содержащие комбинации CDR по системе нумерации Кэбата и CDR по системе нумерации Чотиа.

[0084] В конкретных аспектах CDR антитела можно определить в соответствии с системой нумерации IMGT, описанной в источнике Lefranc M-P, (1999) The

Immunologist 7: 132-136 и Lefranc M-P *et al.*, (1999) Nucleic Acids Res 27: 209-212. В соответствии со схемой нумерации IMGT, CDR1 VH находится в положениях 26 - 35, CDR2 VH находится в положениях 51 - 57, CDR3 VH находится в положениях 93 - 102, CDR1 VL находится в положениях 27 - 32, CDR2 VL находится в положениях 50 - 52, а CDR3 VL находится в положениях 89 - 97.

[0085] В конкретных аспектах CDR антитела можно определить в соответствии со статьей MacCallum RM *et al.*, (1996) J Mol Biol 262: 732-745. См. также, например, Martin A. "Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains," в *Antibody Engineering*, Kontermann and Dübel, eds., Chapter 31, pp. 422-439, Springer-Verlag, Berlin (2001).

[0086] В конкретных аспектах CDR антитела можно определить в соответствии со схемой нумерации AbM, относящейся к гипервариабельным областям AbM, которая представляет собой компромисс между CDR по Кэбату и структурными петлями по Чотиа и используется в программном обеспечении для моделирования антител AbM Oxford Molecular (Oxford Molecular Group, Inc.).

[0087] В некоторых вариантах реализации положение одного или более CDR в VH- (например, CDR1, CDR2 или CDR3) и/или VL-области (например, CDR1, CDR2 или CDR3) антитела, описанного в настоящем документе, может варьировать в пределах одного, двух, трех, четырех, пяти или шести аминокислотных положений, при условии сохранения иммуноспецифичного связывания с антигеном (например, при условии что иммуноспецифичное связывание сохраняется по существу, например, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%). Например, положение, определяющее CDR антитела, описанного в настоящем документе, может варьировать в результате сдвига границы N-конца и/или C-конца CDR на одну, две, три, четыре, пять или шесть аминокислот по сравнению с положением CDR антитела, описанного в настоящем документе, при условии сохранения иммуноспецифичного связывания с антигеном(ами) (например, при условии что иммуноспецифичное связывание сохраняется по существу, например, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%). В других вариантах реализации длина одного или более CDR в VH- (например, CDR1, CDR2 или CDR3) и/или VL-области (например, CDR1, CDR2 или CDR3) антитела, описанного в настоящем документе, может варьировать (например, быть короче или длиннее) на одну, две, три, четыре, пять, или более аминокислот, при

условии сохранения иммуноспецифичного связывания с антигеном(ами) (например, при условии что иммуноспецифичное связывание сохраняется по существу, например, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%).

[0088] В некоторых вариантах реализации CDR1 VL, CDR2 VL, CDR3 VL, CDR1 VH, CDR2 VH и/или CDR3 VH, описанные в настоящем документе, могут быть на одну, две, три, четыре, пять или более аминокислот короче, чем один или более из CDR, описанных в настоящем документе, при условии сохранения иммуноспецифичного связывания с антигеном(ами) (например, при условии что иммуноспецифичное связывание сохраняется по существу, например, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%). В других вариантах реализации CDR1 VL, CDR2 VL, CDR3 VL, CDR1 VH, CDR2 VH и/или CDR3 VH, описанные в настоящем документе, могут быть на одну, две, три, четыре, пять или более аминокислот длиннее, чем один или более из CDR, описанных в настоящем документе, при условии сохранения иммуноспецифичного связывания с антигеном(ами) (например, при условии что иммуноспецифичное связывание сохраняется по существу, например, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%). В других вариантах реализации N-конец CDR1 VL, CDR2 VL, CDR3 VL, CDR1 VH, CDR2 VH и/или CDR3 VH, описанных в настоящем документе, может быть удлинен на одну, две, три, четыре, пять или более аминокислот по сравнению с одним или более из CDR, описанных в настоящем документе, при условии сохранения иммуноспецифичного связывания с антигеном(ами) (например, при условии что иммуноспецифичное связывание сохраняется по существу, например, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%). В других вариантах реализации C-конец CDR1 VL, CDR2 VL, CDR3 VL, CDR1 VH, CDR2 VH и/или CDR3 VH, описанных в настоящем документе, может быть удлинен на одну, две, три, четыре, пять или более аминокислот по сравнению с одним или более из CDR, описанных в настоящем документе, при условии сохранения иммуноспецифичного связывания с антигеном(ами) (например, при условии что иммуноспецифичное связывание сохраняется по существу, например, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%). В других вариантах

реализации N-конец CDR1 VL, CDR2 VL, CDR3 VL, CDR1 VH, CDR2 VH и/или CDR3 VH, описанных в настоящем документе, может быть укорочен на одну, две, три, четыре, пять или более аминокислот по сравнению с одним или более из CDR, описанных в настоящем документе, при условии сохранения иммуноспецифичного связывания с антигеном(ами) (например, при условии что иммуноспецифичное связывание сохраняется по существу, например, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%). В некоторых вариантах реализации C-конец CDR1 VL, CDR2 VL, CDR3 VL, CDR1 VH, CDR2 VH, и/или CDR3 VH, описанных в настоящем документе, может быть укорочен на одну, две, три, четыре, пять или более аминокислот по сравнению с одним или более из CDR, описанных в настоящем документе, при условии сохранения иммуноспецифичного связывания с антигеном(ами) (например, при условии что иммуноспецифичное связывание сохраняется по существу, например, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%). Для проверки сохранения иммуноспецифичного связывания с антигеном(ами) можно использовать любой способ, известный в данной области техники, например, анализы связывания и условия, описанные в разделе «Примеры» в настоящем документе.

[0089] Определение процентной идентичности между двумя последовательностями (например, аминокислотными последовательностями или нуклеотидными последовательностями) также можно выполнять с использованием математического алгоритма. Конкретный неограничивающий пример математического алгоритма, используемого для сравнения двух последовательностей, представляет собой алгоритм, описанный в статье Karlin S & Altschul SF (1990) PNAS 87:2264-2268 и модифицированный согласно статье Karlin S & Altschul SF (1993) PNAS 90: 5873-5877. Такой алгоритм включен в программы NBLAST. и XBLAST., описанные в статье Altschul SF *et al.*, (1990) J Mol Biol 215: 403. Поиск нуклеотидных последовательностей BLAST. можно выполнять с использованием установленных параметров для программы поиска нуклеотидных последовательностей NBLAST., например, балльная оценка=100, длина слова=12, с получением нуклеотидных последовательностей, гомологичных молекулам нуклеиновой кислоты, описанным в настоящем документе. Поиск белков BLAST. можно выполнять с помощью установленных параметров для программы XBLAST., например, балльная оценка=50, длина слова=3, с получением аминокислотных последовательностей, гомологичных молекуле белка, описанной в

настоящем документе. Для достижения выравнивания с пропусками в целях сравнения можно использовать программу Gapped BLAST, описанную в Altschul SF *et al.*, (1997) Nuc Acids Res 25: 3389-3402. В качестве альтернативы, можно использовать PSI BLAST для выполнения поиска с итерациями, позволяющего обнаружить отдаленное родство между молекулами (*Id.*). При использовании программ BLAST, Gapped BLAST и PSI BLAST можно использовать параметры по умолчанию соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST) (см., например, базу данных Национального центра биотехнологической информации (National Center for Biotechnology Information, NCBI, всемирная сеть, ncbi.nlm.nih.gov). Еще один конкретный неограничивающий пример математического алгоритма, используемого для сравнения последовательностей, представляет собой алгоритм, описанный в статье Myers and Miller, 1988, CABIOS 4:11-17. Такой алгоритм встроен в программу ALIGN (версия 2.0), которая является частью программного пакета GCG для выравнивания последовательностей. При использовании программы ALIGN для сравнения аминокислотных последовательностей можно использовать таблицу весов остатков РАМ120, штраф за удлинение пропуска, составляющий 12, и штраф за пропуск, составляющий 4.

[0090] Процентную идентичность между двумя последовательностями можно определить с использованием методик, аналогичных методикам, описанным выше, с разрешением или без разрешения пропусков. При расчете процентной идентичности, как правило, учитывают только точные совпадения.

[0091] Рекомбинантные белки, описанные в настоящем документе, можно объединять или конъюгировать (например, ковалентно или нековалентно связывать) с детектируемой меткой или веществом. Примеры детектируемых меток или веществ включают ферментативные метки, например, глюкозооксидазу; радиоактивные изотопы, например, иод (^{125}I , ^{121}I), углерод (^{14}C), серу (^{35}S), тритий (^3H), индий (^{121}In) и технеций (^{99}Tc); люминесцентные метки, например, люминол; и флуоресцентные метки, например, флуоресцеин, родамин и биотин. Такие меченные антитела можно использовать для обнаружения антигенных белков.

Получение антитела

[0092] В соответствии с одним типичным вариантом реализации, получали рекомбинантный белок (АРВ-R3), причем указанный рекомбинантный белок (АРВ-R3) содержит антигенсвязывающий фрагмент, связывающийся с человеческим

сывороточным альбумином, причем указанный антигенсвязывающий фрагмент связан с константным доменом тяжелой цепи и константным доменом легкой цепи; и PL-18BP, связанный с константным доменом тяжелой цепи. Подтверждено, что указанный рекомбинантный белок получали с высоким выходом при сохранении биологической активности, присущей соответствующим факторам.

[0093] В других аспектах предложены способы получения рекомбинантного белка, включающие (а) культивирование клеток; и (b) выделение рекомбинантного белка из культивируемых клеток. Клетки можно культивировать в различных средах. В качестве культуральной среды можно без ограничения использовать коммерчески доступную среду. Все другие основные добавки, известные специалистам в данной области техники, также можно включать в соответствующих концентрациях. Условия культивирования, например, температура, рН и т.д., представляют собой условия, ранее использовавшиеся для клетки-хозяина, выбранной для экспрессии, и очевидные для специалистов в данной области техники. Выделение рекомбинантных белков можно выполнять путем удаления примесей, например, центрифугированием или ультрафильтрацией, и очистки полученного продукта, например, с помощью аффинной хроматографии и т.д. Можно использовать другие дополнительные методики очистки, например, анионообменную или катионообменную хроматографию, хроматографию с гидрофобным взаимодействием, хроматографию на гидроксипатите и т.д.

[0094] Рекомбинантные белки, описанные в настоящем документе, можно получать с помощью любого способа синтеза антител, известного в данной области техники, например, с помощью химического синтеза или с помощью методик рекомбинантной экспрессии. В способах, описанных в настоящем документе, если не указано иное, используют стандартные методики в области молекулярной биологии, микробиологии, генетического анализа, технологии рекомбинантных ДНК, органической химии, биохимии, ПЦР, синтеза и модификации олигонуклеотидов, гибридизации нуклеиновых кислот и родственных областях в пределах уровня навыков специалиста в данной области техники. Указанные методики описаны, например, в ссылках, цитированных в настоящем документе, и полностью разъясняются в литературе. См., например, Maniatis T *et al.*, (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sambrook J *et al.*, (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sambrook J *et al.*, (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel FM *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons (1987

and annual updates); Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons (1987 and annual updates) Gait (ed.) (1984) Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press; Eckstein (ed.) (1991) Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, IRL Press; Birren B *et al.*, (eds.) (1999) Genome Analysis: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

[0095] В некоторых вариантах реализации рекомбинантные белки, описанные в настоящем документе, представляют собой антитела (например, рекомбинантные антитела), полученные, экспрессированные, созданные или выделенные с помощью любого способа, включающего создание, например, посредством синтеза или генной инженерии последовательностей ДНК. В конкретных вариантах реализации такие антитела содержат последовательности (например, последовательности ДНК или аминокислотные последовательности), не существующие в естественных условиях в пределах зародышевого репертуара антител животного или млекопитающего (например, человека) *in vivo*.

[0096] В некоторых аспектах в настоящем документе предложены способы изготовления рекомбинантных белков, описанных в настоящем документе, включающие культивирование клетки или клетки-хозяина, описанной в настоящем документе. В некоторых аспектах в настоящем документе предложены способы изготовления рекомбинантного белка, включающие экспрессию (например, рекомбинантную экспрессию) антител с использованием клетки или клетки-хозяина, описанной в настоящем документе (например, клетки или клетки-хозяина, содержащей полинуклеотиды, кодирующие антитело, описанное в настоящем документе). В некоторых вариантах реализации клетка представляет собой выделенную клетку. В некоторых вариантах реализации в клетку введены экзогенные полинуклеотиды. В некоторых вариантах реализации указанный способ также включает очистку антитела, полученного из клетки или клетки-хозяина.

[0097] Антитела можно получать с использованием широкого спектра методик, известных в данной области техники, включая применение гибридомы, рекомбинантных технологий и технологий фагового дисплея или их комбинации. Например, моноклональные антитела можно получать с использованием гибридомных методик, включая методики, известные в данной области техники и изложенные, например, в источниках Harlow E & Lane D, *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling GJ *et al.*, in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981). В настоящем документе термин

«моноклональное антитело» не ограничивается антителами, полученными с помощью гибридной технологии. Например, моноклональные антитела можно получать рекомбинантным путем из клеток-хозяев, экзогенно экспрессирующих антитело, описанное в настоящем документе.

[0098] В настоящем документе «моноклональное антитело» представляет собой антитело, продуцированное одной клеткой (например, гибридной или клеткой-хозяином, продуцирующей рекомбинантное антитело), причем указанное антитело иммуноспецифично связывается с антигеном (например, человеческим сывороточным альбумином) по результатам определения, например, с помощью твердофазного ИФА или другого анализа связывания антигена или конкурентного связывания, известного в данной области техники или описанного в примерах, предложенных в настоящем документе. В конкретных вариантах реализации моноклональное антитело может представлять собой химерное антитело или гуманизированное антитело. В конкретных вариантах реализации моноклональное антитело представляет собой одновалентное антитело или поливалентное (например, бивалентное) антитело. В конкретных вариантах реализации моноклональное антитело может представлять собой Fab-фрагмент или F(ab')₂-фрагмент. Моноклональные антитела, описанные в настоящем документе, например, можно получать с помощью гибридного способа, описанного в статье Kohler G & Milstein C (1975) Nature 256: 495, или, например, можно выделять из фаговых библиотек, например, с использованием методик, описанных в настоящем документе. Другие способы получения клональных клеточных линий и моноклональных антител, экспрессированных таким образом, хорошо известны в данной области техники (см., например, главу 11 в источнике: Short Protocols in Molecular Biology, (2002) 5th Ed., Ausubel FM *et al.*, выше).

[0099] Способы получения и скрининга специфичных антител с использованием гибридной технологии являются стандартными и хорошо известны в данной области техники. Например, в соответствии с гибридным методом мышь или другое подходящее животное-хозяина, например, овцу, козу, кролика, крысу, хомяка или макака иммунизируют с целью стимуляции лимфоцитов, продуцирующих или способных продуцировать антитела, специфично связывающиеся с антигеном (например, человеческим сывороточным альбумином), используемым для иммунизации. В качестве альтернативы, лимфоциты можно иммунизировать *in vitro*. Затем лимфоциты сливают с клетками миеломы с использованием подходящих агентов для слияния, например, полиэтиленгликоля, с образованием гибридной клетки (Goding

JW (ред.), *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)). Кроме того, для иммунизации животного можно использовать способ RIMMS (повторной иммунизации в нескольких областях) (Kilpatrick KE *et al.*, (1997) *Hybridoma* 16:381-9, полностью включенный посредством ссылки).

[0100] Антитела, описанные в настоящем документе, можно создавать с помощью любой методики, известной специалистам в данной области техники. Например, фрагменты Fab и F(ab')₂, описанные в настоящем документе, можно получать путем протеолитического расщепления молекул иммуноглобулинов с использованием ферментов, например, папаина (для получения Fab-фрагментов) или пепсина (для получения F(ab')₂-фрагментов). Fab-фрагмент соответствует одному из двух идентичных плеч тетрамерной молекулы антитела и содержит полную размерную легкую цепь, спаренную с VH- и CH1-доменами тяжелой цепи. F(ab')₂-фрагмент содержит два антигенсвязывающих плеча тетрамерной молекулы антитела, связанные с помощью дисульфидных связей в шарнирной области.

[0101] Кроме того, антитела, описанные в настоящем документе, также можно получать с использованием различных методов фагового дисплея, известных в данной области техники. В методах фагового дисплея белки экспонируют на поверхности фаговых частиц, содержащих кодирующие их полинуклеотидные последовательности. В частности, последовательности ДНК, кодирующие VH- и VL-домены, амплифицируют из библиотек кДНК (например, библиотек кДНК из поврежденных тканей человека или мыши). Рекомбинацию ДНК, кодирующей VH- и VL-домены, выполняют вместе с линкером scFv с помощью ПЦР и клонируют в фагмидный вектор. Вектор вводят в *E. coli* с помощью электропорации, указанную *E. coli* инфицируют фагом-помощником. Фаг, используемый в указанных способах, как правило, представляет собой нитевидный фаг, включая фаги fd и M13, а VH- и VL-домены, как правило, объединяют рекомбинантным путем с геном III или с геном VIII фага. Фаг, экспрессирующий антитело, связывающееся с конкретным антигеном, можно выбрать или выявить с помощью антигена, например, с использованием меченого антигена или антигена, присоединенного или захваченного на твердой поверхности или грануле. Примеры методов фагового дисплея, которые можно использовать для получения антител, описанных в настоящем документе, включают способы, описанные в следующих источниках: Brinkman U *et al.*, (1995) *J Immunol Methods* 182: 41-50; Ames RS *et al.*, (1995) *J Immunol Methods* 184: 177-186; Kettleborough CA *et al.*, (1994) *Eur J Immunol* 24: 952-958; Persic L *et al.*, (1997) *Gene* 187: 9-18; Burton DR & Barbas CF (1994) *Advan Immunol*

57: 191-280; публикациях PCT/GB91/001134; WO90/02809, WO91/10737, WO92/01047, WO92/18619, WO93/11236, WO95/15982, WO95/20401 и WO97/13844; и патентах США № 5698426, 5223409, 5403484, 5580717, 5427908, 5750753, 5821047, 5571698, 5427908, 5516637, 5780225, 5658727, 5733743 и 5969108.

[0102] Как описано в вышеприведенных источниках, после отбора фага области, кодирующие антитело, можно выделить из указанного фага и применять для получения антител, включая антитела человека, и экспрессировать в любом желательном хозяине, включая клетки млекопитающих, клетки насекомых, клетки растений, дрожжи и бактерии, например, как описано ниже. Методики рекомбинантной продукции антител, например, Fab-, Fab'- и F(ab')₂-фрагментов, также можно использовать с помощью способов, известных в данной области техники, например, способов, описанных в международной публикации WO92/22324; источниках Mullinax RL *et al.*, (1992) *BioTechniques* 12(6): 864-9; Sawai H *et al.*, (1995) *Am J Reprod Immunol* 34: 26-34; и Better M *et al.*, (1988) *Science* 240: 1041-1043.

[0103] В некоторых аспектах для получения антител, например, scFv-клонов, можно использовать ПЦР-праймеры, содержащие нуклеотидные последовательности VH или VL, сайт рестрикции и фланкирующую последовательность для защиты указанного сайта рестрикции, для амплификации последовательностей VH или VL с матрицы. С использованием методик клонирования, известных специалистам в данной области техники, амплифицированные с помощью ПЦР VH-домены можно клонировать в векторы, экспрессирующие константную область VH, а амплифицированные с помощью ПЦР VL-домены можно клонировать в векторы, экспрессирующие константную область VL, например, константные области каппа- или лямбда-цепи иммуноглобулина человека. VH- и VL-домены также можно клонировать в один вектор, экспрессирующий необходимые константные области. Затем векторы для конверсии тяжелой цепи и векторы для конверсии легкой цепи совместно трансфицируют в линии клеток для получения стабильных или временных линий клеток, экспрессирующих антитела, например, IgG, с использованием методик, известных специалистам в данной области техники.

[0104] Химерное антитело представляет собой молекулу, в которой различные части антитела происходят из различных молекул иммуноглобулинов. Например, химерное антитело может содержать переменную область моноклонального антитела человека, объединенную с константной областью антитела человека. Способы продукции химерных антител известны в данной области техники. См., например, Morrison SL

(1985) Science 229: 1202-7; Oi VT & Morrison SL (1986) BioTechniques 4: 214-221; Gillies SD *et al.*, (1989) J Immunol Methods 125: 191-202; и патенты США № 5807715, 4816567, 4816397 и 6331415.

Полинуклеотиды, векторы и клетки

[0105] В настоящем документе описаны молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие рекомбинантные белки, описанные в настоящем документе.

[0106] В настоящем документе описаны экспрессирующие векторы, содержащие молекулы нуклеиновой кислоты, описанные в настоящем документе.

[0107] В настоящем документе описаны клетки, трансформированные экспрессирующими векторами, описанными в настоящем документе.

[0108] Поскольку нуклеиновая кислота, экспрессирующий вектор и трансформированная клетка включают вышеописанный рекомбинантный белок или нуклеиновую кислоту, кодирующую указанный рекомбинантный белок, как он есть, или они используют этот белок или нуклеиновую кислоту, общие для них описания будут опущены.

[0109] Например, в некоторых аспектах рекомбинантный белок можно продуцировать путем выделения нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный белок. Нуклеиновую кислоту выделяют и вводят в реплицируемый вектор для выполнения дополнительного клонирования (амплификации ДНК) или дополнительной экспрессии. На основании этого, другие аспекты относятся к вектору, содержащему указанную нуклеиновую кислоту.

[0110] В настоящем документе термин «нуклеиновая кислота» или «молекула нуклеиновой кислоты» исчерпывающим образом включает ДНК (гДНК и кДНК) и молекулы РНК, а нуклеотиды в качестве основных единиц нуклеиновой кислоты включают не только природные нуклеотиды, но и их аналоги, содержащие модифицированные углеводные группы или группы оснований.

[0111] Подразумевается, что нуклеиновая кислота включает нуклеотидную последовательность, демонстрирующую существенную идентичность с указанной нуклеотидной последовательностью. Существенная идентичность означает нуклеотидную последовательность, демонстрирующую по меньшей мере 80% гомологию, конкретнее, по меньшей мере 90% гомологию и наиболее конкретно, по меньшей мере 95% гомологию при выравнивании нуклеотидной последовательности согласно настоящему изобретению и другой необязательной последовательности таким

образом, чтобы они максимально соответствовали друг другу, и анализе выровненных последовательностей с помощью алгоритма, обычно используемого в данной области техники.

[0112] ДНК, кодирующую рекомбинантный белок, легко выделяют или синтезируют с использованием обычного процесса (например, с использованием олигонуклеотидного зонда, способного специфично связываться с ДНК, кодирующей рекомбинантный белок). Доступно большое количество векторов. Компоненты вектора обычно включают одно или более из: сигнальной последовательности, сайта инициации репликации, одного или более из маркерных генов, энхансерного элемента, промотора и последовательности терминации транскрипции, но не ограничиваются ими.

[0113] В настоящем документе термин «вектор» включает в качестве средства для экспрессии гена-мишени в клетке-хозяине плазмидные векторы; космидные векторы; вирусные векторы, например, векторы на основе бактериофагов, аденовирусные векторы, ретровирусные векторы, векторы на основе аденоассоциированного вируса и т.д. В векторе нуклеиновая кислота, кодирующая рекомбинантный белок, функционально связана с промотором.

