

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202491739** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2024.09.13**

(51) Int. Cl. **C07K 16/24** (2006.01)  
**A61K 39/00** (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2023.01.06**

---

(54) **МАТЕРИАЛЫ И СПОСОБЫ, ОТНОСЯЩИЕСЯ К БЕЛКАМ, СВЯЗЫВАЮЩИМ IL-1 $\beta$**

---

(31) **63/297,436**

(32) **2022.01.07**

(33) **US**

(86) **PCT/IB2023/050106**

(87) **WO 2023/131901 2023.07.13**

(71) Заявитель:  
**ДЖОНСОН ЭНД ДЖОНСОН  
ЭНТЕРПРАЙЗ ИННОВЕЙШН ИНК.  
(US)**

(72) Изобретатель:

**Паскуаль Гэбриэл, Хинди Сагит,  
Сваминатхан Суреш Кумар (US),  
Эдвардс Мэттью Дж., Стивенсон  
Кристофер Скотт (GB)**

(74) Представитель:

**Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,  
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов  
А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,  
Кузнецова Т.В. (RU)**

---

(57) В настоящем документе в определенных аспектах предложены антитела, которые связываются с IL-1 $\beta$ , а также композиции, содержащие антитела. Также предложены способы получения и применения антител.

**A1**

**202491739**

**202491739**

**A1**

МАТЕРИАЛЫ И СПОСОБЫ, ОТНОСЯЩИЕСЯ К БЕЛКАМ, СВЯЗЫВАЮЩИМ ИЛ-1 $\beta$ 5 **ПЕРЕКРЕСТНЫЕ ССЫЛКИ НА СМЕЖНЫЕ ЗАЯВКИ**

[0001] Данная заявка испрашивает преимущество по предварительной заявке на патент США № 63/297,436, поданной 7 января 2022 г., описание которой полностью включено в настоящий документ путем ссылки.

**ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ**

10 [0002] Настоящая заявка содержит машиночитаемый перечень последовательностей, который был представлен в формате XML вместе с настоящей заявкой, полное содержание которого включено в настоящий документ путем ссылки во всей его полноте. XML-файл перечня последовательностей, представленный вместе с настоящей заявкой, называется «14620-563-228\_SEQ\_LISTING.xml»; он был создан 15 декабря 2022 г. и имеет размер 123 349 байт.

**1. ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

[0003] Настоящее описание относится к антителам к ИЛ-1 $\beta$ , нуклеиновым кислотам и экспрессионным векторам, кодирующим антитела, рекомбинантным клеткам, содержащим векторы, и композициям, содержащим антитела. Также предложены 20 способы получения антител и способы применения антител для лечения заболеваний, включая рак.

**2. ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

[0004] ИЛ-1 $\beta$  представляет собой плейотропный цитокин с многочисленными функциями как в физиологических, так и в патологических состояниях. При раке ИЛ-1 $\beta$  25 способствует поддерживающему опухоль микроокружению с помощью различных механизмов. Например, было высказано предположение, что ИЛ-1 $\beta$  способствует продукции мутагенных активных форм кислорода, которые могут привести к развитию опухоли (Taniguchi K *et al*, Nat Rev Immunol. 2018;18(5):309–324). Кроме того, путь ИЛ-1 способствует экспрессии фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и фактора роста 30 фибробластов (FGF), двух ключевых проангиогенных факторов, которые приводят к новообразованию капилляров, являющемуся признаком прогрессирования опухоли и необходимым для инвазивности и метастазирования опухоли (Voronov E *et al*, Proc Natl

Acad Sci U S A. 2003;100(5):2645–2650; Voronov E *et al*, Front Physiol. 2014;5:114). IL-1 $\beta$  также способствует эпителиально-мезенхимальному переходу (EMT) *in vitro*, что является критическим этапом в ранней фазе метастатического каскада (Li R *et al*, Sci Rep. 2020;10(1):377). В микроокружении опухоли (ТМЕ) IL-1 $\beta$  может рекрутировать и перепрограммировать множество типов клеток; например, было показано, что IL-1 $\beta$  способствует инфильтрации макрофагов и нейтрофилов, мобилизует иммуносупрессивные миелоидные популяции (например, MDSC, TAM и TAN) и ослабляет инфильтрацию и активацию противоопухолевых Т-клеток (Bunt SK *et al*, J Immunol. 2006;176(1):284–290).