[0114] «Функционально связан» относится к функциональной связи между последовательностью для управления экспрессией нуклеиновой кислоты (например, промотором, сигнальной последовательностью, массивом сайтов связывания фактора регуляции транскрипции) и другой нуклеотидной последовательностью, посредством которой управляющая последовательность направляет транскрипцию и/или трансляцию указанной другой нуклеотидной последовательности.

[0115] При использовании прокариотической клетки в качестве хозяина в состав вектора обычно включают мощный промотор, способный управлять транскрипцией (например, промотор *tac*, промотор *lac*, промотор *lacUV5*, промотор *lpp*, промотор *pLλ*, промотор *pRλ*, промотор *gac5*, промотор *amp*, промотор *gcsA*, промотор *SP6*, промотор *trp* и промотор *T7* и т. д.), сайт связывания рибосом для инициации трансляции и последовательность терминации транскрипции/трансляции. Например, при использовании эукариотической клетки в качестве хозяина можно использовать промотор, полученный из генома клетки млекопитающего (например, промотор металлотioneина, промотор β-актина, промотор гемоглобина человека и промотор креатина мышц человека), или промотор, полученный из вирусов млекопитающих (например, поздний промотор аденовируса, промотор 7.5K вируса коровьей оспы, промотор *SV40*, промотор цитомегаловируса (ЦМВ), промотор *tk HSV*, промотор

вируса опухоли молочной железы мыши (MMTV), промотор LTR ВИЧ, промотор вируса Молони, промотор вируса Эпштейна-Барр (ВЭБ) и промотор вируса саркомы Рауса (RSV)), а полиаденилированную последовательность обычно можно использовать в качестве последовательности для терминации транскрипции. В некоторых случаях вектор можно объединить с другой последовательностью для облегчения очистки экспрессируемого с него рекомбинантного белка. Объединяемая последовательность включает, например, глутатион-S-трансферазу (Pharmacia, США), белок, связывающий мальтозу (NEB, США), FLAG (IBI, США), 6X His (гексагистидин; Quiagen, США) и т.д. Вектор содержит в качестве селективного маркера ген устойчивости к антибиотику, обычно используемый в данной области техники, например, гены устойчивости к ампициллину, гентамицину, карбенициллину, хлорамфениколу, стрептомицину, канамицину, генетицину, неомицину и тетрациклину.

[0116] В других аспектах настоящего изобретения предложены клетки, трансформированные вышеупомянутыми векторами. Клетки, используемые для продукции рекомбинантного белка согласно настоящему изобретению, могут представлять собой прокариотические клетки, дрожжевые клетки или клетки высших эукариот, но не ограничиваются ими. Можно применять прокариотические клетки-хозяева, например, *Escherichia coli*, штаммы рода *Bacillus*, например, *Bacillus subtilis* и *Bacillus thuringiensis*, *Streptomyces*, *Pseudomonas* (например, *Pseudomonas putida*), *Proteus mirabilis* и *Staphylococcus* (например, *Staphylococcus carnosus*). Однако наибольший интерес представляют клетки животных, и примеры пригодной линии клеток-хозяев могут включать COS-7, ВНК, CHO (GS null CHO-K1), CHOK1, DXB-11, DG-44, CHO/-DHFR, CV1, COS-7, HEK293, ВНК, TM4, VERO, HELA, MDCK, BRL 3A, W138, Нер G2, SK-Нер, MMT, TRI, MRC 5, FS4, 3T3, RIN, A549, PC12, K562, PER.C6, SP2/0, NS-0, U20S или HT1080, но не ограничиваются ими.

[0117] В настоящем документе термин «трансформация» означает молекулярно-биологическую методику, изменяющую генетический признак клетки за счет фрагмента цепи ДНК или плазмиды, содержащей чужеродный ген, отличающийся от гена исходной клетки, способствующую ее проникновению в клетки и объединению с ДНК в исходной клетке. Трансформация означает введение экспрессирующего вектора, содержащего ген рекомбинантного белка, в клетку-хозяина.

[0118] В настоящем документе предложены молекулы нуклеиновой кислоты, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую рекомбинантный белок, описанный в настоящем документе (например, переменную область легкой цепи и/или

вариабельную область тяжелой цепи), иммуноспецифично связывающийся с антигеном, и векторы, например, векторы, содержащие такие полинуклеотиды для рекомбинантной экспрессии в клетках-хозяевах (например, *E. coli* и клетках млекопитающих). В настоящем изобретении предложены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидные последовательности, кодирующие любые из антител, предложенных в настоящем документе, в также векторы, содержащие такие полинуклеотидные последовательности, например, экспрессирующие векторы для их эффективной экспрессии в клетках-хозяевах, например, клетках млекопитающих.

[0119] В настоящем документе «выделенный» полинуклеотид или молекула нуклеиновой кислоты представляет собой полинуклеотид или молекулу нуклеиновой кислоты, отделенную от других молекул нуклеиновой кислоты, присутствующих в естественном источнике указанной молекулы нуклеиновой кислоты (например, в организме мыши или человека). Более того, «выделенная» молекула нуклеиновой кислоты, например, молекула кДНК, может по существу не содержать другого клеточного материала или культуральной среды при получении посредством рекомбинантных методик или по существу не содержать химических предшественников или других химических веществ при химическом синтезе. Например, фраза «по существу не содержащий» включает препараты полинуклеотида или молекулы нуклеиновой кислоты, содержащие менее чем приблизительно 15%, 10%, 5%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% (в частности, менее чем приблизительно 10%) другого материала, например, клеточного материала, культуральной среды, других молекул нуклеиновой кислоты, химических предшественников и/или других химических веществ. В некоторых вариантах реализации молекула(ы) нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело, описанное в настоящем документе, является выделенной или очищенной.

[0120] В настоящем документе предложены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидные последовательности, кодирующие антитела, иммуноспецифично связывающиеся с антигенным полипептидом (например, человеческим сывороточным альбумином) и содержащие аминокислотную последовательность, описанную в настоящем документе, а также антитела, конкурирующие с такими антителами за связывание с антигенным полипептидом (например, в зависимости от дозы) или связывающиеся с тем же эпитопом, что и указанные антитела.

[0121] В настоящем документе предложены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь или тяжелую цепь

антитела, описанного в настоящем документе. Полинуклеотиды могут содержать нуклеотидные последовательности, кодирующие легкую цепь, содержащую FR и CDR VL антител, описанных в настоящем документе. Полинуклеотиды могут содержать нуклеотидные последовательности, кодирующие тяжелую цепь, содержащую FR и CDR VH антител, описанных в настоящем документе.

[0122] В настоящем документе предложены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую рекомбинантный белок, содержащий Fab-фрагмент, содержащий три CDR-цепи VL, например, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL антитела против человеческого сывороточного альбумина, описанного в настоящем документе, и три CDR-цепи VH, например, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH антитела против человеческого сывороточного альбумина, описанного в настоящем документе.

[0123] В настоящем документе предложены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую рекомбинантный белок, содержащий VL-домен.

[0124] В конкретных вариантах реализации полинуклеотид, описанный в настоящем документе, содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую рекомбинантный белок, предложенный в настоящем документе, содержащий переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, описанную в настоящем документе (например, SEQ ID NO:61, 62, 63, 64, 65, 66 или 67), причем указанное антитело иммуноспецифично связывается с сывороточным альбумином.

[0125] В конкретных вариантах реализации полинуклеотид, описанный в настоящем документе, содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело, предложенное в настоящем документе, содержащее переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, описанную в настоящем документе (например, SEQ ID NO:55, 56, 57, 58, 59 или 60), причем указанное антитело иммуноспецифично связывается с сывороточным альбумином.

[0126] В конкретных аспектах в настоящем документе предложены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело, содержащее легкую цепь и тяжелую цепь, например, отдельно легкую цепь и тяжелую цепь. В отношении легкой цепи в некоторых вариантах реализации полинуклеотид, предложенный в настоящем документе, содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую каппа-цепь. В других вариантах реализации полинуклеотид,

предложенный в настоящем документе, содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую лямбда-цепь. В других вариантах реализации полинуклеотид, предложенный в настоящем документе, содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело, описанное в настоящем документе, содержащее легкую каппа-цепь человека или легкую лямбда-цепь человека. В некоторых вариантах реализации полинуклеотид, предложенный в настоящем документе, содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело, иммуноспецифично связывающееся с сывороточным альбумином, причем указанное антитело содержит легкую цепь, причем аминокислотная последовательность VL-домена может содержать аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:61, 62, 63, 64, 65, 66 или 67, а константная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность константной области легкой каппа-цепи.

[0127] Кроме того, в настоящем документе предложены полинуклеотиды, кодирующие антитело или его фрагмент, являющийся оптимизированным, например, путем оптимизации кодонов/РНК, замены на гетерологичные сигнальные последовательности и устранения элементов нестабильности мРНК. Способы создания оптимизированных нуклеиновых кислот, кодирующих антитело или его фрагмент (например, легкую цепь, тяжелую цепь, VH-домен или VL-домен) для рекомбинантной экспрессии, путем введения изменений в кодоны и/или устранения ингибиторных областей в мРНК можно осуществлять путем адаптации способов оптимизации, описанных, например, в патенте США 5965726; 6174666; 6291664; 6414132 и 6794498, соответственно. Например, можно выполнять мутирование потенциальных сайтов сплайсинга и элементов нестабильности (например, элементов, богатых A/T или A/U) в пределах РНК без изменения аминокислот, кодируемых нуклеотидными последовательностями, в целях повышения стабильности РНК для рекомбинантной экспрессии. При внесении изменений используют вырожденность генетического кода, например, используя альтернативный кодон для той же самой аминокислоты. В некоторых вариантах реализации может быть желательным изменить один или более кодонов для кодирования консервативной мутации, например, аналогичной аминокислоты с химической структурой и свойствами и/или функцией, сходными с таковыми у исходной аминокислоты.

[0128] В конкретных вариантах реализации оптимизированная полинуклеотидная последовательность, кодирующая антитело, описанное в настоящем документе, или его фрагмент (например, VL-домен или VH-домен), может гибридизоваться с

антисмысловым (например, комплементарным) полинуклеотидом неоптимизированной полинуклеотидной последовательности, кодирующей антитело, описанное в настоящем документе, или его фрагмент (например, VL-домен или VH-домен). В конкретных вариантах реализации оптимизированная нуклеотидная последовательность, кодирующая антитело, описанное в настоящем документе, или его фрагмент, гибридизуется в условиях высокой жесткости с антисмысловым полинуклеотидом неоптимизированной полинуклеотидной последовательности, кодирующей антитело, описанное в настоящем документе, или его фрагмент. В некоторых вариантах реализации оптимизированная нуклеотидная последовательность, кодирующая антитело, описанное в настоящем документе, или его фрагмент, гибридизуется в условиях гибридизации высокой, средней или пониженной жесткости с антисмысловым полинуклеотидом неоптимизированной нуклеотидной последовательности, кодирующей антитело, описанное в настоящем документе, или его фрагмент. Информация по условиям гибридизации описана, например, в патенте США 2005/0048549 (например, в абзацах 72-73), который включен в настоящий документ посредством ссылки.

[0129] Получать полинуклеотиды и определять нуклеотидную последовательность указанных полинуклеотидов можно с помощью любого способа, известного в данной области техники. Нуклеотидные последовательности, кодирующие антитела, описанные в настоящем документе, и модифицированные версии указанных антител, можно определять с использованием способов, хорошо известных в данной области техники, т.е. нуклеотидные кодоны, заведомо кодирующие конкретные аминокислоты, собирают таким образом, чтобы получить нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело. Такой полинуклеотид, кодирующий антитело, можно собрать из олигонуклеотидов, синтезированных химическим путем (например, как описано в статье Kutmeier G *et al.*, (1994), *BioTechniques* 17:242-246), что, вкратце, включает синтез перекрывающихся олигонуклеотидов, содержащих фрагменты последовательности, кодирующей антитело, выравнивание и лигирование указанных олигонуклеотидов и затем амплификацию лигированных олигонуклеотидов с помощью ПЦР.

[0130] В качестве альтернативы, полинуклеотид, кодирующий антитело или его фрагмент, описанный в настоящем документе, можно получить из нуклеиновой кислоты из подходящего источника (например, гибридомы) с использованием способов, хорошо известных в данной области техники (например, ПЦР и других способов молекулярного клонирования). Например, ПЦР-амплификацию с использованием синтетических

праймеров, гибридизуемых с 3'- и 5'-концами известных последовательностей, можно выполнять с использованием геномной ДНК, полученной из гибридомных клеток, продуцирующих антитело, представляющее интерес. Такие способы ПЦР-амплификации можно использовать для получения нуклеиновых кислот, содержащих последовательность, кодирующую легкую цепь и/или тяжелую цепь антитела. Такие способы ПЦР-амплификации можно использовать для получения нуклеиновых кислот, содержащих последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи и/или переменную область тяжелой цепи антитела. Амплифицированные нуклеиновые кислоты можно клонировать в векторы для экспрессии в клетках-хозяевах и для дополнительного клонирования, например, для получения химерных и гуманизированных антител.

[0131] Если клон, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую конкретное антитело или его фрагмент, не доступен, однако известна последовательность молекулы антитела или его фрагмента, нуклеиновую кислоту, кодирующую иммуноглобулин или его фрагмент, можно синтезировать химическим путем или получить из подходящего источника (например, библиотеки кДНК антител или созданной на ее основе библиотеки кДНК, или нуклеиновой кислоты, например, полиА+ РНК, выделенной из любой ткани или клеток, экспрессирующих антитело, например, гибридомных клеток, отобранных для экспрессии антитела, описанного в настоящем документе) посредством ПЦР-амплификации с использованием синтетических праймеров, способных гибридизоваться с 3'- и 5'-концами указанной последовательности, или путем клонирования с использованием олигонуклеотидного зонда, специфичного по отношению к последовательности конкретного гена, для выявления, например, клона кДНК из библиотеки кДНК, кодирующей антитело. Амплифицированные нуклеиновые кислоты, полученные с помощью ПЦР, затем можно клонировать в реплицируемые клонирующие векторы с использованием любого способа, хорошо известного в данной области техники.

[0132] ДНК, кодирующую рекомбинантные белки, описанные в настоящем документе, можно с легкостью выделять и секвенировать с использованием стандартных процедур (например, с использованием олигонуклеотидных зондов, способных специфично связываться с генами, кодирующими тяжелую и легкую цепи рекомбинантных белков). Гибридомные клетки могут служить в качестве источника такой ДНК. Сразу после выделения ДНК можно помещать в экспрессирующие векторы, которые затем трансфицируют в клетки-хозяева, например, клетки *E. coli*, клетки COS обезьяны,

клетки яичника китайского хомяка (CHO) (например, клетки CHO из системы CHO GS System™ (Lonza)) или клетки миеломы, которые в других случаях не продуцируют белок-иммуноглобулин, для обеспечения синтеза рекомбинантных белков в рекомбинантных клетках-хозяевах.

[0133] Для получения антител можно использовать праймеры для ПЦР, содержащие нуклеотидные последовательности VH или VL, сайт рестрикции и фланкирующую последовательность для защиты сайта рестрикции при амплификации последовательностей VH или VL в клонах scFv. С использованием методов клонирования, известных специалистам в данной области техники, амплифицированные с помощью ПЦР VH-домены можно клонировать в векторы, экспрессирующие константную область тяжелой цепи, например, константную область гамма-4 иммуноглобулина человека, а амплифицированные с помощью ПЦР VL-домены можно клонировать в векторы, экспрессирующие константную область легкой цепи, например, константную область легкой каппа- или лямбда-цепи иммуноглобулина человека. В конкретных вариантах реализации векторы для экспрессии VH или VL-доменов содержат промотор EF-1 α , сигнал секреции, сайт клонирования для переменного домена, константных доменов и маркер селекции, например, ген устойчивости к неомицину. VH- и VL-домены также можно клонировать в один вектор, экспрессирующий необходимые константные области. Векторы для конверсии тяжелой цепи и векторы для конверсии легкой цепи затем совместно трансфицируют в линии клеток для создания стабильных или временных линий клеток, экспрессирующих полноразмерные антитела, например, IgG, с использованием методик, известных специалистам в данной области техники.

[0134] ДНК также можно модифицировать, например, путем замещения кодирующей последовательности на константные домены тяжелой и легкой цепи иммуноглобулина человека вместо последовательностей мыши или путем ковалентного присоединения последовательности, кодирующей полипептид, не являющийся иммуноглобулином, или ее фрагмента, к последовательности, кодирующей иммуноглобулин.

[0135] Кроме того, в настоящем изобретении предложены полинуклеотиды, гибридизующиеся в условиях высокой, средней и пониженной жесткости гибридизации с полинуклеотидами, кодирующими антитело, описанное в настоящем документе. В конкретных вариантах реализации полинуклеотиды, описанные в настоящем документе, гибридизуются в условиях высокой, средней или пониженной жесткости гибридизации

с полинуклеотидами, кодирующими VH-домен и/или VL-домен, предложенные в настоящем документе.

[0136] Условия гибридизации описаны в данной области техники и известны специалисту в данной области техники. Например, гибридизация в жестких условиях может включать гибридизацию с ДНК, связанной с фильтром, в 6-кратном растворе хлорида натрия/цитрата натрия (SSC) при температуре приблизительно 45°C с последующей одной или более промывками в растворе 0,2xSSC/0,1% ДСН при температуре приблизительно 50-65°C; гибридизация в условиях высокой жесткости может включать гибридизацию с нуклеиновой кислотой, связанной с фильтром, в растворе 6xSSC при температуре приблизительно 45°C с последующей одной или более промывками в растворе 0,1xSSC/0,2% ДСН при температуре приблизительно 68°C. Гибридизация при других условиях жесткости известна специалистам в данной области техники и описана в источниках, например, Ausubel FM *et al.*, eds., (1989) *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. I, Green Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., New York на страницах 6.3.1-6.3.6 и 2.10.3.

[0137] В других аспектах предложены рекомбинантные векторы, содержащие ген, кодирующий белок, связывающий ИЛ-18, и нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенсвязывающий фрагмент против сывороточного альбумина. В других аспектах предложена клетка, трансформированная указанным вектором.

[0138] В настоящем документе описаны молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичную последовательности SEQ ID NO:10. В настоящем документе описаны молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие область легкой цепи и содержащие нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичную последовательности SEQ ID NO:11 или 12.

[0139] В настоящем документе описаны молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичную последовательности SEQ ID NO:13. В настоящем документе

описаны молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие область легкой цепи и содержащие нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичную последовательности SEQ ID NO:14 или 15.

[0140] В некоторых вариантах реализации в настоящем документе описаны нуклеиновые кислоты, каждая из которых кодирует область легкой цепи SEQ ID NO:10 и область тяжелой цепи SEQ ID NO:19. В некоторых вариантах реализации нуклеиновая кислота, кодирующая область легкой цепи SEQ ID NO:10, может быть представлена SEQ ID NO:11 или SEQ ID NO:12, а нуклеиновая кислота, кодирующая область тяжелой цепи SEQ ID NO:19, может быть представлена SEQ ID NO:20 или SEQ ID NO:21.

[0141] Кроме того, в настоящем документе описаны экспрессирующие векторы, содержащие:

- (a) промотор,
- (b) первую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую легкую цепь, связывающуюся с сывороточным альбумином, и
- (c) вторую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую тяжелую цепь и биологически активный эффекторный фрагмент, например, IL-18BP, и линкер,

где указанный промотор, первая нуклеотидная последовательность и вторая молекула нуклеиновой кислоты функционально связаны. Вторая молекула нуклеиновой кислоты может кодировать 1, 2, 3, 4, 5, 6 или более биологически активных эффекторных фрагментов и линкеров.

[0142] Кроме того, в настоящем документе описаны экспрессирующие векторы, содержащие:

- (a) промотор и
- (b) молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую переменный домен тяжелой цепи, описанный в настоящем документе, и константный домен тяжелой цепи, описанный в настоящем документе.

[0143] Кроме того, в настоящем документе описаны экспрессирующие векторы, содержащие:

- (a) промотор и
- (b) молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую IL18BP, описанный в настоящем документе, переменный домен тяжелой цепи, описанный в настоящем документе, и константный домен тяжелой цепи, описанный в настоящем документе.

[0144] Кроме того, в настоящем документе описаны экспрессирующие векторы, содержащие:

(a) промотор и

(b) молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую переменный домен легкой цепи, описанный в настоящем документе, и константный домен легкой цепи, описанный в настоящем документе.

[0145] Кроме того, в настоящем документе описаны экспрессирующие векторы, содержащие:

(a) промотор и

(b) молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую IL-18BP, описанный в настоящем документе, переменный домен легкой цепи, описанный в настоящем документе, и константный домен легкой цепи, описанный в настоящем документе. Один, два, три или более экспрессирующих векторов или молекул нуклеиновой кислоты можно экспрессировать с получением желательных рекомбинантных белков.

[0146] В некоторых вариантах реализации первая молекула нуклеиновой кислоты или вектор содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую рекомбинантный белок, содержащий антигенсвязывающий фрагмент, содержащий тяжелую цепь, причем указанная тяжелая цепь содержит переменный домен тяжелой цепи и константный домен тяжелой цепи, причем переменный домен тяжелой цепи содержит

(1) определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SYGIS (SEQ ID NO:22),

определяющий комплементарность домен 2 (CDR2) тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность WINTYSGGTKYAQKFQG (SEQ ID NO:23), и

определяющий комплементарность домен 3 (CDR3) тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность LGHCQRGICSDALDT (SEQ ID NO:24);

(2) CDR1 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SYGIS (SEQ ID NO:22),

CDR2 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность RINTYNGNTGYAQLQG (SEQ ID NO:25), и

CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность LGHCQRGICSDALDT (SEQ ID NO:24);

(3) CDR1 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность NYGIH (SEQ ID NO:26),

CDR2 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SISYDGSNKYYYADSVKG (SEQ ID NO:27), и

CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность DVHYYGSGYYNAFDI (SEQ ID NO:28);

(4) CDR1 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SYAMS (SEQ ID NO:29),

CDR2 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность VISHDGGFQYYADSVKG (SEQ ID NO:30), и

CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность AGWLRQYGMDV (SEQ ID NO:31);

(5) CDR1 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность AYWIA (SEQ ID NO:32),

CDR2 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность MIWPPDADARYSPSFQG (SEQ ID NO:33), и

CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность LYSGSYSP (SEQ ID NO:34); или

(6) CDR1 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность AYSMN (SEQ ID NO:35),

CDR2 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SISSSGRYIHADSVKG (SEQ ID NO:36), и

CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность ETVMAGKALDY (SEQ ID NO:37).

[0147] В настоящем документе описана вторая молекула нуклеиновой кислоты или вектор, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую рекомбинантный белок, содержащий антигенсвязывающий фрагмент, содержащий легкую цепь, причем указанная легкая цепь содержит переменный домен легкой цепи и константный домен легкой цепи, причем переменный домен легкой цепи содержит

(7) CDR1 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность RASQISRYLN (SEQ ID NO:38),

CDR2 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность GASRRLES (SEQ ID NO:39), и

CDR3 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность QQSDSVPVT (SEQ ID NO:40);

(8) CDR1 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность RASQSISSYLN (SEQ ID NO:41),

CDR2 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность AASSLQS (SEQ ID NO:42), и

CDR3 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность QQSYSTPPYT (SEQ ID NO:43);

(9) CDR1 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность RASQSIFNYVA (SEQ ID NO:44),

CDR2 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность DASNRAT (SEQ ID NO:45), и

CDR3 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность QQRSKWPPTWT (SEQ ID NO:46);

(10) CDR1 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность RASETVSSRQLA (SEQ ID NO:47),

CDR2 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность GASSRAT (SEQ ID NO:48), и

CDR3 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность QQYGSSPRT (SEQ ID NO:49);

(11) CDR1 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность RASQSVSSSSLA (SEQ ID NO:50),

CDR2 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность GASSRAT (SEQ ID NO:48), и

CDR3 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность QKYSSYPLT (SEQ ID NO:51); или

(12) CDR1 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность RASQSVGSNLA (SEQ ID NO:52),

CDR2 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность GASTGAT (SEQ ID NO:53), и

CDR3 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность QQYYSFLAKT (SEQ ID NO:54).

[0148] Например, молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая IL-18BP, может быть связана с первой или второй молекулой нуклеиновой кислоты или вектором, описанными выше.

[0149] В других вариантах реализации первая молекула нуклеиновой кислоты может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую Fab-фрагмент, содержащий: переменный домен тяжелой цепи, содержащий (1), описанный выше, и переменный домен легкой цепи, содержащий (7), описанный выше; переменный домен тяжелой цепи, содержащий (2), описанный выше, и переменный домен легкой цепи, содержащий (8), описанный выше; переменный домен тяжелой цепи, содержащий (3), описанный выше, и переменный домен легкой цепи, содержащий (9), описанный выше; переменный домен тяжелой цепи, содержащий (4), описанный выше, и переменный домен легкой цепи, содержащий (10), описанный выше; переменный домен тяжелой цепи, содержащий (5), описанный выше, и переменный домен легкой цепи, содержащий (11), описанный выше; переменный домен тяжелой цепи, содержащий (6), описанный выше, и переменный домен легкой цепи, содержащий (12), описанный выше; или всевозможные комбинации переменного домена тяжелой цепи и переменного домена легкой цепи, описанных выше. В некоторых вариантах реализации первая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую Fab-фрагмент (SL335), содержащий переменный домен тяжелой цепи, содержащий CDR1 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:35, CDR2 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36, и CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:37, а переменный домен легкой цепи содержит CDR1 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:52, CDR2 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:53, и CDR3 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:54. Первая или вторая молекула нуклеиновой кислоты может кодировать IL-18BP.

[0150] В других вариантах реализации первая молекула нуклеиновой кислоты или вектор содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую Fab-фрагмент, содержащий переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичную последовательности SEQ ID

NO:55, 56, 57, 58, 59 или 60. В некоторых вариантах реализации вторая молекула нуклеиновой кислоты или вектор содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую Fab-фрагмент, содержащий вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичную последовательности SEQ ID NO:61, 62, 63, 64, 65, 66 или 67. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая IL-18BP, может быть связана с первой или второй молекулой нуклеиновой кислоты или вектором.

[0151] В некоторых вариантах реализации первая молекула нуклеиновой кислоты или вектор содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую Fab-фрагмент, содержащий вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичную последовательности SEQ ID NO:55, 56, 57, 58, 59 или 60, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичную последовательности SEQ ID NO:61, 62, 63, 64, 65 или 66 или 67, соответственно.

[0152] В некоторых вариантах реализации первая молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую Fab-фрагмент (SL335), содержащий домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичную последовательности SEQ ID NO:10 (домен V_H-C_{H1}) и домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичную последовательности SEQ ID NO:13 (домен V_L-C_L).

[0153] В некоторых вариантах реализации биологически активный эффекторный фрагмент представляет собой IL-18BP. В некоторых вариантах реализации молекула нуклеиновой кислоты кодирует белок IL-18-BP, содержащий аминокислотную

последовательность, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичную последовательности SEQ ID NO:7. В некоторых вариантах реализации молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая белок, связывающий ИЛ-18, содержит нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичную последовательности SEQ ID NO:8 или SEQ ID NO:9. Например, первая молекула нуклеиновой кислоты может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичную одной или более из последовательностей SEQ ID NO:7, например, SEQ ID NO:8 или 9.

[0154] Рекомбинантная экспрессия специфично связывающегося антитела или его фрагмента, описанного в настоящем документе (например, тяжелой или легкой цепи антитела, описанного в настоящем документе), включает конструирование экспрессирующего вектора, содержащего полинуклеотид, кодирующий указанное антитело или фрагмент. После получения полинуклеотида, кодирующего указанное антитело или его фрагмент (например, переменные домены тяжелой или легкой цепи), описанные в настоящем документе, можно получить вектор для продукции молекулы антитела с помощью технологии рекомбинантных ДНК с использованием методик, хорошо известных в данной области техники. Таким образом, в настоящем документе описаны способы получения белка посредством экспрессии полинуклеотида, содержащего нуклеотидные последовательности, кодирующие антитело или фрагмент антитела (например, легкую цепь или тяжелую цепь). Для конструирования экспрессирующих векторов, содержащих антитело или фрагмент антитела (например, легкую цепь или тяжелую цепь), кодирующих последовательности и подходящие сигналы управления транскрипцией и трансляцией, можно использовать способы, хорошо известные специалистам в данной области техники. Указанные способы включают, например, методики технологии рекомбинантных ДНК *in vitro*, методики синтеза и генетическую рекомбинацию *in vivo*. Кроме того, предложены реплицируемые векторы, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую молекулу антитела, описанного в настоящем документе, тяжелую или

легкую цепь антитела, переменный домен тяжелой или легкой цепи антитела или его фрагмента или CDR тяжелой или легкой цепи, функционально связанные с промотором. Такие векторы могут, например, содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую константную область молекулы антитела (см., например, публикации WO86/05807 и WO89/01036 и патент США № 5122464), и переменные домены антитела можно клонировать в такой вектор для экспрессии полноразмерной тяжелой цепи, полноразмерной легкой цепи или полноразмерных тяжелой и легкой цепи.

[0155] Экспрессирующий вектор можно перенести в клетку (например, клетку-хозяин) с помощью стандартных методик, а полученные клетки затем можно культивировать с помощью стандартных методик с получением антитела, описанного в настоящем документе.

[0156] Для экспрессии описанных молекул антител можно применять различные системы экспрессии хозяин-вектор. Такие системы экспрессии в клетке-хозяине представляют собой носители, с помощью которых можно получать и затем очищать кодирующие последовательности, представляющие интерес, а также клетки, которые могут при трансформации или трансфекции подходящим нуклеотидом, кодирующим последовательности, экспрессировать молекулу антитела, описанного в настоящем документе, *in situ*. Они включают микроорганизмы, например, бактерии (например, *E. coli* и *B. subtilis*), трансформированные экспрессирующими векторами на основе рекомбинантной ДНК бактериофага, плазмидной ДНК или космидной ДНК, содержащей последовательности, кодирующие антитело; дрожжи (например, *Saccharomyces*, *Pichia*), трансформированные рекомбинантными векторами для экспрессии в дрожжах, содержащими последовательности, кодирующие антитело; системы на основе клеток насекомых, инфицированных рекомбинантными вирусными экспрессирующими векторами (например, бакуловирусом), содержащими последовательности, кодирующие антитело; системы на основе растительных клеток (например, зеленых водорослей, например, *Chlamydomonas reinhardtii*), инфицированных рекомбинантными вирусными экспрессирующими векторами (например, вирусом мозаики цветной капусты, CaMV; вирусом табачной мозаики, TMV) или трансформированные рекомбинантными плазмидными экспрессирующими векторами (например, плазмидой Ti), содержащими последовательности, кодирующие антитело; или системы на основе клеток млекопитающих (например, клеток COS (например, COS1 или COS), CHO, ВНК, MDCK, HEK 293, NS0, PER.C6, VERO, CRL7030, HsS78Bst, HeLa и NIH 3T3, HEK-293T, HepG2, SP210, R.1.1, B-W, L-M, BSC1,

BSC40, YB/20 и BMT10), содержащие рекомбинантные экспрессирующие конструкты, содержащие промоторы, происходящие из генома клеток млекопитающего (например, промотор металлотионеина) или из вирусов млекопитающих (например, позднего промотора аденовируса; промотора вируса коровьей оспы 7.5K), но не ограничиваются ими. В некоторых вариантах реализации клетки для экспрессии антител, описанных в настоящем документе (например, антитела, содержащего CDR любого из антител rab1949 или rab2044), представляют собой клетки CHO, например, клетки CHO из CHO GS System™ (Lonza). В некоторых вариантах реализации клетки для экспрессии антител, описанных в настоящем документе, представляют собой клетки человека, например, линии клеток человека. В некоторых вариантах реализации вектор для экспрессии в клетках млекопитающих представляет собой pOptiVEC™ или pcDNA3.3. В некоторых вариантах реализации бактериальные клетки, например, *Escherichia coli*, или эукариотические клетки (например, клетки млекопитающих), особенно для экспрессии полноразмерной молекулы рекомбинантного антитела, применяют для экспрессии молекулы рекомбинантного антитела. Например, клетки млекопитающих, например, клетки яичника китайского хомяка (CHO) вместе с вектором, например, содержащим основной промежуточный промоторный элемент ранних генов цитомегаловируса человека, представляют собой эффективную систему для экспрессии антител (Foecking MK & Hofstetter H (1986) Gene 45: 101-105; и Cockett MI *et al.*, (1990) Biotechnology 8: 662-667). В конкретных вариантах реализации антитела, описанные в настоящем документе, продуцируют клетки CHO или NS0. В некоторых вариантах реализации экспрессию нуклеотидных последовательностей, кодирующих антитела, описанные в настоящем документе, регулируют с помощью конститутивного промотора, индуцибельного промотора или тканеспецифичного промотора.

[0157] В бактериальных системах ряд экспрессирующих векторов можно предпочтительно выбирать в зависимости от применения, для которого предназначена экспрессируемая молекула антитела. Например, при необходимости продуцировать большое количество такого антитела для создания фармацевтических композиций молекулы антитела могут быть желательными векторы, обеспечивающие высокий уровень экспрессии продуктов, представляющих собой гибридные белки, легко поддающиеся очистке. Такие векторы включают вектор для экспрессии в *E. coli* pUR278 (Ruether U & Mueller-Hill B (1983) EMBO J 2: 1791-1794), в котором последовательность, кодирующую антитело, можно отдельно лигировать в вектор в рамке считывания с областью, кодирующей lac Z, обеспечивая продукцию гибридного

белка; векторы pIN (Inouye S & Inouye M (1985) Nuc Acids Res 13: 3101-3109; Van Heeke G & Schuster SM (1989) J Biol Chem 24: 5503-5509); и т.п., но не ограничиваются ими. Например, векторы pGEX также можно применять для экспрессии чужеродных полипептидов в виде гибридных белков с глутатион-5-трансферазой (GST). В целом, такие гибридные белки растворимы и легко поддаются очистке из лизированных клеток путем адсорбции и связывания с матричными гранулами на основе глутатионагаразы с последующим элюированием в присутствии свободного глутатиона. Конструкция векторов pGEX предусматривает наличие сайтов расщепления протеазами - тромбином или фактором Ха таким образом, чтобы продукт клонированного гена-мишени можно было отделять от фрагмента GST.

[0158] В клетках-хозяевах млекопитающих можно применять ряд систем экспрессии на основе вирусов. При использовании аденовируса в качестве экспрессирующего вектора представляющую интерес последовательность, кодирующую антитело, можно лигировать с аденовирусным комплексом управления транскрипцией/трансляцией, например, поздним промотором и трехкомпонентной лидерной последовательностью. Указанный химерный ген можно затем встроить в геном аденовируса с помощью рекомбинации *in vitro* или *in vivo*. Инсерция в несущественную область вирусного генома (например, область E1 или E3) приведет к получению жизнеспособного рекомбинантного вируса, способного экспрессировать молекулу антитела в инфицированных клетках-хозяевах (например, см. Logan J & Shenk T (1984) PNAS 81:3655-3659). Для эффективной трансляции вставленных последовательностей, кодирующих антитело, также могут потребоваться специфичные сигналы инициации. Указанные сигналы включают кодон инициации ATG и прилежащие последовательности. Более того, кодон инициации должен совпадать по фазе с рамкой считывания желательной кодирующей последовательности для обеспечения трансляции всей вставленной последовательности. Указанные экзогенные сигналы управления трансляцией и кодоны инициации могут иметь различное происхождение и являться как природными, так и синтетическими. Эффективность экспрессии можно усиливать путем включения подходящих энхансерных транскрипционных элементов, терминаторов транскрипции и т.д. (см., например, Bitter G *et al.*, (1987) Methods Enzymol 153:516-544).

[0159] Кроме того, можно выбрать штамм клетки-хозяина, модулирующий экспрессию встроенных последовательностей или обеспечивающий модификацию и процессинг генного продукта конкретным желательным образом. Такие модификации (например,

гликозилирование) и процессинг (например, расщепление) белковых продуктов могут быть важными для функции белка. Различные клетки-хозяева обладают характерными и специфичными механизмами посттрансляционного процессинга и модификации белков и генных продуктов. Для обеспечения правильной модификации и процессинга экспрессированного чужеродного белка можно выбрать подходящие линии клеток или системы хозяев. Для этого можно применять эукариотические клетки-хозяева, которые обладают клеточным аппаратом для соответствующего процессинга первичного транскрипта, гликозилирования и фосфорилирования генного продукта. Такие клетки-хозяева млекопитающих включают, клетки CHO, VERO, BHK, Hela, MDCK, HEK 293, NIH 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 и T47D, NS0 (линия клеток миеломы мыши, не выполняющая эндогенную продукцию каких-либо цепей иммуноглобулина), CRL7030, COS (например, COS1 или COS), PER.C6, VERO, HsS78Bst, HEK-293T, HepG2, SP210, R1.1, B-W, L-M, BSC1, BSC40, YB/20, BMT10 и HsS78Bst, но не ограничиваются ими. В конкретных вариантах реализации рекомбинантные белки, описанные в настоящем документе (например, антитело, содержащее CDR), продуцируют в клетках млекопитающих, например, клетках CHO.

[0160] В некоторых вариантах реализации антитела, описанные в настоящем документе, характеризуются пониженным содержанием фукозы или не содержат фукозу. Такие антитела можно получать с использованием методик, известных специалисту в данной области техники. Например, антитела можно экспрессировать в клетках с недостаточностью или отсутствием способности к фукозилированию. В конкретном примере для продукции антител со сниженным содержанием фукозы можно использовать линии клеток с нокаутом обоих аллелей α 1,6-фукозилтрансферазы. Система Potelligent[®] (Lonza) представляет собой пример такой системы, которую можно использовать для продукции антител с пониженным содержанием фукозы.

[0161] Для долгосрочной продукции с высоким выходом рекомбинантных белков можно создавать клетки со стабильной экспрессией. Например, можно сконструировать линии клеток, стабильно экспрессирующих рекомбинантные белки, описанные в настоящем документе. В конкретных вариантах реализации клетка, предложенная в настоящем документе, стабильно экспрессирует легкую цепь/вариабельный домен легкой цепи и тяжелую цепь/вариабельный домен тяжелой цепи, которые ассоциируют с образованием антитела, описанного в настоящем документе (например, антитела, содержащего указанные CDR).

[0162] В конкретных аспектах вместо использования экспрессирующих векторов, содержащих вирусные сайты инициации репликации, можно трансформировать клетки-хозяева ДНК, контролируемой подходящими элементами управления экспрессией (например, промоторными и энхансерными последовательностями, терминаторами транскрипции, сайтами полиаденилирования и т.д.), и селективным маркером. После введения чужеродной ДНК/полинуклеотида сконструированным клеткам можно позволять расти в течение 1-2 дней в обогащенной среде и затем перевести их на селективную среду. Селективный маркер в рекомбинантной плазмиде обеспечивает устойчивость в ходе отбора и позволяет клеткам стабильно встраивать плазмиду в хромосомы и расти с образованием очагов, которые, в свою очередь, можно клонировать и размножать с получением линий клеток. Этот способ можно предпочтительно применять для создания линий клеток, экспрессирующих антитело, описанное в настоящем документе, или его фрагмент. Такие сконструированные линии клеток можно, в частности, применять для скрининга и оценки композиций, непосредственно или косвенно взаимодействующих с молекулой антитела.

[0163] Можно использовать ряд систем отбора, включая гены тимидинкиназы (Wigler M *et al.*, (1977) Cell 11(1):223-232), гипоксантингуанилфосфорибозилтрансферазы (Szybalska EH & Szybalski W (1962) PNAS 48(12): 2026-2034) и аденилфосфорибозилтрансферазы вируса простого герпеса (Lowy I *et al.*, (1980) Cell 22(3):817-823), которые можно использовать в tk-, hprt- или aprt-клетках, соответственно, но не ограничиваясь ими. Кроме того, можно использовать устойчивость к антиметаболитам в качестве основы для отбора по следующим генам: *dhfr*, придающему устойчивость к метотрексату (Wigler M *et al.*, (1980) PNAS 77(6): 3567-3570; O'Hare K *et al.*, (1981) PNAS 78: 1527-1531); *gpt*, придающему устойчивость к микофенольной кислоте (Mulligan RC & Berg P (1981) PNAS 78(4): 2072-2076); neo, придающему устойчивость к аминогликозиду G-418 (Wu GY & Wu CH (1991) Biotherapy 3: 87-95; Tolstoshev P (1993) Ann Rev Pharmacol Toxicol 32: 573-596; Mulligan RC (1993) Science 260: 926-932; и Morgan RA & Anderson WF (1993) Ann Rev Biochem 62: 191-217; Nabel GJ & Felgner PL (1993) Trends Biotechnol 11(5): 211-215); и *hygro*, придающему устойчивость к гигромицину (Santerre RF *et al.*, (1984) Gene 30(1-3):147-156).

[0164] Уровень экспрессии молекулы антитела можно повышать с помощью амплификации в векторе (см. обзор Bebbington CR & Hentschel CCG. The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Vol. 3 (Academic Press, New York, 1987)). Если маркер в векторной системе,

экспрессирующей антитело, поддается амплификации, повышение уровня ингибитора, присутствующего в культуре клетки-хозяина, может увеличивать количество копий маркерного гена. Поскольку амплифицируемая область ассоциирована с геном антитела, продукция антитела также увеличится (Crouse GF *et al.*, (1983) Mol Cell Biol 3: 257-66).

[0165] Клетки-хозяева можно совместно трансфицировать двумя или более экспрессирующими векторами, описанными в настоящем документе, где первый вектор кодирует полипептид, происходящий из тяжелой цепи, и второй вектор кодирует полипептид, происходящий из легкой цепи. Указанные два вектора могут содержать идентичные селективные маркеры, обеспечивающие равную экспрессию полипептидов тяжелой и легкой цепи. Клетки-хозяева можно совместно трансфицировать различным количеством двух или более указанных экспрессирующих векторов. Например, клетки-хозяева можно трансфицировать первым экспрессирующим вектором и вторым экспрессирующим вектором в любом из следующих отношений: 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:12, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45 или 1:50.

[0166] В качестве альтернативы можно применять один вектор, кодирующий и способный обеспечивать экспрессию полипептидов как тяжелой, так и легкой цепи. В таких случаях легкая цепь должна располагаться перед тяжелой цепью во избежание избытка токсичной свободной тяжелой цепи (Proudfoot NJ (1986) Nature 322:562-565; и Köhler G (1980) PNAS 77: 2197-2199). Кодированные последовательности тяжелой и легкой цепей могут содержать кДНК или геномную ДНК. Экспрессирующий вектор может быть моноцистронным или мультицистронным. Мультицистронный нуклеотидный конструкт может кодировать 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более, или в диапазоне 2-5, 5-10 или 10-20 генов/нуклеотидных последовательностей. Например, бицистронный нуклеотидный конструкт может содержать элементы в следующем порядке: промотор, первый ген (например, ген тяжелой цепи антитела, описанного в настоящем документе) и второй ген (например, ген легкой цепи антитела, описанного в настоящем документе). В таком экспрессирующем векторе транскрипцией обоих генов может управлять промотор, в то время как трансляция мРНК с первого гена может происходить с помощью сар-зависимого сканирующего механизма, а трансляция мРНК со второго гена может происходить с помощью сар-независимого механизма, например, с помощью IRES.

[0167] Сразу после продукции молекулы антитела, описанного в настоящем документе, посредством рекомбинантной экспрессии указанную молекулу можно очищать любым

способом очистки молекулы иммуноглобулина, известным в данной области техники, например, с помощью хроматографии (например, ионообменной, аффинной, в частности, за счет сродства в отношении специфического антигена после очистки на белке А, и колоночной хроматографии с распределением по размеру), центрифугирования, различной растворимости или с помощью любой стандартной методики очистки белков. Кроме того, антитела, описанные в настоящем документе, можно объединять с гетерологичными полипептидными последовательностями, описанными в настоящем документе или последовательностями, которые, как известно в данной области техники, могут иным образом облегчать очистку.

[0168] В конкретных вариантах реализации антитело, описанное в настоящем документе, является выделенным или очищенным. В общем случае выделенное антитело представляет собой антитело, по существу не содержащее других антител, обладающих специфичностью к другим антигенам по сравнению с выделенным антителом. Например, в некоторых вариантах реализации препарат антитела, описанного в настоящем документе, по существу не содержит клеточного материала и/или химических предшественников. Фраза «по существу не содержит клеточного материала» включает препараты антитела, в которых антитело отделено от компонентов клеток, из которых оно было выделено или получено рекомбинантным путем. Таким образом, антитело, по существу не содержащее клеточного материала, включает препараты антитела, содержащие менее чем приблизительно 30%, 20%, 10%, 5%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% (сухой массы) гетерологичного белка (также называемого в настоящем документе «контаминирующим белком») и/или вариантов антитела, например, различных форм антитела с посттрансляционными модификациями. При получении антитела или его фрагмента рекомбинантным путем оно также в целом по существу не содержит культуральной среды, т.е. культуральная среда составляет менее чем приблизительно 20%, 10%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% объема препарата белка. При получении антитела или его фрагмента с помощью химического синтеза оно в целом по существу не содержит химических предшественников или других химических веществ, т.е. отделено от химических предшественников или других химических веществ, вовлеченных в процесс синтеза белка. Соответственно, такие препараты антитела или его фрагмента содержат менее чем приблизительно 30%, 20%, 10% или 5% (сухой массы) химических предшественников или соединений, отличных от антитела или фрагмента, представляющих интерес. В некоторых вариантах реализации антитела, описанные в настоящем документе, являются выделенными или очищенными.

Композиции

[0169] В других аспектах предложены композиции, например, фармацевтические композиции для лечения рака или иммунных заболеваний или состояний, фармацевтические композиции, содержащие рекомбинантный белок в качестве действующего вещества; способы лечения рака или иммунных заболеваний или состояний, способы, включающие введение композиции субъекту; и варианты медицинского применения рекомбинантного белка для профилактики или лечения рака или иммунных заболеваний или состояний.

[0170] Например, фармацевтическая композиция может содержать (а) фармацевтически эффективное количество рекомбинантного белка; и (b) фармацевтически приемлемый носитель.

[0171] В некоторых вариантах реализации период полужизни фармацевтической композиции *in vivo* может демонстрировать 2-20-кратное увеличение по сравнению с PL-18BP человека. Период полужизни *in vivo* может увеличиться в, например, от приблизительно 2,5 до приблизительно 3,5 раз, от приблизительно 3,5 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 4,5 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 5 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 5,5 до приблизительно 6 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 5,5 раз, от приблизительно 3,5 до приблизительно 5,5 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 5,5 раз, от приблизительно 4,5 до приблизительно 5,5 раз, от приблизительно 5 до приблизительно 5,5 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 5 раз, от приблизительно 3,5 до приблизительно 5 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 5 раз, от приблизительно 4,5 до приблизительно 5 раз, от приблизительно 3 до приблизительно 4,5 раз, от приблизительно 3,5 до приблизительно 4,5 раз, от приблизительно 4 до приблизительно 4,5 раз или в любое количество раз или диапазонов раз из вышеуказанного по сравнению с PL-18BP человека. В некоторых вариантах реализации увеличение периода полужизни PL-18BP человека *in vivo* можно оценить после подкожной инъекции PL-18BP человека.