10 **[0005]** Кроме того, клинические данные предоставляют доказательства важной роли пути IL-1 при раке (Ridker PM *et al*, Lancet. 2017;390(10105):1833–1842). Таким образом, в данной области существует потребность в высокоаффинных и эффективных молекулах антител к IL-1, способных нейтрализовать сигнальный путь IL-1  $\beta$  для лечения рака.

### 15 **3. ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

**[0006]** В одном аспекте в настоящем документе предложено антитело, которое связывает IL-1 $\beta$ , содержащее:

(1) (i) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую определяющую комплементарность область 1 (CDR1) VH, CDR2 VH и CDR3 VH, имеющие аминокислотную последовательность CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH соответственно из VH, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; и (ii) вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, имеющие аминокислотную последовательность CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL соответственно из VL, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8;

(2) (i) VH, содержащую CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, имеющие аминокислотную последовательность CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH соответственно из VH, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9; и (ii) VL, содержащую CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, имеющие аминокислотную последовательность CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL соответственно из VL, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10; или

(3) (i) VH, содержащую CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, имеющие аминокислотную последовательность CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH

соответственно из VH, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11; и (ii) VL, содержащую CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, имеющие аминокислотную последовательность CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL соответственно из VL, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12.

**[0007]** В некоторых вариантах осуществления (i) аминокислотные последовательности CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL соответствуют системе нумерации по Кабату; (ii) аминокислотные последовательности CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL соответствуют системе нумерации по Чотиа; (iii) аминокислотные последовательности CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL соответствуют системе нумерации по AbM; (iv) аминокислотные последовательности CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL соответствуют системе нумерации по Contact и/или (v) аминокислотные последовательности CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL соответствуют системе нумерации по IMGT.

**[0008]** В другом аспекте в настоящем документе предложено антитело, которое связывает IL-1 $\beta$ , содержащее:

- (1)
  - (i) VH, содержащую CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 67 и SEQ ID NO: 85; CDR2 VH, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 68 и SEQ ID NO: 86; CDR3 VH, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 69 и SEQ ID NO: 87; и
  - (ii) VL, содержащую CDR1 VL, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 70 и SEQ ID NO: 88; CDR2 VL, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 71 и SEQ ID NO: 89; CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 72 и SEQ ID NO: 90;
- (2) (i) VH, содержащую CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 37, SEQ

ID NO: 55, SEQ ID NO: 73 и SEQ ID NO: 91; CDR2 VH, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 74 и SEQ ID NO: 92; CDR3 VH, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 75 и SEQ ID NO: 93;

и  
(ii) VL, содержащую CDR1 VL, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 76 и SEQ ID NO: 94; CDR2 VL, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 77 и SEQ ID NO: 95; CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 78 и SEQ ID NO: 96; или

(3) (i) VH, содержащую CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 79 и SEQ ID NO: 97; CDR2 VH, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 80 и SEQ ID NO: 98; CDR3 VH, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 81 и SEQ ID NO: 99; и

(ii) VL, содержащую CDR1 VL, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 82 и SEQ ID NO: 100; CDR2 VL, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 83 и SEQ ID NO: 101; CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 84 и SEQ ID NO: 102.