[0172] В некоторых вариантах реализации указанная фармацевтическая композиция может снижать уровень лейкоцитов в крови. Лейкоциты могут представлять собой, например, нейтрофилы, моноциты, базофилы или их комбинацию. В некоторых вариантах реализации снижение уровня лейкоцитов может сохраняться и поддерживаться до 20 суток после введения, до 15 суток после введения, до 12 суток

после введения, до 10 суток после введения, до 8 суток после введения, до 7 суток после введения или в любых диапазонах из вышеуказанного.

[0173] Фармацевтическую композицию можно приготовить в стандартной лекарственной форме или в многодозовом контейнере путем составления с использованием фармацевтически приемлемого носителя и/или вспомогательного вещества согласно способу, который может легко осуществить специалист в области техники, к которой относится настоящее изобретение. В этом случае состав может находиться в форме раствора, суспензии или эмульсии в масляной или водной среде или в форме экстракта, суппозитория, порошка, гранул, таблетки или капсулы, и может дополнительно включать диспергирующий агент или стабилизирующий агент.

[0174] В настоящем документе предложены композиции, содержащие рекомбинантный белок, описанный в настоящем документе, характеризующийся желательной степенью чистоты, в физиологически приемлемом носителе, вспомогательном веществе или стабилизаторе (Remington 's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA). Кроме того, в настоящем документе описаны фармацевтические композиции, содержащие рекомбинантный белок, описанный в настоящем документе, и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество. Приемлемые носители, вспомогательные вещества или стабилизаторы нетоксичны для реципиентов в используемых дозах и концентрациях.

[0175] Фармацевтическую композицию для профилактики или лечения иммунных заболеваний или рака в соответствии с некоторыми аспектами можно использовать после составления в форме пероральных препаратов, например, порошков, гранул, таблеток, капсул, суспензий, эмульсий, сиропов, аэрозолей и т. д., препаратов для наружного применения, суппозитория или стерильных инъекционных препаратов в соответствии с распространенными способами, и при составлении фармацевтическая композиция может включать подходящий носитель, вспомогательное вещество или разбавитель, обычно используемый при приготовлении фармацевтических композиций.

[0176] Носитель, вспомогательное вещество или разбавитель могут включать различные соединения или смеси, например, лактозу, декстрозу, сахарозу, сорбит, маннит, ксилит, эритрит, мальтит, крахмал, гуммиарабик, альгинат, желатин, фосфат кальция, силикат кальция, целлюлозу, метилцеллюлозу, микрокристаллическую целлюлозу, поливинилпирролидон, воду, метилгидроксibenзоат, пропилгидроксibenзоат, тальк, стеарат магния, минеральное масло и т.д.

[0177] После составления ее можно получить с использованием обычно используемых разбавителей или вспомогательных веществ, например, наполнителей, сухих разбавителей, связующих веществ, увлажнителей, разрыхлителей, поверхностно-активных веществ и т. д.

[0178] Твердые составы для перорального введения можно получать путем смешивания рекомбинантного гибридного белка с по меньшей мере одним вспомогательным веществом, например, крахмалом, карбонатом кальция, сахарозой, лактозой, желатином и т. д. В дополнение к простым вспомогательным веществам также можно применять смазывающие вещества, например, стеарат магния или тальк.

[0179] Жидкие составы для перорального введения могут включать суспензии, растворы для внутреннего применения, эмульсии, сиропы и т. д. Помимо воды и жидкого парафина, которые обычно применяют в качестве простых разбавителей, в состав можно включать различные вспомогательные вещества, например, увлажнители, подсластители, ароматизаторы, консерванты и т. д.

[0180] Составы для парентерального введения включают стерильные водные растворы, неводные растворители, суспензии, эмульсии, лиофилизированные препараты и суппозитории. Неводные растворители и суспензии могут включать пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительные масла, например, оливковое масло, сложные эфиры для инъекций, например, этилолеат, и т. д. В качестве основы для суппозиторий можно использовать витепсол, макрогол, твин-61, масло какао, лауриновый жир, глицерин, желатин и т. д.

Варианты применения и способы

[0181] Кроме того, в настоящем документе описаны способы лечения злокачественных или иммунных заболеваний или состояний у субъекта, нуждающегося в этом, причем указанный способ включает введение указанному субъекту фармацевтических композиций, описанных в настоящем документе. Субъект может представлять собой человека или млекопитающее, не являющееся человеком, например, домашних животных и сельскохозяйственных животных. Термин "субъект" относится к субъекту или пациенту, нуждающемуся в лечении.

[0182] В настоящем документе термин «лечение» или «лечить» означает все действия, за счет которых улучшали, устраняли или благоприятно изменяли симптомы заболевания или состояния путем введения композиций, описанных в настоящем документе.

[0183] В настоящем документе также описаны варианты применения композиций, описанных в настоящем документе, для лечения злокачественных или иммунных заболеваний или состояний у субъектов, нуждающихся в этом. В настоящем документе также описаны композиции, описанные в настоящем документе, для применения при лечении злокачественных или иммунных заболеваний или состояний у субъектов, нуждающихся в этом. Кроме того, в настоящем документе описано применение композиций, описанных в настоящем документе, для получения лекарственного средства для лечения злокачественных или иммунных заболеваний или состояний у субъектов, нуждающихся в этом.

[0184] В некоторых вариантах реализации указанные композиции снижают количество лейкоцитов в крови субъекта. В некоторых вариантах реализации лейкоциты представляют собой нейтрофилы, моноциты, базофилы или их комбинацию.

[0185] В некоторых вариантах реализации период полужизни ($T_{1/2}$) рекомбинантных белков, описанных в настоящем документе, по меньшей мере приблизительно в 2 раза, по меньшей мере в 2,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 3 раза, по меньшей мере приблизительно в 3,5 раза, по меньшей мере приблизительно в 4 раза, по меньшей мере приблизительно в 5 раз, по меньшей мере приблизительно в 7 раз, по меньшей мере приблизительно в 10 раз или в любое количество раз или диапазонов раз из вышеперечисленного превышает период полужизни PL-18BP. В некоторых вариантах реализации период полужизни ($T_{1/2}$) рекомбинантного белка составляет от приблизительно 8 часов до приблизительно 20 часов, от приблизительно 10 часов до приблизительно 18 часов, от приблизительно 12 часов до приблизительно 15 часов или любое время или диапазоны времени из вышеперечисленного. В некоторых вариантах реализации $T_{\text{макс}}$ рекомбинантного белка по меньшей мере приблизительно на 10-200%, приблизительно на 50-100%, приблизительно на 50-75% или на любое процентное значение или диапазон процентных значений из вышеперечисленного превышает $T_{\text{макс}}$ PL-18BP. В некоторых вариантах реализации доза рекомбинантного белка приблизительно 360 мкг/кг субъекта обеспечивает $T_{\text{макс}}$ от приблизительно 8 часов до приблизительно 20 часов, от приблизительно 10 часов до приблизительно 15 часов, от приблизительно 12 часов до приблизительно 14 часов или любое значение $T_{\text{макс}}$ или диапазоны $T_{\text{макс}}$ из вышеперечисленного. В некоторых вариантах реализации $S_{\text{макс}}$ рекомбинантного белка по меньшей мере приблизительно на 10%, по меньшей мере приблизительно на 20%, по меньшей мере приблизительно на 30% или на любое процентное значение или диапазон процентных значений из вышеперечисленного

превышает Смакс IL-18BP. В некоторых вариантах реализации доза рекомбинантного белка приблизительно 360 мкг/кг субъекта обеспечивает Смакс от приблизительно 700 нг/мл до приблизительно 1000 нг/мл, от приблизительно 750 нг/мл до приблизительно 900 нг/мл, от приблизительно 800 нг/мл до приблизительно 850 нг/мл или любые значения или диапазоны значений дозы из вышеперечисленного. В некоторых вариантах реализации AUC_{посл.} рекомбинантного белка по меньшей мере приблизительно в 2 раза, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 5 раз или в любое количество раз или диапазонов раз из вышеперечисленного превышает AUC_{посл.} IL-18BP. В некоторых вариантах реализации доза рекомбинантного белка приблизительно 360 мкг/кг субъекта обеспечивает AUC_{посл.} от приблизительно 8000 ч*нг/мл до приблизительно 25000 ч*нг/мл, от приблизительно 16000 ч*нг/мл до приблизительно 22000 ч*нг/мл, от приблизительно 18000 ч*нг/мл до приблизительно 20000 ч*нг/мл или любые значения или диапазоны значений концентрации из вышеуказанного.

[0186] В некоторых аспектах в настоящем документе предложены способы модулирования одной или более иммунных функций или реакций у субъекта, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, антитела, описанного в настоящем документе, или его композиции. В настоящем документе описаны способы активации, усиления или индукции одной или более иммунных функций или реакций у субъекта, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, антитела или его композиции. В некоторых вариантах реализации в настоящем документе представлены способы профилактики и/или лечения заболеваний, при которых является желательны активация или усиление одной или более иммунных функций или реакций, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, антитела, описанного в настоящем документе, или его композиции. В конкретных вариантах реализации в настоящем документе предложены способы лечения аутоиммунного заболевания или состояния, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, антитела или его композиции.

[0187] В некоторых вариантах реализации гибридные белки, описанные в настоящем документе, активируют, усиливают или индуцируют одну или более иммунных функций или реакций у субъекта по меньшей мере на 99%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 40%, по

меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 20% или по меньшей мере на 10% или в диапазоне от 10% до 25%, от 25% до 50%, от 50% до 75% или от 75% до 95% по сравнению с иммунной функцией у субъекта, которому не вводили рекомбинантный белок, описанный в настоящем документе, с использованием анализов, хорошо известных в данной области техники, например, анализов ELISPOT, твердофазного ИФА и анализа пролиферации клеток.

[0188] Фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, можно применять для усиления, индукции или активации активности рекомбинантных белков, описанных в настоящем документе, и лечения заболевания или состояния.

[0189] Композиции для введения *in vivo* могут быть стерильными. Это легко осуществить путем фильтрования, например, через мембраны для стерильной фильтрации.

[0190] В других аспектах предложена фармацевтическая композиция для профилактики или лечения иммунных заболеваний, причем указанная фармацевтическая композиция содержит рекомбинантный гибридный белок в качестве действующего вещества. В других аспектах предложен способ профилактики или лечения иммунных заболеваний, включающий введение рекомбинантного гибридного белка индивиду. Конкретные характеристики рекомбинантного гибридного белка представляют собой характеристики, описанные выше.

[0191] Иммунные заболевания могут представлять собой воспалительные заболевания или аутоиммунные заболевания. Воспалительные заболевания могут представлять собой, например, болезнь Стилла, развившуюся во взрослом возрасте, системный ювенильный идиопатический артрит, синдром активации макрофагов, гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз, атопический дерматит, псориаз, дерматит, аллергию, артрит, ринит, средний отит, боль в горле, тонзиллит, цистит, нефрит, воспаление органов малого таза, болезнь Крона, язвенный колит, анкилозирующий спондилит, системную красную волчанку (СКВ), астму, отек, аллергическую реакцию замедленного типа (аллергическую реакцию IV типа), отторжение трансплантата, болезнь «трансплантат против хозяина», аутоиммунный энцефаломиелит, рассеянный склероз, воспалительное заболевание кишечника, муковисцидоз, диабетическую ретинопатию, ишемическое реперфузионное повреждение, рестеноз сосудов, гломерулонефрит, желудочно-кишечную аллергическую реакцию и т.д. Кроме того, иммунные заболевания могут представлять собой, например, ревматоидный артрит,

синдром Шегрена, системный склероз, полимиозит, системный ангиит, смешанное заболевание соединительной ткани, болезнь Крона, болезнь Хашимото, болезнь Грейвса, синдром Гудпасчера, синдром Гийена-Барре, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру, синдром раздраженного кишечника, миастению гравис, гипнолепсию, вульгарную пузырчатку, пернициозную анемию, первичный билиарный цирроз, язвенный колит, васкулит, гранулематоз Вегенера, псориаз и др.

[0192] В некоторых вариантах реализации фармацевтическая композиция может представлять собой фармацевтическую композицию для профилактики или лечения болезни Стилла, развившейся во взрослом возрасте, причем указанная фармацевтическая композиция содержит рекомбинантный гибридный белок в качестве действующего вещества. Болезнь Стилла, развившаяся во взрослом возрасте, представляет собой многофакторное системное аутовоспалительное заболевание с симптомами, аналогичными симптомам системного ювенильного идиопатического артрита, и представляет собой воспалительное заболевание, возникающее у взрослых, однако точные патогенные механизмы этого заболевания остаются неизвестными. Болезнь Стилла, развившаяся во взрослом возрасте, характеризуется повышением концентрации интерлейкина-18 в крови и снижением концентрации белка, связывающего ИЛ-18, который является его антагонистом *in vivo*. Между тем, сообщалось, что более 50% пациентов с болезнью Стилла, развившейся во взрослом возрасте, получавших рекомбинантное лекарственное средство IL-18BP в дозах 80 мг/голову и 160 мг/голову, соответственно, реагировали на лекарственное средство. Кроме того, в отчетах по клиническим исследованиям сообщалось, что период полужизни указанного лекарственного средства составляет у человека от приблизительно 30 часов до приблизительно 40 часов, и указанное лекарственное средство эффективно при введении три раза в неделю. Таким образом, проблема заключается в том, что указанное лекарственное средство необходимо часто вводить пациентам в виде состава для подкожной инъекции. В одном типичном варианте реализации подтверждено, что у крыс рекомбинантный гибридный белок демонстрировал период полужизни, приблизительно в 3,5 раза увеличенный по сравнению с рекомбинантным IL-18BP, и обладал такой же и аналогичной активностью даже при введении небольшой дозы. Таким образом, рекомбинантный гибридный белок можно эффективно применять для лечения болезни Стилла, развившейся во взрослом возрасте.

[0193] В других аспектах предложена фармацевтическая композиция для предотвращения или лечения рака, причем указанная фармацевтическая композиция содержит рекомбинантный гибридный белок в качестве действующего вещества. В других аспектах предложен способ профилактики или лечения рака, включающий введение рекомбинантного гибридного белка индивиду. Конкретные характеристики рекомбинантного гибридного белка представляют собой характеристики, описанные выше.

[0194] Рак может представлять собой, например, множественную миелому, рак легких, рак печени, рак желудка, рак ободочной или прямой кишки, рак толстой кишки, рак кожи, рак мочевого пузыря, рак предстательной железы, рак молочной железы, рак яичников, рак шейки матки, рак щитовидной железы, рак почек, фибросаркому, меланому, рак крови и т.д.

Способы введения и дозировки

[0195] Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению можно вводить с помощью различных способов введения, включая пероральный, чрескожный, подкожный, внутривенный и внутримышечный пути введения.

[0196] Количество рекомбинантного белка или композиции, описанной в настоящем документе, эффективное для лечения и/или профилактики состояния, зависит от природы заболевания, и его можно определить с помощью стандартных клинических методик.

[0197] Согласно настоящему изобретению, количество реально вводимого рекомбинантного белка, описанного в настоящем документе, определяют с учетом соответствующих значимых факторов, включая заболевание, подлежащее лечению, выбранный способ введения, возраст, пол и массу тела пациента и тяжесть указанного заболевания, а также тип биологически активного полипептида, используемого в качестве действующего вещества. Поскольку рекомбинантный белок согласно настоящему изобретению обладает превосходной устойчивостью в крови, количество и частоту введения препаратов пептида, содержащих рекомбинантный белок согласно настоящему изобретению, можно значительно снизить.

[0198] Фармацевтическую композицию вводят в фармацевтически эффективном количестве. В настоящем документе «фармацевтически эффективное количество» или «эффективное количество» в контексте введения терапевтического средства субъекту относится к количеству терапевтического средства, которое приводит к достижению

желательного профилактического или терапевтического эффекта. Эффективный уровень дозы можно определить в зависимости от ряда факторов, включая тип и тяжесть заболевания у пациента, активность лекарственного средства, чувствительность к лекарственному средству, время введения, способ введения и коэффициент выведения, период лечения и совместно вводимые лекарственные средства, а также других факторов, хорошо известных в медицине. Фармацевтическую композицию можно вводить в виде одного терапевтического агента или в комбинации с другими терапевтическими лекарственными средствами, одновременно, отдельно от или после существующих терапевтических лекарственных средств, однократно или в виде нескольких разделенных доз. Важно вводить композицию в минимальном количестве, достаточном для получения максимального эффекта без каких-либо побочных эффектов, с учетом всех факторов, и это количество легко могут определить специалисты в данной области техники. В настоящем документе термин «фармацевтически эффективное количество» относится к количеству, достаточному для лечения злокачественных или иммунных заболеваний или состояний.

[0199] Подходящая дозировка фармацевтической композиции для профилактики или лечения иммунных заболеваний или рака в соответствии с некоторыми аспектами зависит от состояния пациента, массы тела, тяжести заболевания, состава лекарственного средства, способа и периода введения, и ее соответствующее значение может выбрать специалист в данной области техники. Однако для получения желательных эффектов фармацевтическую композицию можно вводить в суточной дозе от 0,0001 мг/кг до 2000 мг/кг, и, в частности, от 0,001 мг/кг до 2000 мг/кг. Введение можно выполнять раз в сутки или в виде нескольких разделенных доз.

[0200] Точная доза для применения в композиции также зависит от способа введения и тяжести заболевания, и ее следует определять в соответствии с решением практикующего врача и с учетом обстоятельств каждого субъекта. Например, эффективные дозы также могут зависеть от способов введения, области-мишени, физиологического состояния пациента (включая возраст, массу тела и состояние здоровья), других вводимых медицинских средств или от того, является ли лечение профилактическим или терапевтическим. Как правило, пациент представляет собой человека, но может представлять собой животное, не являющееся человеком, например, домашних животных, например, собак и кошек. Лечебные дозы оптимальным образом подбирают для оптимизации безопасности и эффективности.

[0201] В конкретных вариантах реализации в качестве вспомогательного средства для выявления оптимальных диапазонов дозировок используют анализ *in vitro*. Эффективные дозы можно экстраполировать из кривых зависимости "доза-эффект", полученных с помощью тест-систем *in vitro* или на животных моделях.

[0202] В некоторых вариантах реализации рекомбинантный гибридный белок можно вводить в дозе от 0,001 мг/кг до 2000 мг/кг. Например, рекомбинантный гибридный белок можно вводить в дозе от 0,001 мг/кг до 0,01 мг/кг, от 0,1 мг/кг до 1 мг/кг, от 1,5 мг/кг до 2 мг/кг, от 4 мг/кг до 10 мг/кг, от 15 мг/кг до 20 мг/кг, от 30 мг/кг до 40 мг/кг, от 60 мг/кг до 80 мг/кг, от 100 мг/кг до 200 мг/кг или в любой дозе или диапазонах доз из вышеуказанных.

[0203] Фармацевтическую композицию для профилактики или лечения иммунных заболеваний согласно некоторым аспектам можно вводить млекопитающим, например, крысам, мышам, домашнему скоту, людям и т.д., различными способами. Можно рассматривать все способы введения, например, посредством перорального, ректального или внутривенного, внутримышечного, подкожного или интрадурального введения или интрацеребровентрикулярной инъекции.

[0204] Фармацевтическую композицию можно вводить перорально или парентерально. В частности, фармацевтическую композицию можно вводить парентерально, и в этом случае ее можно вводить путем внутривенной инъекции, подкожной инъекции, внутримышечной инъекции, внутрибрюшинной инъекции, эндотелиального введения, местного введения, интраназального введения, внутрилегочного введения и ректального введения. В некоторых вариантах реализации ее можно вводить в форме подкожной инъекции. При пероральном введении белок или пептид переваривается, и, следовательно, требуется составлять композицию для перорального приема путем покрытия действующего вещества или его защиты от разложения в желудке. Кроме того, фармацевтическую композицию можно вводить с помощью любого устройства, способного доставлять действующее вещество в клетки-мишени.

[0205] В других аспектах предложена функциональная оздоровительная пищевая композиция для профилактики или улучшения состояния при иммунных заболеваниях, содержащая рекомбинантный гибридный белок в качестве действующего вещества. В других аспектах предложена функциональная оздоровительная пищевая композиция для профилактики или улучшения состояния при раке, включающая рекомбинантный гибридный белок в качестве действующего вещества. Конкретные характеристики рекомбинантного гибридного белка, иммунных заболеваний и рака описаны выше.

[0206] В отношении функциональной оздоровительной пищевой композиции для профилактики или улучшения состояния при иммунных заболеваниях или состояниях или злокачественных заболеваниях рекомбинантный гибридный белок можно добавлять как есть или использовать с другими пищевыми продуктами или ингредиентами при применении указанного рекомбинантного гибридного белка в качестве добавки к функциональному оздоровительному пищевому продукту, и можно использовать надлежащим образом в соответствии с общепринятым способом. Смешиваемое количество действующего вещества можно определить в соответствии с каждой целью применения, например, профилактической, оздоровительной, терапевтической и т.д.

[0207] Состав функционального оздоровительного пищевого продукта может находиться в виде порошков, гранул, пилюль, таблеток и капсул, а также в форме обычных продуктов питания или напитков.

[0208] Тип конкретного пищевого продукта не ограничивается, и примеры пищевых продуктов, в которые можно добавлять указанное вещество, могут включать мясные продукты, колбасы, хлеб, шоколад, конфеты, легкие закуски, кондитерские изделия, пиццу, суп рамен, другие виды лапши, жевательные резинки, молочные продукты, включая мороженое, различные супы, напитки, чай, алкогольные напитки, витаминные комплексы и т.д., и могут включать все продукты питания в общепринятом смысле.

[0209] В общем случае, при приготовлении пищевых продуктов или напитков рекомбинантный гибридный белок можно добавлять в количестве 15 массовых частей или менее, и, в частности, 10 массовых частей или менее из расчета на 100 массовых частей сырья. Однако в случае длительного потребления для здоровья и гигиены или с целью контроля состояния здоровья это количество можно снижать по сравнению с вышеуказанным диапазоном. Кроме того, у настоящего изобретения нет проблем с точки зрения безопасности, поскольку в нем используют фракцию из природного продукта. Соответственно, это количество может быть выше указанного диапазона.

[0210] Среди функциональных здоровых пищевых продуктов, напитки могут включать различные вкусоароматические добавки или природные углеводы в качестве дополнительных ингредиентов, как и в обычных напитках. Вышеупомянутые природные углеводы могут включать моносахариды, например, глюкозу и фруктозу, дисахариды, например, мальтозу и сахарозу, полисахариды, например, декстрин и циклодекстрин, и сахароспирты, например, ксилит, сорбит, эритрит и т. д. В качестве подсластителя можно использовать натуральные подсластители, например, талин и

экстракт стевии, синтетические подсластители, например, сахарин и аспартам и т. д. Доля природного углевода может составлять от приблизительно 0,01 г до 0,04 г, и, в частности, от приблизительно 0,02 г до 0,03 г на 100 мл напитка согласно настоящему изобретению.

[0211] Кроме того, функциональная здоровая пищевая композиция для профилактики или улучшения состояния при иммунных заболеваниях или раке в соответствии с некоторыми аспектами может включать различные питательные вещества, витамины, электролиты, вкусоароматические агенты, красители, пектиновую кислоту и ее соли, альгиновую кислоту и ее соли, органические кислоты, защитные коллоидные загустители, регуляторы уровня pH, стабилизаторы, консерванты, глицерин, спирты и карбонизирующие агенты, используемые в газированных напитках. Кроме того, композиция для улучшения состояния при иммунных заболеваниях или раке согласно настоящему изобретению может включать мякоть плода для приготовления натурального фруктового сока, напитков из фруктового сока и овощей. Эти компоненты можно использовать независимо или в смеси. Доля этих добавок не ограничивается, но, как правило, выбрана из диапазона от 0,01 массовой части до 0,1 массовой части на 100 массовых частей функциональной оздоровительной пищевой композиции.

[0212] Как описано выше, рекомбинантный гибридный белок может демонстрировать, например, период полужизни у крыс, приблизительно в 3,5 раза превышающий период полужизни рекомбинантного IL-18BP человека, и проявляет биологическую активность на уровне, аналогичном активности IL-18BP, не объединенного с SL335. Следовательно, поскольку рекомбинантный гибридный белок может проявлять аналогичную эффективность даже при меньшей частоте введения, пациентам можно вводить лекарственное средство с более удобными интервалами.

Наборы

[0213] В настоящем документе предложены наборы, содержащие один или более рекомбинантных белков, описанных в настоящем документе, или их конъюгатов. В настоящем документе описаны наборы, содержащие композиции, описанные в настоящем документе, и этикетки, содержащие инструкции по их применению. В некоторых вариантах реализации в настоящем документе предложена фармацевтическая упаковка или набор, содержащий один или более контейнеров, заполненных одним или более ингредиентами фармацевтических композиций, описанных в настоящем документе, например, один или более рекомбинантных белков,

предложенных в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации наборы содержат фармацевтическую композицию, описанную в настоящем документе, и любой профилактический или терапевтический агент, например, агенты, описанные в настоящем документе. С таким контейнером(ами) необязательно может быть связано примечание в форме, предписанной государственным органом, регулирующим изготовление, применение или продажу фармацевтических средств или биологических продуктов, причем в указанном примечании отражено одобрение изготовления, применения или продажи данного средства для введения человеку указанным органом. Кроме того, в настоящем документе предложены наборы, которые можно использовать в вышеуказанных способах. В некоторых вариантах реализации набор содержит рекомбинантный белок, описанный в настоящем документе, например, очищенный рекомбинантный белок в одном или более контейнеров. В некоторых вариантах реализации наборы, описанные в настоящем документе, содержат по существу выделенный(е) антиген(ы) (например, человеческий сывороточный альбумин), который(е) можно использовать в качестве контроля. В других вариантах реализации наборы, описанные в настоящем документе, дополнительно содержат контрольное антитело, не реагирующее с антигеном сывороточного альбумина. В других вариантах реализации наборы, описанные в настоящем документе, содержат один или более элементов для обнаружения связывания рекомбинантного белка с антигеном сывороточного альбумина (например, рекомбинантный белок может быть конъюгирован с детектируемым субстратом, например, флуоресцентным соединением, ферментативным субстратом, радиоактивным соединением или люминесцентным соединением, или с детектируемым субстратом можно конъюгировать второе антитело, распознающее первое антитело). В конкретных вариантах реализации набор, предложенный в настоящем документе, может содержать полученный рекомбинантным путем или химически синтезированный антиген сывороточного альбумина. Антиген сывороточного альбумина, предложенный в наборе, может быть присоединен к твердой подложке. В некоторых вариантах реализации средства детектирования в вышеописанных наборах включают твердую подложку, к которой присоединен антиген сывороточного альбумина. Такие наборы также могут содержать несвязанное меченное репортером антитело против антитела человека или антитело против антитела мыши/крысы. При связывании антитела с сывороточным альбумином можно обнаруживать антиген за счет связывания указанного антитела, меченного репортером меченного репортером.

ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЕ ЭФФЕКТЫ НАСТОЯЩЕГО ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0214] Рекомбинантный гибридный белок согласно некоторым аспектам получают путем объединения белка, связывающего ИЛ-18, с антителом против сывороточного альбумина, и преимущество этого заключается в том, что рекомбинантный гибридный белок характеризуется относительно длительным циклом введения из-за увеличенного периода полужизни в организме. Кроме того, поскольку рекомбинантный гибридный белок обладает низкой иммуногенностью и не вызывает побочных эффектов *in vivo*, его можно эффективно применять для лечения различных иммунных заболеваний, включая болезнь Стилла, развившуюся во взрослом возрасте.

[0215] Далее будут представлены типичные варианты реализации для лучшего понимания настоящего изобретения. Тем не менее, следующие типичные варианты реализации представлены исключительно в целях понимания настоящего изобретения, однако содержание настоящего изобретения не ограничено следующими типичными вариантами реализации.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Получение рекомбинантного гибридного белка, включающего белок, связывающий интерлейкин-18, и антигенсвязывающий фрагмент против сывороточного альбумина

[0216] 1-1. Получение вектора, экспрессирующего белок, связывающий интерлейкин-18, и вектора, экспрессирующего антигенсвязывающий фрагмент против сывороточного альбумина

[0217] Получали рекомбинантный гибридный белок, содержащий белок, связывающий интерлейкин ИЛ-18 (IL-18BP), и фрагмент антитела, связывающийся с сывороточным альбумином. Ген белка человека, связывающего интерлейкин-18 (hIL-18BP), необходимый в экспериментах, синтезировали в компании Cosmogenetech co, Ltd. (Южная Корея). Fab-фрагмент антитела (SL335), связывающийся с человеческим сывороточным альбумином, выбирали из библиотек наивных антител человека, а гены тяжелой цепи и легкой цепи синтезировали в ATUM (Ньюарк, штат Калифорния, США).

[0218] Получали рекомбинантный ген (SL335H-линкер-hIL18BP), в котором hIL-18BP был присоединен к С-концу тяжелой цепи SL335 через пептидный линкер (GSAPGS; SEQ ID NO:16). Конкретнее, ген SL335H-линкер-hIL18BP амплифицировали с использованием праймеров, представленных ниже в SEQ ID NO: 1-4 из таблицы 1, в

условиях 30 циклов при 95°C в течение 1 минуты, 60°C в течение 1 минуты и 72°C в течение 1 минуты. После этого амплифицированный рекомбинантный ген и pD2535NT, подлежащую использованию в качестве экспрессирующего вектора, обрабатывали ферментом рестрикции BbsI (Takara, Япония), соответственно, для расщепления сайта BbsI, а затем обрабатывали ДНК-лигазой T4 и вставляли в каждый вектор. При этом ген легкой цепи SL335 вставляли в вектор pD2359.

Таблица 1.

№	Название	F/R	От 5' к 3'
SEQ ID NO:1	SL335 H Xba1 Kozak	Прямой	gatcaactctagagccaccatggagtggtcctgggt
SEQ ID NO:2	Линкер GSAP вектора GS	Обратный	gtgctacctggggcaggggctgacccg
SEQ ID NO:3	Линкер GSAP вектора GS	Прямой	cgggtcagcccctgccccaggtagcac
SEQ ID NO:4	huIL18BP Not1, BbsI	Обратный	cgcgaagacgcttttagagcggccgcgtctacctacccttgctgctg
SEQ ID NO:5	только huIL18BP	Прямой	ggctgagcgggggtggaggggacacctgtgtcccagaccacaacagccgctacagc
SEQ ID NO:6	huIL18BP his8 BbsI NotI	Обратный	atcggcggccgcgaagacgcttttagatcagtggtggtggtgatggtgtggtgcccccttgctgctgtgggctagaatggctacttg

[0219] На фиг. 1А и 1В показаны векторы для экспрессии тяжелой цепи (фиг. 1А) и легкой цепи (фиг. 1В) для получения рекомбинантного гибридного белка согласно одному аспекту. Как показано на фиг. 1, в тяжелой цепи рекомбинантный IL-18BP человека присоединен к С-концу SL335H через пептидный линкер.

[0220] 1-2. Получение клеток для временной экспрессии

[0221] Клетки ExpiCHO-S™ (Thermo Fisher Scientific) суспендировали в культуральной колбе объемом 125 мл, содержащей среду для экспрессии (ExpiCHO expression media, Thermo Fisher Scientific), а затем культивировали в инкубаторе при встряхивании в условиях 37 °C, 140 об/мин, 5% CO₂ и 80% влажности. Затем для получения клеток с временной экспрессией культивированные клетки распределяли из расчета плотности $6,0 \times 10^6$ клеток/мл, и плазмидные векторы (pD2535NT, pD2539), с инсерциями генов тяжелой цепи и легкой цепи, полученные в примере 1-1, соответственно, трансфицировали в распределенные клетки. Затем клетки культивировали в инкубаторе при встряхивании в тех же условиях, как указано выше, в течение 16 часов, и

немедленно обрабатывали средой ExpiCHO и энхансером. На 3 день культивирования клетки дополнительно обрабатывали средой ExpiCHO и культивировали в течение 8 дней при температуре инкубатора, установленной на 32 °С. После завершения культивирования собранную культуральную среду центрифугировали при 4000 об/мин и 4°С в течение 15 минут для разделения клеток и культуральной среды. Затем культуральную среду пропускали через фильтровальную бумагу с размером пор 0,2 мкм для удаления примесей.

[0222] 1-3. Получение стабильной линии клеток

[0223] Стабильную линию клеток получали с использованием клеток HD-BIOP3 GS null CHO-K1 (Horizon Discovery). Конкретнее, клетки распределяли из расчета плотности $3,0 \times 10^5$ клеток/мл в среде CD FortiCHO (Thermo Fisher Scientific), содержащей 4 мМ L-глутамин, а затем ставили культуру на одни сутки в инкубатор при встряхивании в условиях 37°С, 5% CO₂ и 80% или более влажности. Для трансфекции клетки разделяли на аликвоты из расчета плотности $1,0 \times 10^6$ клеток/мл, и каждый плазмидный вектор (pD2535NT, pD2539), полученный в примере 1-1, трансфицировали в распределенные клетки с использованием среды OptiPRO SFM и реагента Freestyle max (Invitrogen, Карлсбад, штат Калифорния, США), а затем культивировали в течение 2 дней в условиях 37°С, 5% CO₂ и 80% или более влажности. После этого для отбора стабильного пула среду заменяли средой CD FortiCHO без L-глутамин путем центрифугирования и каждые два дня обрабатывали 50 мкМ метионинсульфоксимином (MSX) (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, штат Миссури, США) и 10 мкг/мл пурамицина (Thermo Fisher Scientific) для удаления клеток, не трансфицированных вектором. После этого среду замещали на среду CD FortiCHO, содержащую как MSX, так и пурамицин каждые 7-10 дней посредством центрифугирования, каждый раз поддерживая количество клеток на уровне $5,0 \times 10^5$ клеток/мл, и культивировали в течение 21 дня. Затем, после восстановления жизнеспособности до 90% или более, получали базовый раствор плотностью $1,0 \times 10^7$ клеток/мл.

[0224] 1-4. Выделение и очистка белка APB-R3

[0225] Образец белка, присутствующий в культуральной среде, полученной в примере 1-3, очищали путем последовательного выполнения аффинной хроматографии (AC), катионообменной хроматографии (СЕХ) и анионообменной хроматографии (АЕХ). Конкретнее, аффинную хроматографию выполняли при скорости потока 8 мл/мин, а катионообменную хроматографию - при скорости потока 2 мл/мин. Затем белки, очищенные катионообменной хроматографией, пропускали через анионообменную

хроматографию, и выделяли белки, не связанные со смолами. Белок, очищенный вышеуказанным способом, получил название APB-R3.

[0226] На фиг. 2 показана структура белка APB-R3 согласно одному из аспектов. Как показано на фиг. 2, подтвердили, что APB-R3 обладал структурой, в которой SL335, представлявший собой Fab-фрагмент человека, специфично связывающийся с сывороточным альбумином, и IL-18BP были связаны через пептидный линкер, а тяжелая цепь (SL335H-пептидный линкер-IL-18BP) и легкая цепь (SL335L) связаны нековалентно. Кроме того, подтвердили, что SL335 состоял из V_H-С_{H1} (SL335H) и V_L-С_κ (SL335L) человека. Между тем, ожидалось, что SL335, представлявший собой последовательность, выбранную из библиотек наивных антител человека, должен характеризоваться крайне низкой иммуногенностью, поскольку его последовательность очень похожа на исходную последовательность антитела человека.

Пример сравнения 1. Получение рекомбинантного белка человека, связывающего интерлейкин-18

[0227] Получали рекомбинантный ген, в котором His-маркер (НННННННН; SEQ ID NO:85) был связан с С-концом hIL-18BP. Конкретнее, hIL18BP-his8 амплифицировали при тех же условиях, как и в примере 1-1, с использованием праймеров, представленных SEQ ID NO:5 и 6 из таблицы 1. Затем продукт вставляли в экспрессирующий вектор таким же образом, как в примере 1-1, а затем получали рекомбинантный белок человека, связывающий ИЛ-18, с помощью способов согласно примерам 1-2 - 1-4. Затем белок очищали с использованием оборудования HiTrap IMAC HP (GE Healthcare) и АКТА pure 150 L.

Экспериментальный пример 1. Молекулярные характеристики белка APB-R3

[0228] 1-1. Исследование размера

[0229] Для изучения размеров белков, полученных в примере 1 и сравнительном примере 1, выполняли электрофорез в ДСН-ПААГ. Конкретнее, образцы белка получали с использованием невосстанавливающего буфера для образцов 4×SDS (Thermo Fisher Scientific) и 2-меркаптоэтанола в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях. Для невосстанавливающих условий получали образцы, которые нагревали при 100 °С в течение 5 минут или не нагревали для сравнения формы и размера белков путем нагревания. Для сравнения размеров белков в соответствующих условиях получили маркер размера белка (SMOBio, Тайвань). Полученные образцы

белка загружали в готовый гель Mini-protein TGX, 4-15%, 15-луночный (Bio-Rad) в количестве 1 мкг или 2 мкг на лунку, с последующим электрофорезом в триглицидном буфере с ДСН для электрофореза при 150 В в течение 1 часа. После завершения электрофореза ДСН-ПААГ подвергали взаимодействию с красящим раствором EZ-Gel (DogenBio, Южная Корея) для окрашивания в течение 1 часа с последующим удалением красителя в дистиллированной воде в течение одних суток.

[0230] На фиг. 3 показаны результаты электрофореза в ДСН-ПААГ для анализа размера белка АРВ-R3 в количестве 1 мкг/лунку и 2 мкг/лунку в восстанавливающих условиях (R), невосстанавливающих условиях с нагреванием (NR(B)) и невосстанавливающих условиях без нагревания (NR(NB)). Как показано на фиг. 3, белок тяжелой цепи SL335H-IL18BP в восстанавливающих условиях и в невосстанавливающих условиях с нагреванием в течение 5 минут демонстрировал белковую полосу при приблизительно 60 кДа, что превышает теоретический размер 41905 кДа из-за дополнительных N-связанных и O-связанных гликанов, а легкая цепь SL335L демонстрировала белковую полосу при 20 - 25 кДа, аналогичную теоретическому размеру (23311 кДа). И наоборот, в невосстанавливающих условиях без нагревания белковая полоса, соответствующая интактной форме АРВ-R3, в которой тяжелая цепь и легкая цепь связаны, наблюдалась с высокой чистотой при 75 - 100 кДа, а белковые полосы, каждая из которых соответствовала несвязанной тяжелой и легкой цепям, обнаруживались в слабой степени.

[0231] 1-2. Проверка чистоты

[0232] ЭХ-ВЭЖХ выполняли для измерения чистоты белка АРВ-R3, очищенного в примере 1-4. Сначала колонку TSKgel UltraSW Aggregate 7,8×300 мм (Tosoh Bioscience, Япония) и систему 1260 Infinity II LC (Agilent Technologies, Санта Клара, штат Калифорния, США) для ВЭЖХ уравнивали буфером на основе 20 мМ лимонной кислотой, рН 5,5. Аналитические образцы получали путем разбавления буфером на основе 20 мМ лимонной кислоты, рН 5,5, и ~25 мкг образца наносили на колонку. Анализ с помощью эксклюзионной ВЭЖХ выполняли при скорости потока 0,7 мл/мин и максимальном пределе давления 120 бар в течение 30 минут, чистоту измеряли при длине волны А280 нм.

[0233] На фиг. 4 показаны результаты ЭХ-ВЭЖХ анализа чистоты белка АРВ-R3 согласно одному из аспектов. Как показано на фиг. 4, подтвердили, что чистота белка АРВ-R3 составляла 98% или более.

[0234] 1-3. Проверка изоэлектрической точки

[0235] Для измерения изоэлектрической точки (pI) белка APB-R3, очищенного в примере 1-4, выполняли анализ посредством изоэлектрического фокусирования (IEF). Конкретнее, использовали гель для IEF при pH 3-10 (гель Cooma) и загружали 3 мкг, 5 мкг и 10 мкг образцов, условия представляли собой 100 В в течение 1 часа, 200 В в течение 1 часа и 500 В в течение 1 часа. Белок фиксировали 12% трихлоруксусной кислотой (ТХУК) и окрашивали кумасси бриллиантовым синим (СВВ). Затем анализировали pI белка с использованием ImageMaster™ 2D Platinum (GE Healthcare, вер. 5.0).

[0236] На фиг. 5 показаны результаты анализа изоэлектрической точки белка APB-R3 согласно одному из аспектов. Как показано на фиг. 5, полоса наблюдалась при pI от 4,40 до 6,00.

[0237] 1-4. Проверка молекулярной массы

[0238] Масс-спектрометрический анализ интактного соединения выполняли для измерения молекулярной массы белка APB-R3, полученного в примере 1. Конкретнее, масс-спектрометрический анализ интактного соединения выполняли в восстановленных условиях (20 mM ДТТ, 37 °C) с использованием УВЭЖХ Dionex (Thermo Fisher Scientific) и МС/МС-системы Q-TOF 5600+ (AB Sciex, штат Калифорния, США). Молекулярную массу измеряли в подвижной фазе ацетонитрила (ACN; J.T. Baker) при скорости потока 0,3 мл/мин с использованием колонки Acquity UPLC® BEH130 C4, 1,7 мкм; результаты приведены ниже в таблице 2.

Таблица 2

Результаты - ожидаемая и измеренная молекулярная масса		
Образец		Измеренная масса (m/z)
APB-R3	легкая цепь	23306
	тяжелая цепь	46611

[0239] Как показано в таблице 2, подтвердили, что молекулярная масса легкой цепи (SL335L) и тяжелой цепи (SL335H-IL18BP) белка APB-R3 составляла 23306 кДа и 46611 кДа, соответственно.

Экспериментальный пример 2. Оценка биологической активности белка APB-R3

[0240] 2-1. Проверка степени ингибирования ИЛ-18 (1)

[0241] Для оценки биологических функций белка АРВ-РЗ, очищенного в примере 1-4, исследовали степень ингибирования белка ИЛ-18 с использованием линии клеток человека KG-1 (ATCC, CCL-246), экспрессирующей ИФН- γ в ответ на ИЛ-18. Во-первых, образец белка из примера 1 получали путем разбавления образца PBS-буфером с добавлением 0,3% бычьего сывороточного альбумина (БСА). После этого каждый образец обрабатывали рекомбинантным белком ИЛ-18 человека (R&D Systems) и оставляли взаимодействовать в течение 1 часа в инкубаторе при 37 °С. Затем получали $1,3 \times 10^6$ клеток/мл клеток KG-1 в среде IMDM, содержащей рекомбинантный ФНО- α (BioLegend, Сан Диего, штат Калифорния, США), а затем вносили их в белковую смесь, в которой выполняли реакцию. Смесь клеток и белков подвергали взаимодействию в течение 23 часов в инкубаторе в условиях 37 °С и 5% CO₂, а затем разделяли надосадочную жидкость и клетки с использованием центрифуги. Отделенную надосадочную жидкость анализировали с целью измерения количества ИФН- γ , секретируемого клетками KG-1 под действием рекомбинантного ИЛ-18. Концентрацию ИФН- γ , секретируемого в надосадочную жидкость, анализировали с использованием твердофазного ИФА ELISA MAXTM Deluxe Set ИФН- γ человека (BioLegend) в соответствии со стандартной методикой эксперимента, указанной в данном продукте. Продукт из сравнительного примера 1 и белок SL335 анализировали таким же образом.

[0242] На фиг. 6 представлен график, демонстрирующий ингибирование ИЛ-18 в линии клеток KG-1 белком АРВ-РЗ согласно одному из аспектов. Как показано на фиг. 6, клетки KG-1 продуцировали и экспрессировали ИФН- γ в зависимости от концентрации ИЛ-18, а белок АРВ-РЗ ингибировал продукцию ИФН- γ в зависимости от концентрации, подобно белку IL-18BP-His. Кроме того, IC₅₀ АРВ-РЗ составляла 0,0419 нМ, а IC₅₀ IL-18BP-His составляла 0,0240 нМ, что указывает на то, что IL-18BP человека, объединенный с SL335, сохранял свое биологическое свойство в неизменном виде.

[0243] 2-2. Проверка степени ингибирования ИЛ-18 (2)

[0244] Для оценки биологических функций белка АРВ-РЗ, очищенного в примере 1-4, исследовали степень ингибирования ИЛ-18 АРВ-РЗ с использованием наивных CD4⁺ Т-клеток, выделенных из C57BL/6 мыши (Orient Bio). Сначала антитело против CD3 (Biolegend, клон 145-2C11), разбавленное до концентрации 5 мкг/мл PBS-буфером, вносили в количестве 50 мкл в каждую лунку 96-луночного планшета для культивирования (Corning, 3596), а затем иммобилизовали при 4 °С в течение 16 часов. Планшет дважды промывали 200 мкл PBS/лунку, а затем добавляли клетки. Перед обработкой выделенных наивных CD4⁺ Т-клеток образцом выполняли следующую

предварительную обработку. Рекомбинантный белок ИЛ-18 мыши (R&D Systems) и рекомбинантный белок ИЛ-12 мыши (PeproTech) получали в концентрации 10 нг/мл путем разбавления средой RPMI1640 (Gibco), содержащей 10% эмбриональной сыворотки КРС (FBS) (Gemini Bio), 50 мкМ 2-меркаптоэтанола (Gibco), 10 мМ HEPES (Gibco) и 5 мкг/мл гентамицина (Gibco), а затем смешивали с последовательно разведенными образцами белка APB-R3 и оставляли взаимодействовать в инкубаторе при 37 °С в течение 1 часа. Затем провзаимодействовавшие образцы обрабатывали CD4⁺ Т-клетками в количестве $1,0 \times 10^5$ клеток/мл и оставляли взаимодействовать в течение 48 часов в инкубаторе при 37 °С и 5% CO₂. Для измерения количества ИФН- γ , секретируемого CD4⁺ Т-клетками под действием рекомбинантного ИЛ-18 мыши, отделенную надосадочную жидкость анализировали с использованием твердофазного ИФА ELISA MAXTM Deluxe Set ИФН- γ мыши (BioLegend) в соответствии со стандартной методикой эксперимента, указанной в данном продукте. Продукт из сравнительного примера 1, рекомбинантный IL-18BP мыши (R&D System) и белок SL335 анализировали таким же образом.

[0245] На фиг. 7 показан график, демонстрирующий ингибирование ИЛ-18 в CD4⁺ Т-клетках мыши белком APB-R3 согласно одному из аспектов. Как показано на фиг. 7, CD4⁺ Т-клетки мыши продуцировали и экспрессировали ИФН- γ в зависимости от концентрации ИЛ-18, а белок APB-R3 ингибировал продукцию ИФН- γ в зависимости от концентрации, подобно белку IL-18BP-His человека. И наоборот, было подтверждено, что IL-18BP мыши ингибировал продукцию ИФН- γ в зависимости от концентрации, однако его ингибирующая активность была ниже, чем у APB-R3.

Экспериментальный пример 3. Фармакокинетическая оценка белка APB-R3

[0246] Всасывание, распределение, изменения *in vivo* и выведение белка APB-R3, полученного в примере 1, исследовали с помощью фармакокинетики. Конкретнее, после выкармливания 20 здоровых самцов крыс, полученных из Koatech (Южная Корея), пяти мышам выполняли однократное подкожное введение белка, полученного в примере 1, в дозе по 6 мг/кг, с последующим однократным внутривенным введением в дозе 2 мг/кг. Кроме того, выполняли однократное подкожное введение белка, полученного в сравнительном примере 1 (пяти мышам) в дозе 3 мг/кг, соответственно, с последующим внутривенным введением (пяти мышам) в дозе 1 мг/кг. Затем выполняли отбор 0,5 мл цельной крови из яремной вены в соответствии с заранее определенным графиком отбора крови [однократное подкожное введение: 0, 0,33, 1, 1,5, 3, 5, 7, 12, 24, 48, 72, 120

и 168 часов (всего 13 точек), однократное внутривенное введение: 0, 0,083, 0,25, 0,5, 1,25, 3, 5, 10, 24, 48 и 72 часа (всего 11 точек)], плазму отделяли центрифугированием и хранили в криогенном морозильнике (-70 °С). Затем выполняли твердофазный ИФА для количественного анализа концентрации белка в плазме. В течение экспериментального периода мертвых животных и аномальных симптомов, связанных с введением исследуемого соединения, не наблюдали.

[0247] На фиг. 8 показан график, демонстрирующий концентрацию белка в крови после подкожного введения белка APB-R3 крысам. Как показано на фиг. 8, белки, полученные в примере 1 и сравнительном примере 1, достигали максимальной концентрации в крови ($C_{\text{макс}}$) через 24 часа и 12 часов после подкожного введения крысам, соответственно, а затем снижались. Конкретнее, для примера 1 продемонстрирована концентрация 23817,148 нг/мл, а для сравнительного примера 1 - 2533,5136 нг/мл, что указывает на различие приблизительно в 9,4 раза. Кроме того, для примера 1 показано значение воздействия *in vivo* (AUC посл.), равное 1595699,12 ч·нг/мл, что приблизительно в 22,8 раза выше, чем для сравнительного примера 1, для которого показано значение 69900,47 ч·нг/мл. Кроме того, для примера 1 продемонстрирован период полужизни ($T_{1/2}$) приблизительно 34,92 часа, а для сравнительного примера 1 - приблизительно 9,69 часа, что указывает на приблизительно в 3,6 раза большую продолжительность периода полужизни для примера 1.

[0248] На фиг. 9 представлен график, на котором показаны концентрации белка в крови после внутривенного введения белка APB-R3 крысам. Как показано на фиг. 9, при измерении через 0,083 часа после внутривенного введения белков, полученных в примере 1 и сравнительном примере 1, крысам максимальная концентрация в крови составляла 109049,3 нг/мл и 41969,6564 нг/мл, соответственно, что указывает на приблизительно в 2,6 раза более высокую концентрацию, продемонстрированную для примера 1. Кроме того, отмечено, что период полужизни для примера 1 составлял 21,81 часа, а период полужизни для сравнительного примера 1 - 6,51 часа, что указывает на приблизительно в 3,4 раза большую продолжительность периода полужизни для примера 1.

[0249] Другими словами, рекомбинантный гибридный белок может демонстрировать увеличенный период полужизни в организме независимо от способа введения, и, следовательно, пациентам можно вводить данное лекарственное средство с более удобными интервалами. Кроме того, рекомбинантный гибридный белок обладает такой же или аналогичной активностью по сравнению с существующим белком IL-18BP даже

при небольшой дозе, и, таким образом, можно расширить выбор терапевтических агентов.

Экспериментальный пример 4. Исследование эффективности *in vivo* на модели синдрома активации CpG-индуцированных макрофагов у мыши

[0250] 4-1. Материалы и методы

[0251] Все мыши, использованные в эксперименте, были выкормлены в лабораторном центре для животных в Кангвонском национальном университете. Мышей с IL18bp KO (нокаутом IL18bp) получали с использованием методик CRISPR/Cas9 с C57BL/6 (Orient Bio) из Macrogen (Южная Корея), в эксперименте использовали мышей в возрасте старше 8 недель.

[0252] Каждое соединение из 150 мкг APB-R3, 90 мкг Fab-фрагмента антитела против сывороточного альбумина (SL335), 250 мкг антитела против ИЛ-1-бета мыши (BioXcell, BE0246), 250 мкг антитела против ИЛ-6R мыши (BioXcell, BE0047), 250 мкг изотипического контрольного антитела (BioXcell, BP0085) и среды-носителя (PBS) вводили внутривентриально каждый день в течение 9 дней. CpG ODN 1826 синтезировали в Integrated DNA Technologies, Inc. (Коралвилл, штат Айова, США) и растворяли в PBS. Через 2 часа после введения каждого антитела в дни 0, 2, 4, 6, 8 каждой мыши внутривентриально вводили 50 мкг растворенного CpG ODN 1826. Во время эксперимента всех мышей взвешивали каждый день на весах.

[0253] Образцы крови из глазной вены мышей, взятые с помощью капилляра с гепарином (Superior, HSU-2901000) на 10 день, центрифугировали при 4 °C и 8000 об/мин после инкубирования в течение часа при комнатной температуре. Сыворотку верхнего слоя отделяли и хранили в криотемпературном морозильнике при -80°C. Использовали набор для твердофазного ИФА ИФН-гамма мыши (Biolegend, 430804), набор для анализа CXCL9/MiGA мыши (R&D, DY492-05) и набор для твердофазного ИФА ферритина мыши (Abcam, ab157713); эксперименты выполняли в соответствии с протоколами, рекомендованными производителем. Аспартаттрансаминазу (АСТ) и аланинтрансаминазу (АЛТ) измеряли с помощью DK Korea (Южная Корея) с использованием Beckman AU480 (Брея, штат Калифорния, США) в соответствии со стандартной методикой IFCC (Международной федерации клинической химии).

[0254] Всех мышей умерщвляли на 10 день, селезенку и печень каждой мыши извлекали для измерения массы, клеточного фенотипирования с помощью проточной цитометрии

на BD FACSVerserTM (BD Biosciences), гистологического анализа при окрашивании гематоксилином и эозином (H&E).

[0255] 4-2. Результаты

[0256] Синдром активации макрофагов (MAS) у мышей C57BL/6 индуцировали CpG - агонистом TLR9. У всех мышей с нокаутом IL-18BP (KO), но не у мышей дикого типа (ДТ) наблюдали значительную потерю массы тела. Масса тела аналогичным образом восстанавливалась в группе с нокаутом, получавшей APB-R3, и в необработанных группах, однако не восстанавливалась в группе, получавшей конкурентные антитела (против IL-6R и против ИЛ-1-бета) (фи. 10).

[0257] Массу печени и селезенки измеряли в конце эксперимента с учетом гепатомегалии и спленомегалии при MAS, соответственно. Значимых различий в массе печени/массе тела между группой с КО, получавшей CpG + APB-R3, и группой ДТ, получавшей CpG, не наблюдали (фиг. 11B). С другой стороны, отношение масса селезенки/масса тела было ниже в группе с КО, получавшей CpG + APB-R3, по сравнению с группами с КО, получавшими как CpG + антитело против IL-6R, так и CpG + антитело против ИЛ-1-бета (конкурентные антитела) (фиг. 11A).

[0258] Уровни АСТ и АЛТ в сыворотке измеряли в конце эксперимента на Beckman AU480. Уровни АСТ и АЛТ в группе с КО, получавшей CpG + APB-R3, были аналогичны уровням в необработанных группах ДТ, необработанных группах с КО и группах ДТ, получавших CpG, однако статистически более низкими ($p < 0,05$) по сравнению с группами с КО, получавшими как CpG + антитело против IL-6R, так и CpG + антитело против ИЛ-1-бета (фиг. 12A и 12B). Кроме того, уровни ИФН- γ и CXCL9 в сыворотке снижались в группе с КО, получавшей CpG + APB-R3, по сравнению с другими группами, получавшими CpG (фиг. 13A и 13B).

[0259] Популяцию моноцитов/макрофагов селезенки измеряли с помощью проточной цитометрии на FACSVerser. Популяция этих клеток была увеличена в группах, получавших CpG, но слегка понижена в группе, получавшей APB-R3, которая была аналогична группе ДТ, получавшей CpG (фиг. 14).

[0260] Извлеченную печень и селезенку окрашивали H&E в конце эксперимента. Нарушение структуры селезенки наблюдалось во всех группах, получавших CpG, однако в группе, получавшей APB-R3, наблюдалась относительно консервативная область лимфоидных фолликулов. Некоторая инфильтрация иммунными клетками, индуцированная воспалением, выявлена во всех группах, получавших CpG, однако в группе, получавшей APB-R3, наблюдалась относительно более низкая инфильтрация по

сравнению с обеими группами, получавшими конкурентные антитела (данные не показаны).

Экспериментальный пример 5. Средство связывания

[0261] 7-1. Материал и способ

[0262] Анализ на основе поверхностного плазмонного резонанса (ППР) выполняли в Институте иммунологии Wide River (Сеульский национальный университет, Сеул, Южная Корея) для измерения средства связывания, равновесной константы диссоциации (K_D) APB-R3 с рекомбинантным ИЛ-18 человека (Prospec) и человеческим сывороточным альбумином (Sigma) с использованием BiaCore™ T200 (GE Healthcare), сенсорного чипа CM5 (Cytiva) и HBS-EP+ (Cytiva) в качестве рабочего буфера. APB-R3 иммобилизовали с помощью набора для связывания аминов (GE Healthcare) при pH 4,5, анализируемый ИЛ-18 человека разбавляли и получали в концентрациях 62,5 нМ, 31,3 нМ, 15,6 нМ, 7,8 нМ, 3,9 нМ и 1,95 нМ, а анализируемый человеческий сывороточный альбумин разбавляли и получали в концентрациях 1250 нМ, 625 нМ, 313 нМ, 156 нМ, 78 нМ, 39 нМ и 19,5 нМ. Кинетику между APB-R3 и ИЛ-18 человека или человеческим сывороточным альбумином анализировали с помощью аппроксимации моделью связывания при соотношении 1:1.

[0263] 7-2. Результат

[0264] Известно, что средство связывания (K_D) изоформы а (IL-18BP_a) IL-18BP человека по отношению к ИЛ-18 человека составляет 399 пМ, согласно определению с помощью анализов средства на BIACore (Kim, S.-H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 97:1190-1195 (2000)). В настоящем исследовании средство связывания APB-R3, гибридного белка "Fab-фрагмент против сывороточного альбумина + IL-18BP_a человека" с ИЛ-18 человека и человеческим сывороточным альбумином определяли с помощью анализа на основе поверхностного плазмонного резонанса (ППР) (BiaCore™ T200); значение средства связывания (K_D) APB-R3 с рекомбинантным ИЛ-18 человека составляло $6,09 \times 10^{-11}$ М (60,9 пМ), что приблизительно в 6 раз выше, чем у IL-18BP_a человека (60,9 пМ по сравнению с 399 пМ), как описано в статье Kim S.-H. et al. (2000). Значение K_D APB-R3 для человеческого сывороточного альбумина составило $1,68 \times 10^{-8}$ М (16,8 нМ) (таблица 3).

Таблица 3.

Лиганд	Анализируемое соединение	K_D (М)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)
--------	--------------------------	-----------	--------------	-------------

APB-R3	ИЛ-18 человека	6,09E-11	4,06E+05	2,48E-05
	Сывороточный альбумин человека	1,68E-08	9,38E+04	1,57E-03

Экспериментальный пример 6. Анализ иммуногенности APB-R3 *in vitro*

[0265] Материалы и способы

[0266] Риск иммуногенности APB-R3 *in vitro* оценивали у 52 здоровых доноров целевой популяции человека с использованием платформы для анализа пролиферации РВМС *in vitro* производства Lonza (анализ пролиферации *in vitro* Epibase®) для анализа пролиферации Т-клеток. В качестве положительного контроля использовали гемоцианин гемоцианин *Megathura crenulata* (KLH).

[0267] Результаты

[0268] Значительный CD4+ Т-клеточный ответ индуцировался у 98% (51/52) доноров за счет положительного контроля KLH, что значимо отличалось от холостой группы по всей исследуемой популяции. Значительный CD4+ Т-клеточный ответ индуцировался лишь у 10% (5/52) доноров за счет APB-R3, что не отличалось от холостой группы по всей исследуемой популяции значимым образом. Результаты показывают, что риск иммуногенности APB-R3 можно считать относительно низким (таблица 4).

Таблица 4.

Молекула	Доноры, реагирующие на обработку (%)	Среднее значение SI (CD4+ Т-клеточный ответ)	р-значение
APB-R3	5/52 (10%)	1,15	< 0,0581
KLH	51/52 (98%)	25,86	< 0,0001

*р-значение относится к гипотезе t-критерия для одной выборки о том, что частотное распределение SI для данного антигена представляет собой распределение со средним значением SI, равным 1.

[0269] Вышеприведенное описание настоящего изобретения предназначено исключительно для иллюстративных целей, и специалисты в данной области техники должны понимать, что настоящее изобретение легко модифицировать в другой конкретной форме без изменения технической сущности изобретения или его существенных характеристик. Следовательно, следует понимать, что вышеприведенные типичные варианты реализации являются не ограничительными, а иллюстративными во всех аспектах.

[0270] Все из аспектов, вариантов реализации и альтернативных вариантов, описанных в настоящем документе, можно объединять с всеми возможными вариантами.

[0271] Все публикации, патенты и заявки на патент, перечисленные в настоящем документе, включены в настоящий документ посредством ссылки в той же степени, как если бы было конкретно и отдельно указано, что каждая отдельная публикация, патент или заявка на патент включены в настоящий документ посредством ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантный гибридный белок, содержащий белок, связывающий интерлейкин-18 (IL-18BP), и антигенсвязывающий фрагмент (Fab) против сывороточного альбумина.

2. Белок по п. 1, дополнительно содержащий линкер, связывающий IL-18BP с Fab.

3. Белок по п. 2, характеризующийся тем, что линкер связывает IL-18BP с С-концом константного домена тяжелой цепи, N-концом переменного домена тяжелой цепи, С-концом константного домена легкой цепи и/или N-концом переменного домена легкой цепи Fab.

4. Белок по п. 3, характеризующийся тем, что линкер связывает IL-18BP с С-концом константного домена тяжелой цепи.

5. Белок по любому из пп. 2-4, характеризующийся тем, что линкер содержит от 1 до 50 аминокислот.

6. Белок по п. 5, характеризующийся тем, что линкер содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:16 и 70-84.

7. Белок по любому из пп. 1-6, характеризующийся тем, что тяжелая цепь и легкая цепь Fab связаны нековалентной связью.

8. Белок по любому из пп. 1-7, характеризующийся тем, что Fab содержит тяжелую цепь, содержащую переменный домен тяжелой цепи, содержащий (1) определяющий комплементарность домен 1 (CDR1) тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SYGIS (SEQ ID NO:22), определяющий комплементарность домен 2 (CDR2) тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность WINTYSSGGTKYAQKFQG (SEQ ID NO:23), и

определяющий комплементарность домен 3 (CDR3) тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность LGHCQRGICSDALDT (SEQ ID NO:24);

(2) CDR1 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SYGIS (SEQ ID NO:22),

CDR2 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность RINTYNGNTGYAQLQG (SEQ ID NO:25), и

CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность LGHCQRGICSDALDT (SEQ ID NO:24);

(3) CDR1 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность NYGIH (SEQ ID NO:26),

CDR2 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SISYDGSNKYYYADSVKG (SEQ ID NO:27), и

CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность DVHYYGSGYYNAFDI (SEQ ID NO:28);

(4) CDR1 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SYAMS (SEQ ID NO:29),

CDR2 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность VISHDGGFQYYADSVKG (SEQ ID NO:30), и

CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность AGWLRQYGMDV (SEQ ID NO:31);

(5) CDR1 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность AYWIA (SEQ ID NO:32),

CDR2 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность MIWPPDADARYSPSFQG (SEQ ID NO:33), и

CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность LYSGSYSP (SEQ ID NO:34); или

(6) CDR1 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность AYSMN (SEQ ID NO:35),

CDR2 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SISSSGRYIHADSVKG (SEQ ID NO:36), и

CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность ETVMAGKALDY (SEQ ID NO:37); и

легкую цепь, содержащую вариabельный домен легкой цепи, содержащий

- (7) CDR1 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность RASQISRYLN (SEQ ID NO:38),
CDR2 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность GASRRLES (SEQ ID NO:39), и
CDR3 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность QQSDSVPVT (SEQ ID NO:40);
- (8) CDR1 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность RASQISSYLN (SEQ ID NO:41),
CDR2 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность AASSLQS (SEQ ID NO:42), и
CDR3 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность QQSYSTPPYT (SEQ ID NO:43);
- (9) CDR1 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность RASQSIFNYVA (SEQ ID NO:44),
CDR2 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность DASNRAT (SEQ ID NO:45), и
CDR3 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность QQRSKWPPTWT (SEQ ID NO:46);
- (10) CDR1 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность RASETVSSRQLA (SEQ ID NO:47),
CDR2 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность GASSRAT (SEQ ID NO:48), и
CDR3 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность QQYGSSPRT (SEQ ID NO:49);
- (11) CDR1 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность RASQSVSSSLA (SEQ ID NO:50),
CDR2 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность GASSRAT (SEQ ID NO:48), и
CDR3 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность QKYSSYPLT (SEQ ID NO:51); или
- (12) CDR1 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность RASQSVGSNLA (SEQ ID NO:52),
CDR2 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность GASTGAT (SEQ ID NO:53), и

CDR3 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность QQYYSFЛАКТ (SEQ ID NO:54).

9. Белок по любому из пп. 1-8,

характеризующийся тем, что переменный домен тяжелой цепи содержит CDR1 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:35, CDR2 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:36, и CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:37, и

переменный домен легкой цепи содержит CDR1 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:52, CDR2 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:53, и CDR3 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:54.

10. Белок по любому из пп. 1-9, характеризующийся тем, что переменный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO:55, 56, 57, 58, 59 или 60.

11. Белок по любому из пп. 1-10, характеризующийся тем, что переменный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO:61, 62, 63, 64, 65, 66 или 67.

12. Белок по любому из пп. 1-11, характеризующийся тем, что переменный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:55, 56, 57, 58, 59 или 60, и переменный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:61, 62, 63, 64, 65, 66 или 67.

13. Белок по любому из пп. 1-12, характеризующийся тем, что константный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO:68.

14. Белок по любому из пп. 1-13, характеризующийся тем, что константный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO:69.

15. Белок по любому из пп. 1-14, характеризующийся тем, что белок, связывающий ИЛ-18, содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO:7.

16. Белок по любому из пп. 1-15, характеризующийся тем, что белок, связывающий ИЛ-18, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7.

17. Белок по любому из пп. 1-16, характеризующийся тем, что тяжелая цепь Fab содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:19.

18. Белок по любому из пп. 1-17, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:13 и аминокислотную последовательность SEQ ID NO:19.

19. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая рекомбинантный гибридный белок по любому из пп. 1-18.

20. Экспрессирующий вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п. 19.

21. Клетка, трансформированная экспрессирующим вектором по п. 20.

22. Композиция, содержащая рекомбинантный гибридный белок по любому из пп. 1-18.

23. Фармацевтическая композиция, содержащая композицию по п. 22 и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

24. Набор, содержащий композицию по п. 22 или 23 и этикетку, содержащую инструкции по применению.

25. Способ лечения иммунного заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение указанному субъекту эффективного количества фармацевтической композиции по п. 23.

26. Способ по п. 25, характеризующийся тем, что указанное иммунное заболевание представляет собой воспалительное заболевание или аутоиммунное заболевание.

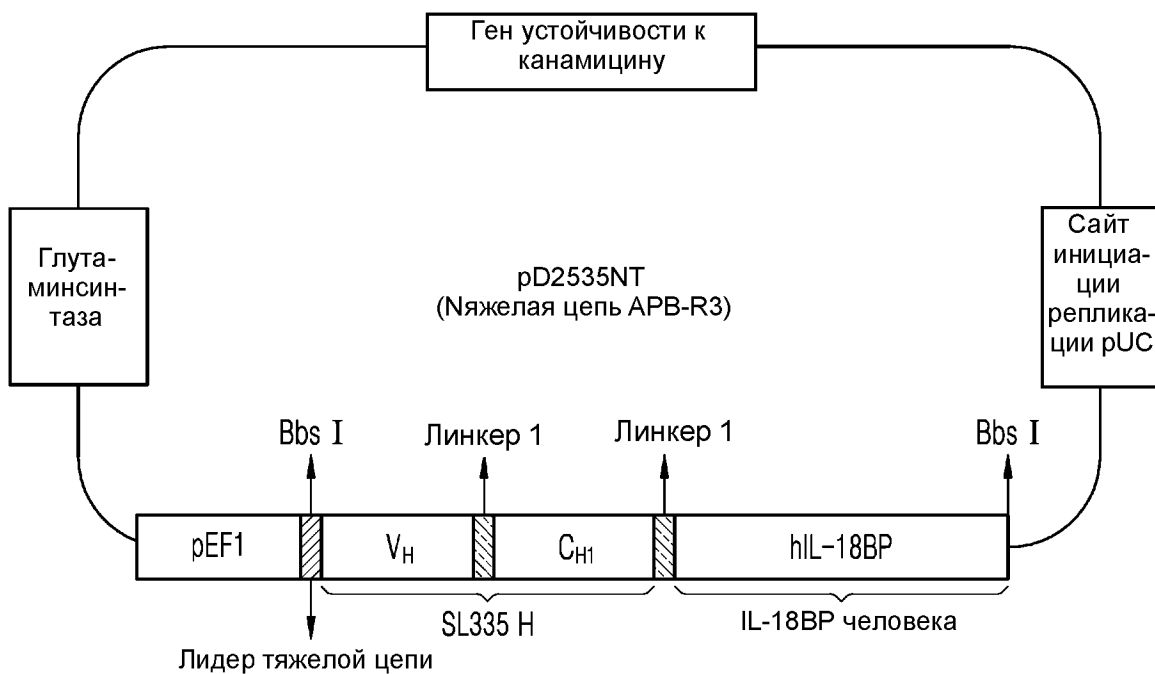
27. Способ по п. 26, характеризующийся тем, что воспалительное заболевание представляет собой атопический дерматит, псориаз, дерматит, аллергию, артрит, ринит, средний отит, боль в горле, тонзиллит, цистит, нефрит, воспаление органов таза, болезнь Крона, язвенный колит, анкилозирующий спондилит, системную красную волчанку (СКВ), астму, отек, аллергическую реакцию замедленного типа (аллергическую реакцию IV типа), отторжение трансплантата, болезнь «трансплантат против хозяина», аутоиммунный энцефаломиелит, рассеянный склероз, воспалительное заболевание кишечника, муковисцидоз, диабетическую ретинопатию, ишемическое реперфузионное повреждение, рестеноз сосудов, гломерулонефрит или желудочно-кишечную аллергию.

28. Способ по п. 26, характеризующийся тем, что аутоиммунное заболевание представляет собой болезнь Стилла, развившуюся во взрослом возрасте, системный ювенильный идиопатический артрит, синдром активации макрофагов, ревматоидный артрит, синдром Шегрена, системный склероз, полимиозит, системный ангиит, смешанное заболевание соединительной ткани, болезнь Крона, болезнь Хашимото, болезнь Грейвса, синдром Гудпасчера, синдром Гийена-Барре, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру, синдром раздраженного кишечника, миастению гравис, гипнолепсию, обыкновенную пузырчатку, пернициозную анемию, первичный билиарный цирроз, язвенный колит, васкулит, гранулематоз Вегенера или псориаз.

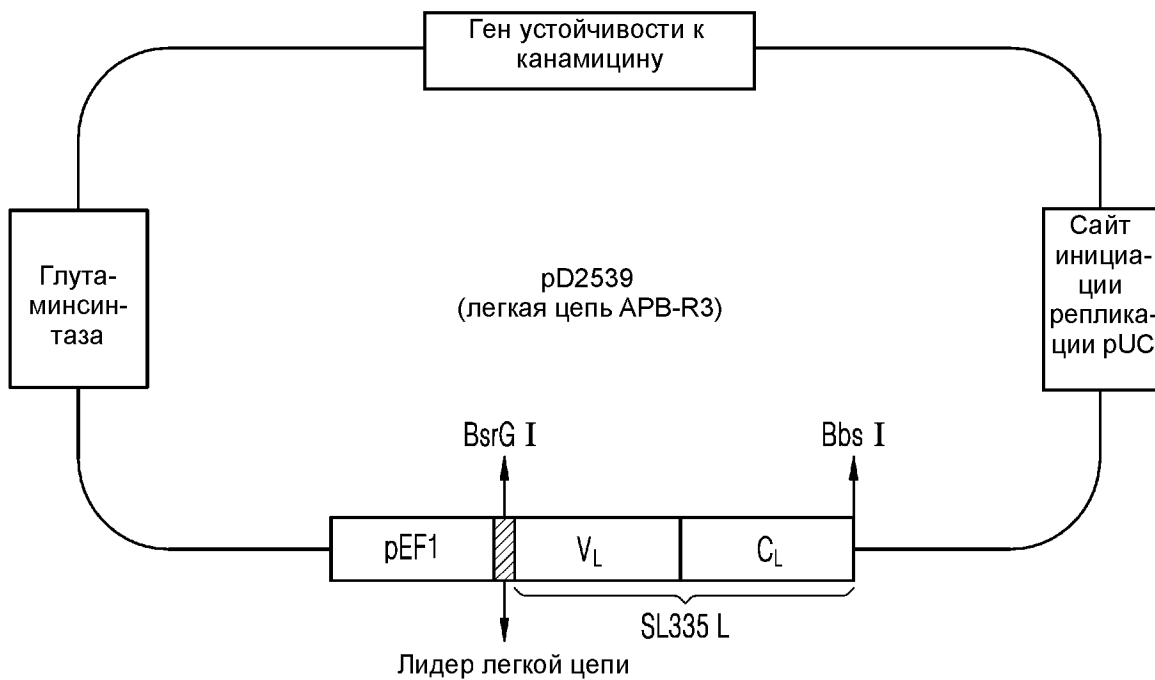
29. Способ лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение указанному субъекту эффективного количества фармацевтической композиции по п. 23.

30. Способ по п. 29, характеризующийся тем, что указанный рак представляет собой множественную миелому, рак легких, рак печени, рак желудка, рак ободочной и прямой кишки, рак толстой кишки, рак кожи, рак мочевого пузыря, рак предстательной железы, рак молочной железы, рак яичников, рак шейки матки, рак щитовидной железы, рак почек, фибросаркому, меланому или рак крови.

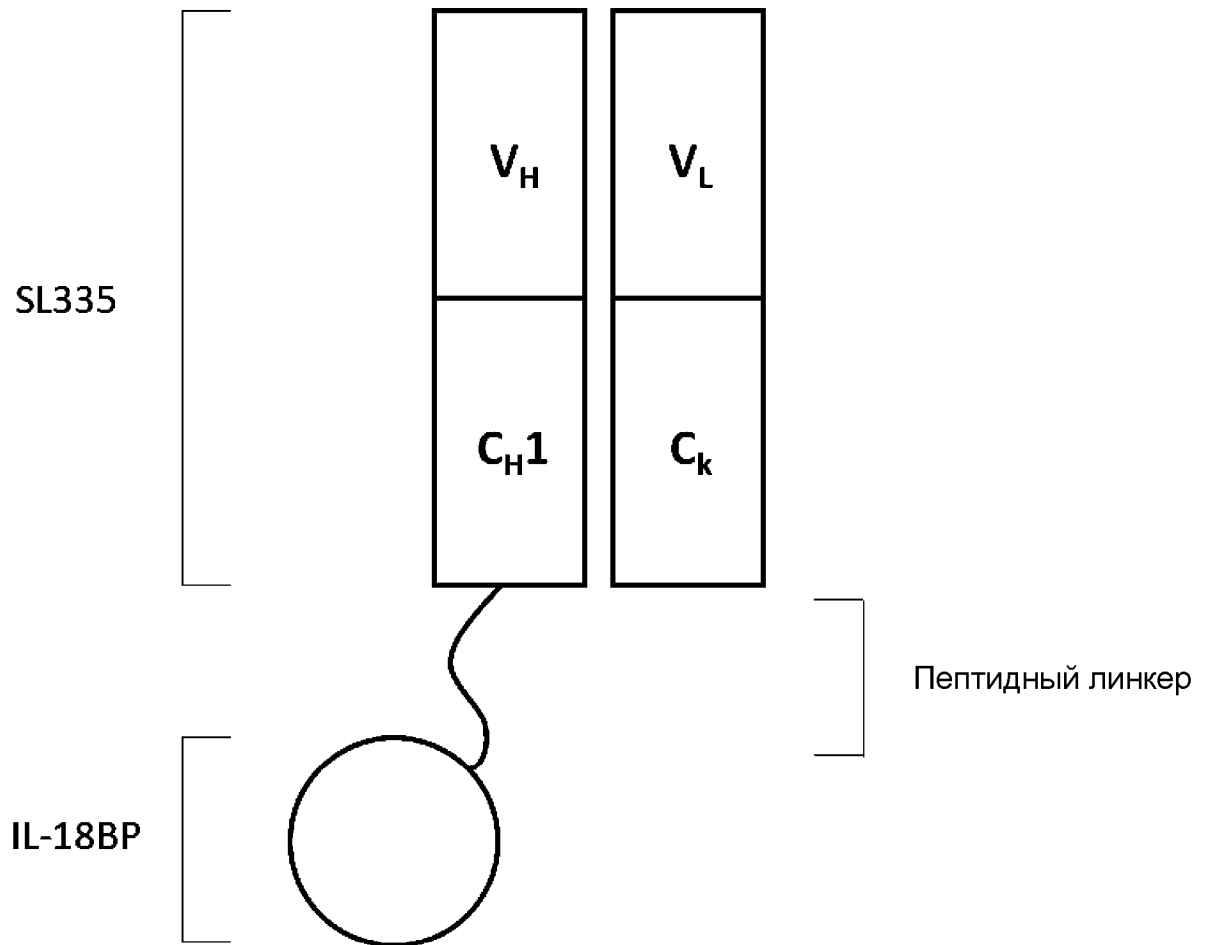
ФИГ. 1А



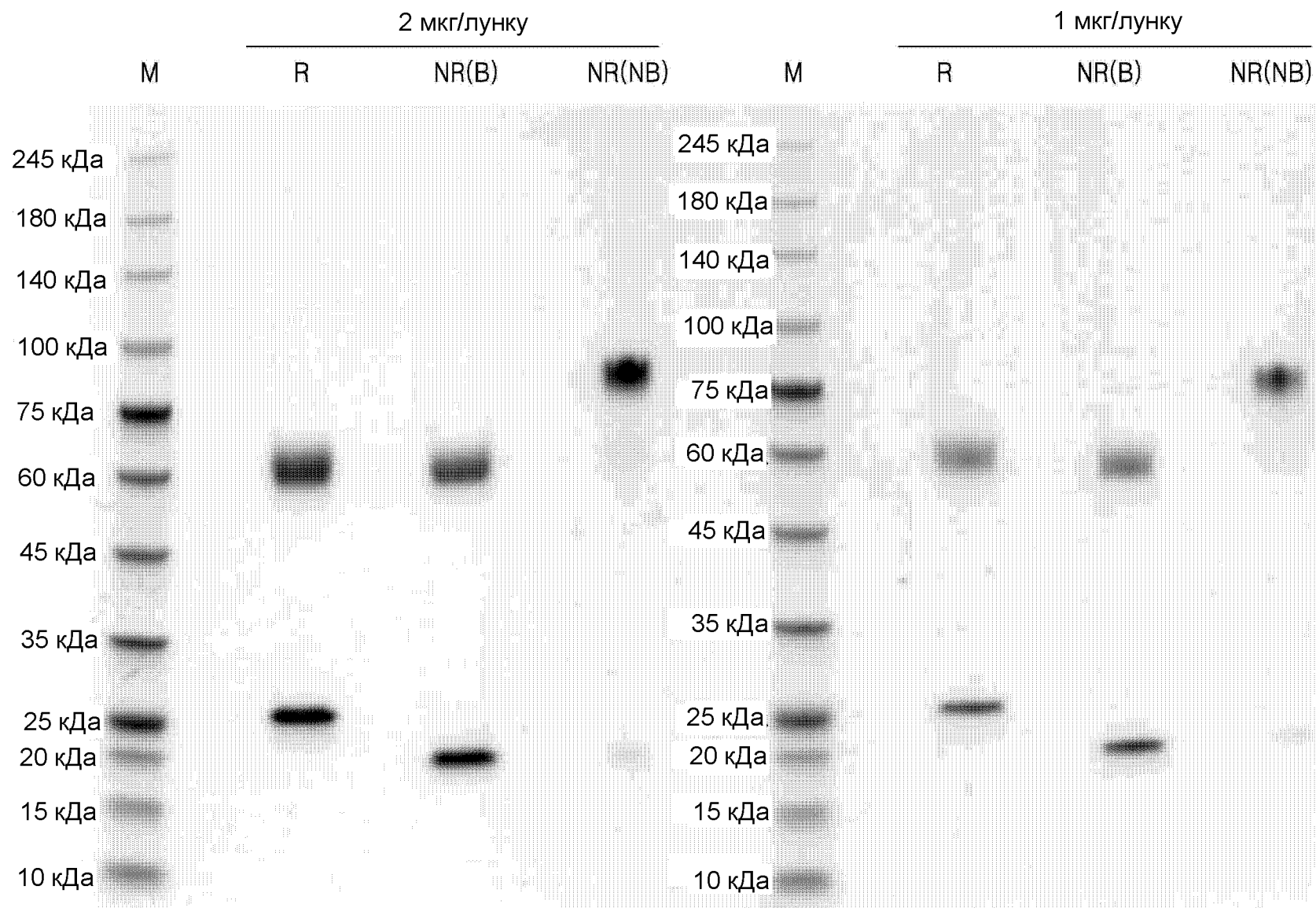
ФИГ. 1В



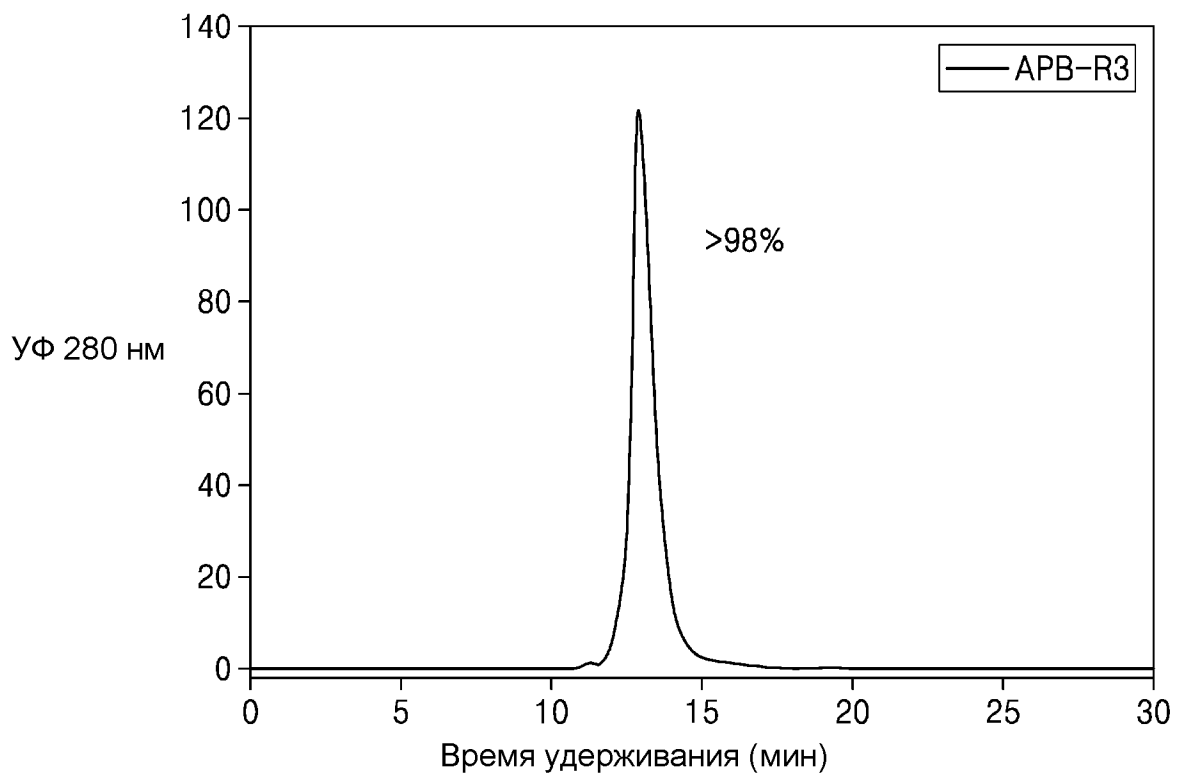
ФИГ. 2



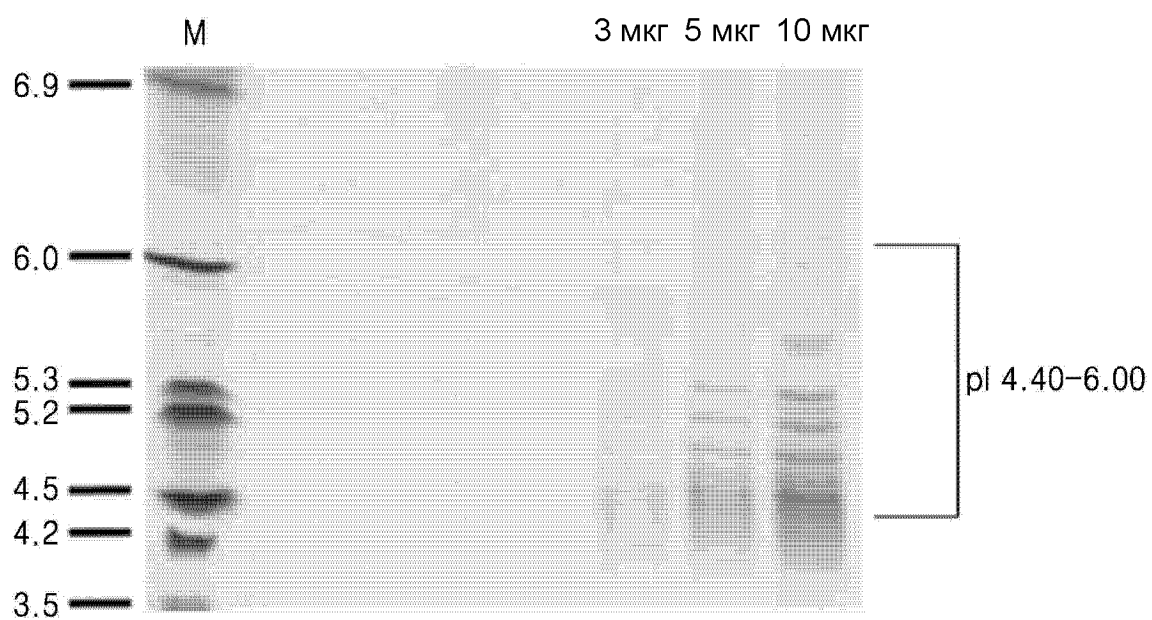
ФИГ. 3



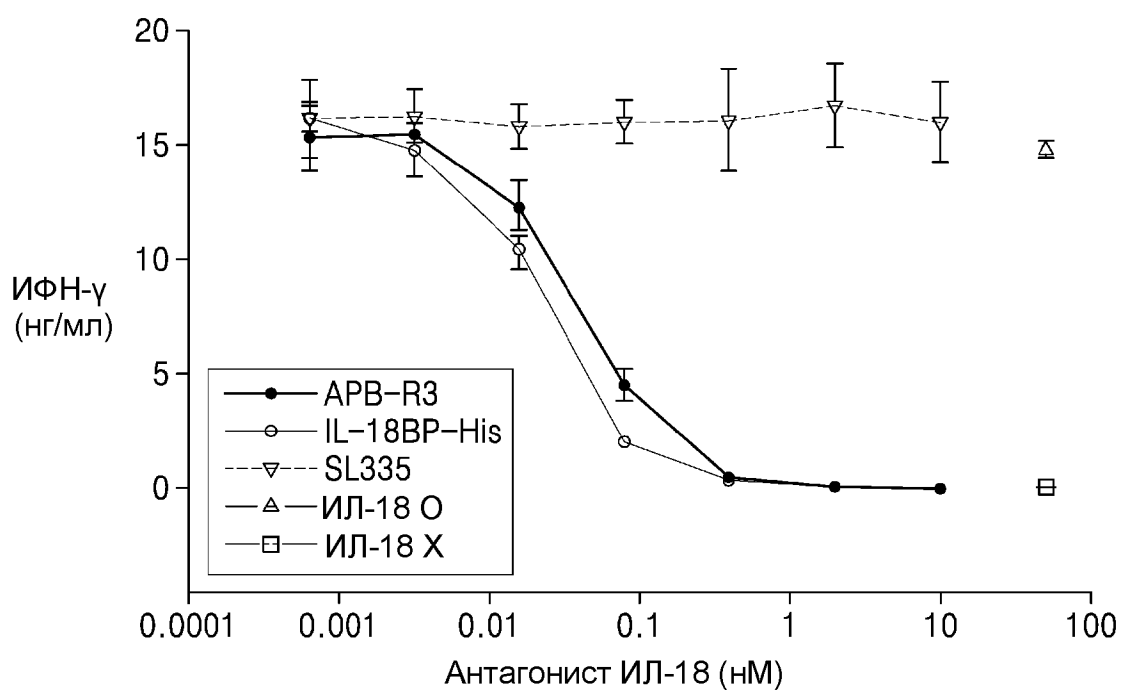
ФИГ. 4



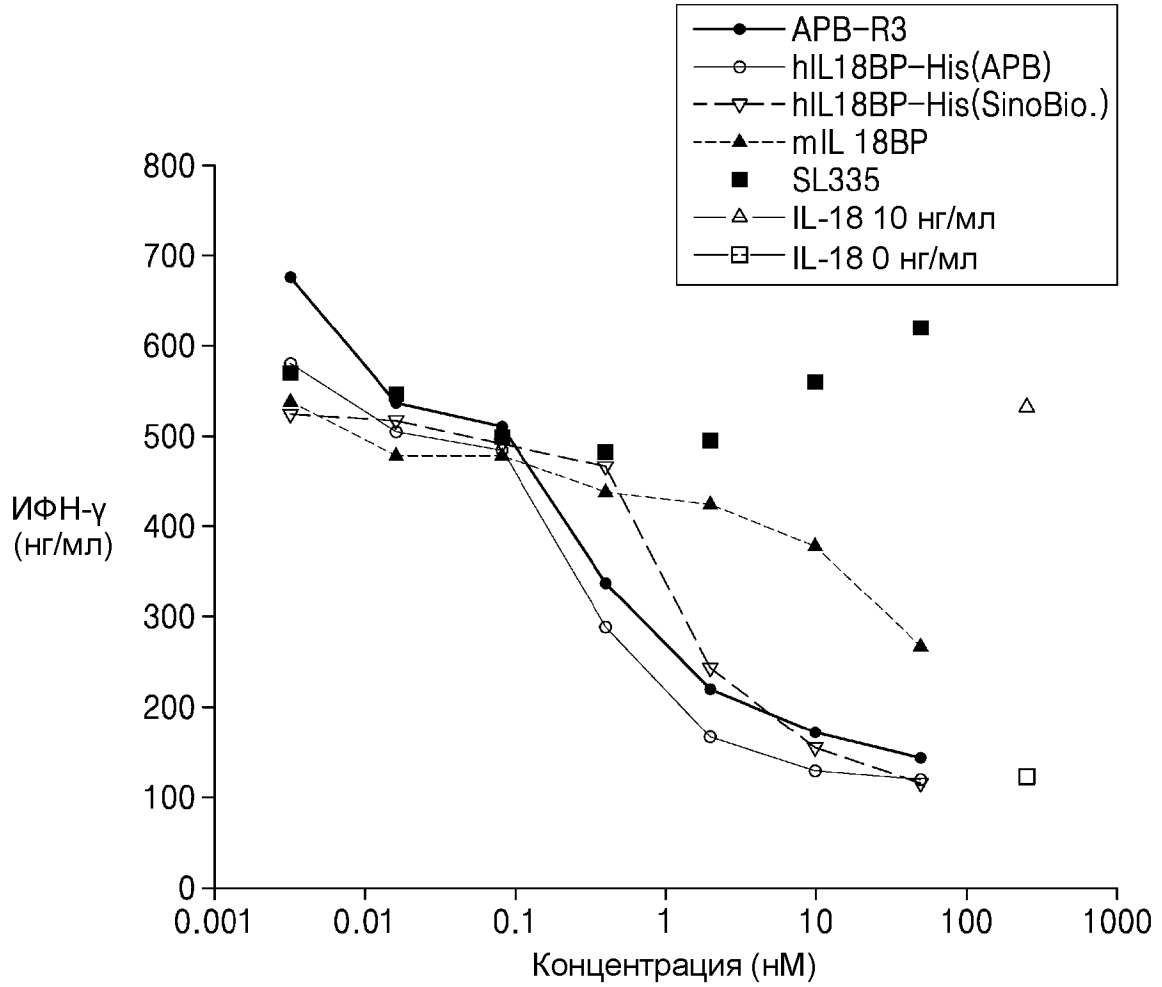
ФИГ. 5



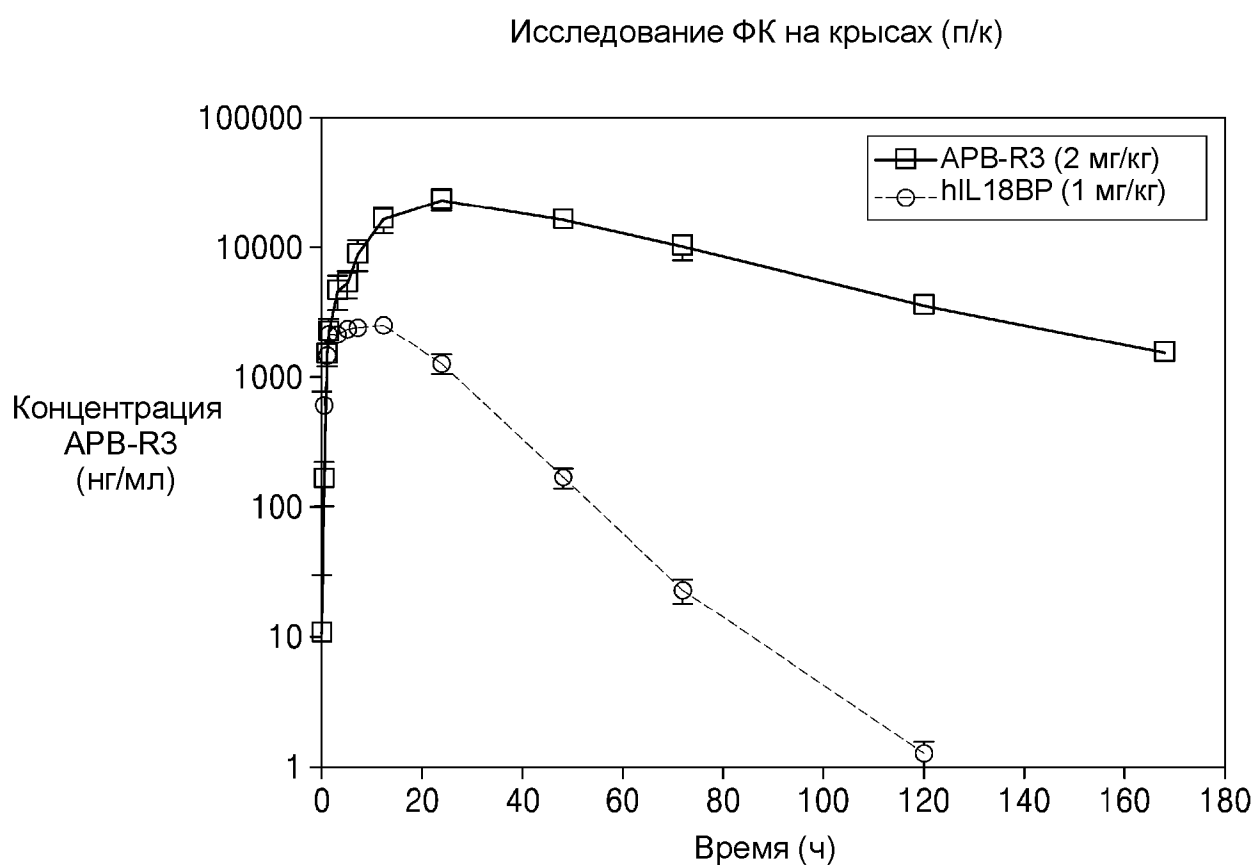
ФИГ. 6



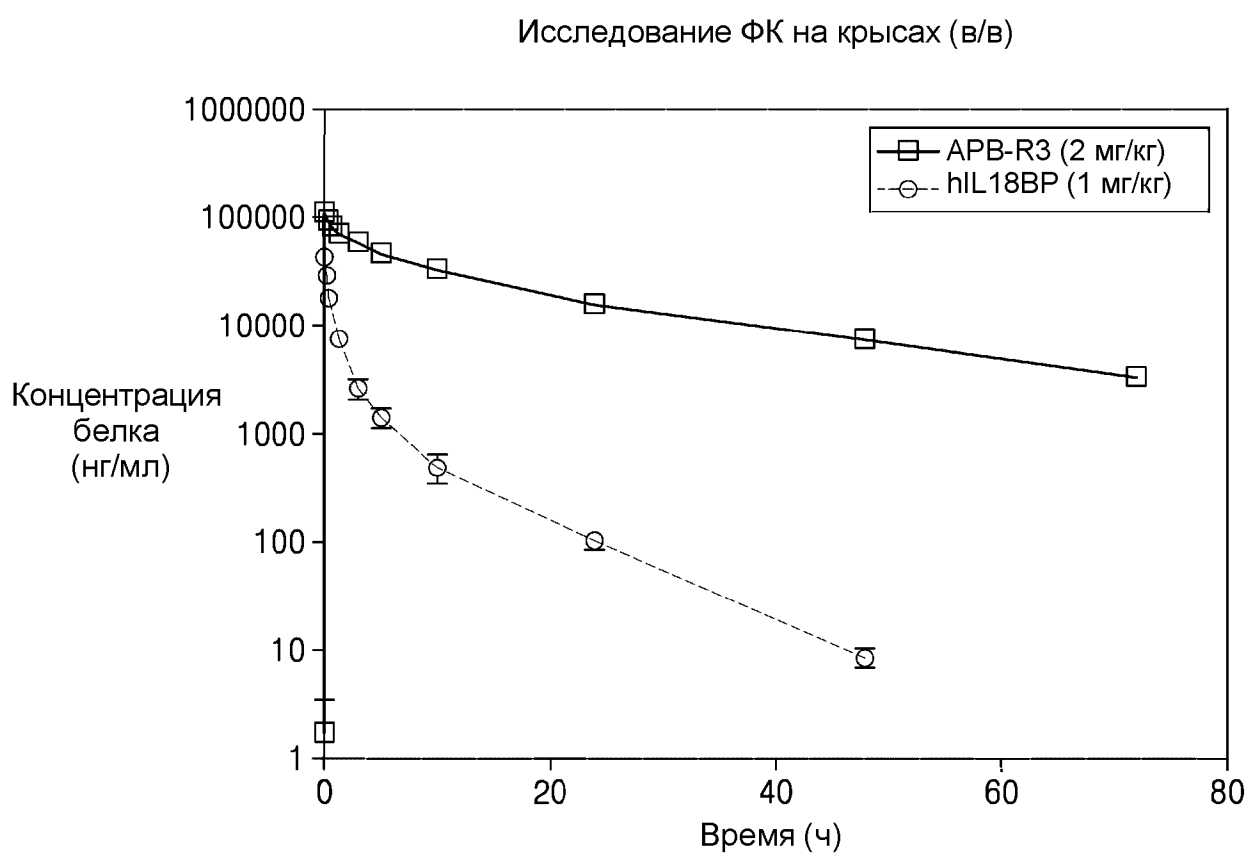
ФИГ. 7



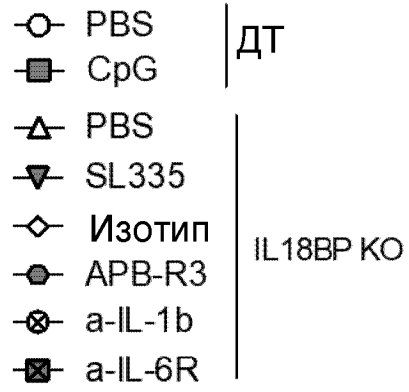
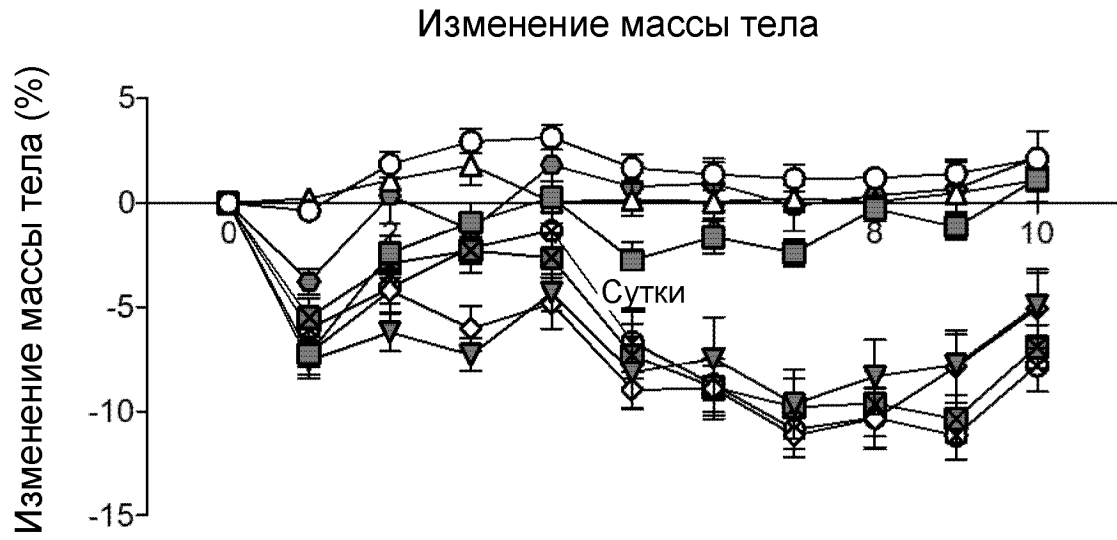
ФИГ. 8



ФИГ. 9

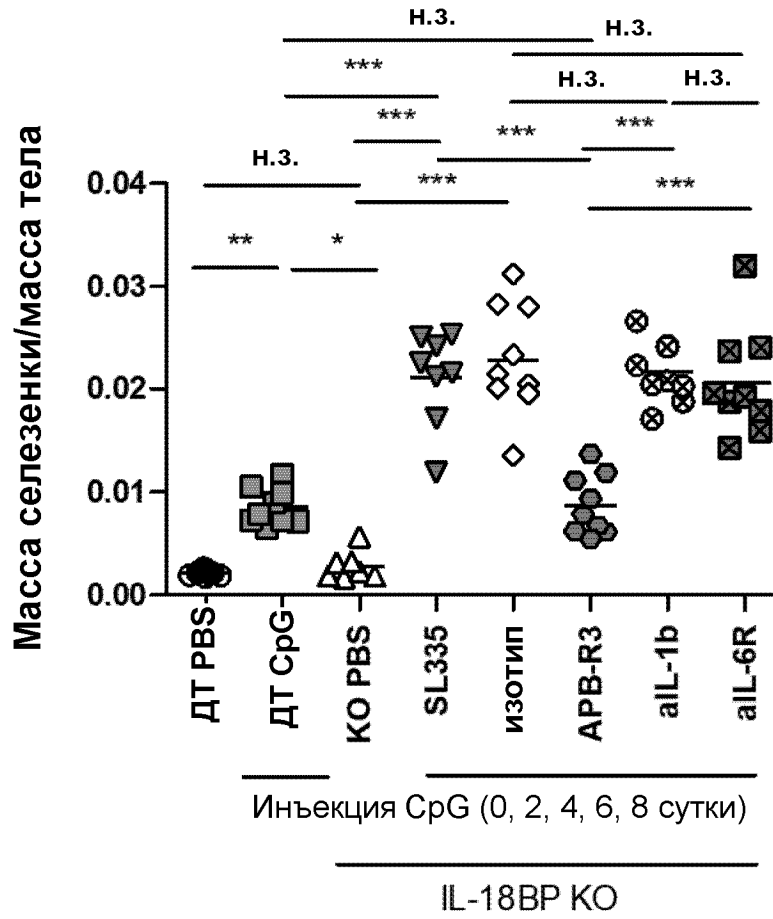


ФИГ. 10



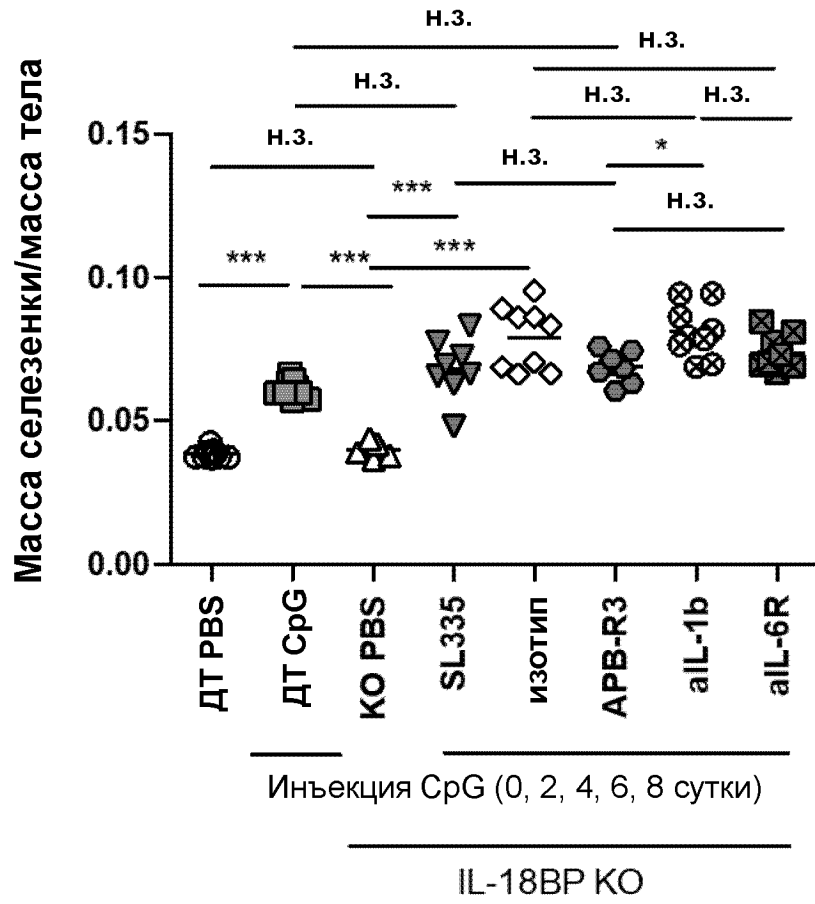
ФИГ. 11А

Масса селезенки/масса тела



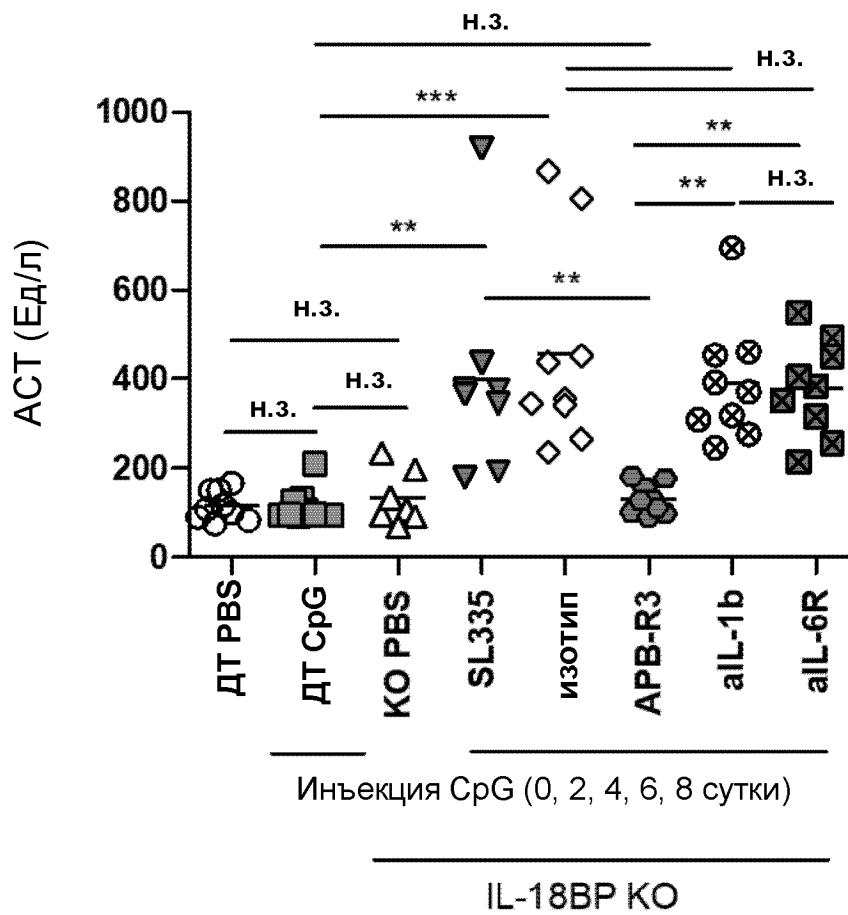
ФИГ. 11В

Масса селезенки/масса тела



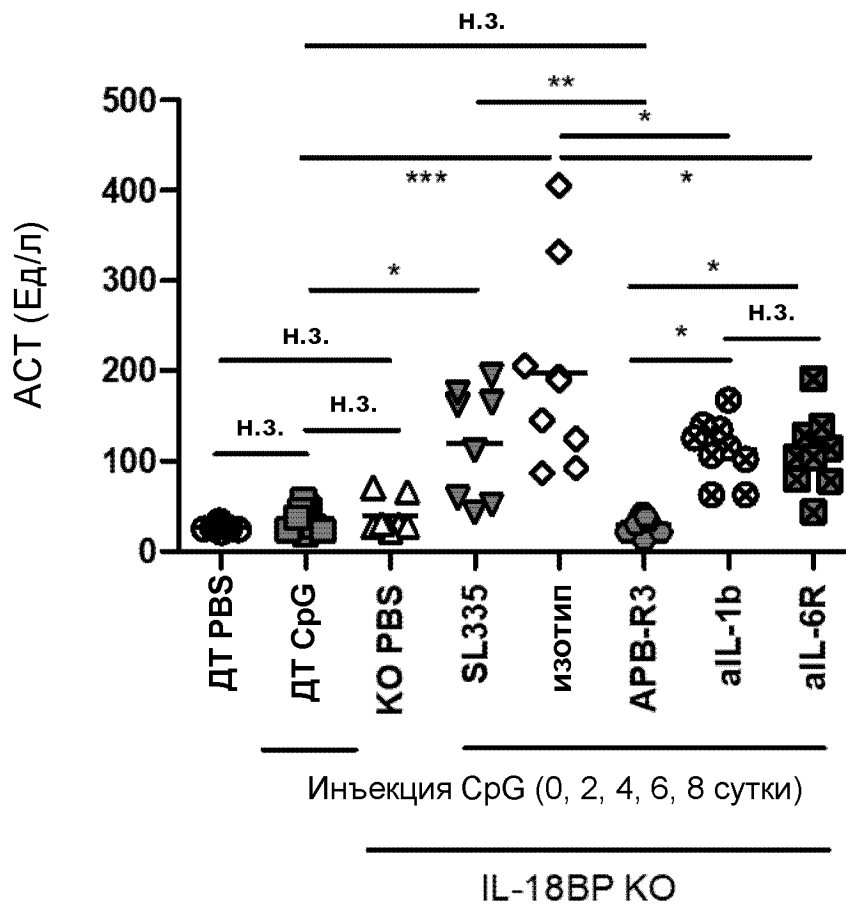
ФИГ. 12А

АСТ в сыворотке



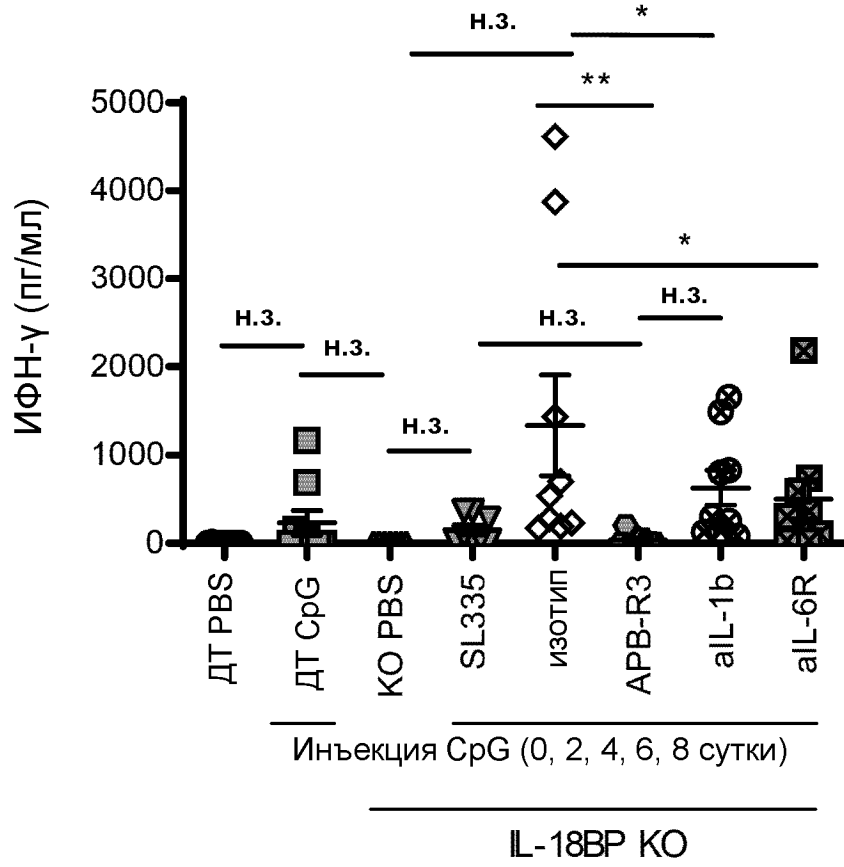
ФИГ. 12В

АСТ в сыворотке



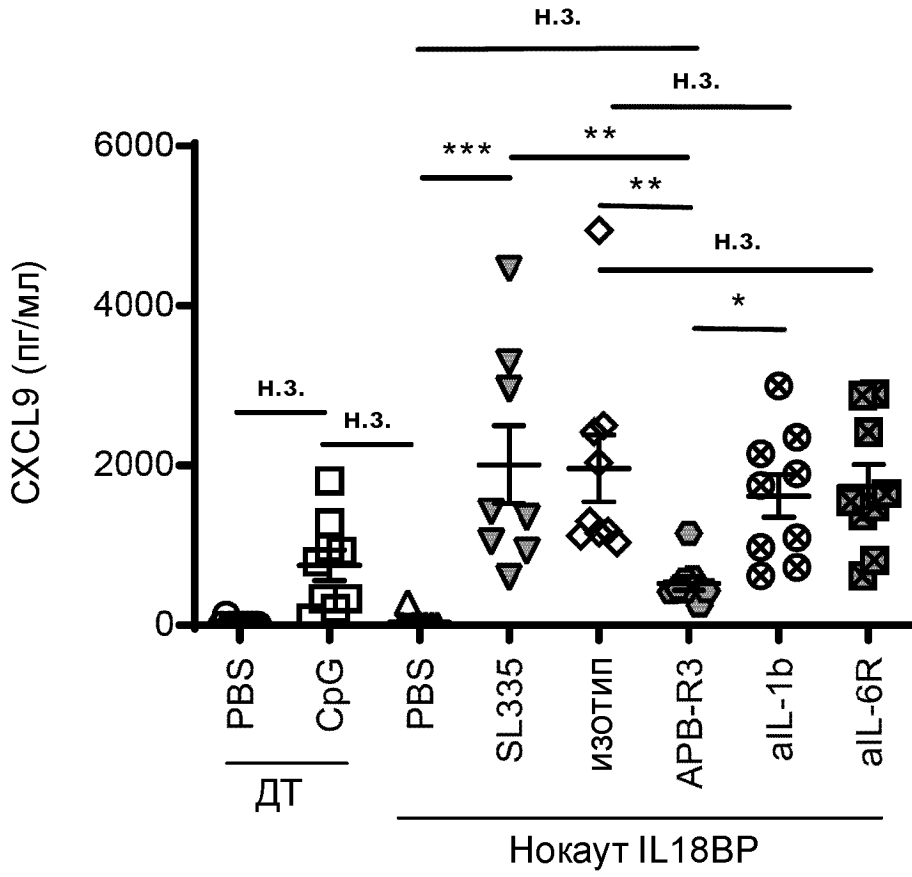
ФИГ. 13А

ИФН-γ в сыворотке



ФИГ. 13В

СХСL9 в сыворотке



ФИГ. 14