**[0009]** В другом аспекте в настоящем документе предложено антитело, которое связывает IL-1 $\beta$ , содержащее:

(1) (i) VH, содержащую CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13; CDR2 VH, имеющую

- аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14; CDR3 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15; и
- 5 (ii) VL, содержащую CDR1 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16; CDR2 VL, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 17; CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18;
- (2) (i) VH, содержащую CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19; CDR2 VH, имеющую
- 10 аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; CDR3 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21; и
- (ii) VL, содержащую CDR1 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22; CDR2 VL, имеющую
- 15 аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 23; CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24;
- (3) (i) VH, содержащую CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25; CDR2 VH, имеющую
- 20 аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26; CDR3 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27; и
- (ii) VL, содержащую CDR1 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28; CDR2 VL, имеющую
- 25 аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 29; CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30;
- (4) (i) VH, содержащую CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31; CDR2 VH, имеющую
- 30 аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32; CDR3 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33; и
- (ii) VL, содержащую CDR1 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34; CDR2 VL, имеющую
- аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 35; CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36;

- 5 (5) (i) VH, содержащую CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37; CDR2 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38; CDR3 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39; и  
(ii) VL, содержащую CDR1 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40; CDR2 VL, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 41; CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42;
- 10 (6) (i) VH, содержащую CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43; CDR2 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44; CDR3 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45; и  
(ii) VL, содержащую CDR1 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46; CDR2 VL, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 47; CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48;
- 15 (7) (i) VH, содержащую CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49; CDR2 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50; CDR3 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51; и  
(ii) VL, содержащую CDR1 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52; CDR2 VL, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 53; CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54;
- 20 (8) (i) VH, содержащую CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55; CDR2 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56; CDR3 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57; и  
(ii) VL, содержащую CDR1 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58; CDR2 VL, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 59;
- 25  
30

CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60;

- 5 (9) (i) VH, содержащую CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61; CDR2 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62; CDR3 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63; и
- 10 (ii) VL, содержащую CDR1 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64; CDR2 VL, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 65; CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66;
- 15 (10) (i) VH, содержащую CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67; CDR2 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68; CDR3 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69; и
- 20 (ii) VL, содержащую CDR1 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70; CDR2 VL, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 71; CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 72;
- 25 (11) (i) VH, содержащую CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73; CDR2 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74; CDR3 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75; и
- 30 (ii) VL, содержащую CDR1 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76; CDR2 VL, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 77; CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 78;
- (12) (i) VH, содержащую CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79; CDR2 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80; CDR3 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81; и
- (ii) VL, содержащую CDR1 VL, имеющую аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 82; CDR2 VL, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 83; CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84;

- 5 (13) (i) VH, содержащую CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85; CDR2 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 86; CDR3 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 87; и
- 10 (ii) VL, содержащую CDR1 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88; CDR2 VL, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 89; CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90;
- 15 (14) (i) VH, содержащую CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91; CDR2 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92; CDR3 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93; и
- 20 (ii) VL, содержащую CDR1 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 94; CDR2 VL, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 95; CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 96; или
- 25 (15) (i) VH, содержащую CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 97; CDR2 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 98; CDR3 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99; и
- 30 (ii) VL, содержащую CDR1 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100; CDR2 VL, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 101; CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102.

**[0010]** В некоторых вариантах осуществления антитела, предложенное в настоящем документе, дополнительно содержит одну или более каркасных областей в

соответствии с SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и/или SEQ ID NO: 12.

- 5 [0011] В некоторых вариантах осуществления (i) антитело содержит VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8; (ii) антитело содержит VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10; или (iii) антитело содержит VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, и VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12.
- 10 [0012] В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, представляет собой гуманизированное антитело.
- [0013] В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, представляет собой антитело IgG. В некоторых вариантах осуществления антитело IgG представляет собой антитело IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.
- 15 [0014] В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, содержит легкую каппа-цепь.
- [0015] В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, содержит легкую ламбда-цепь.
- [0016] В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, содержит мутантную область Fc. В некоторых вариантах осуществления мутантная область Fc содержит мутации M252Y/S254T/T256E (YTE).
- 20 [0017] В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, представляет собой моноклональное антитело.
- [0018] В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, связывается с антигеном IL-1 $\beta$ .
- 25 [0019] В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, связывается с эпитопом IL-1 $\beta$ .
- [0020] В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, специфически связывается с IL-1 $\beta$ .
- 30 [0021] В некоторых вариантах осуществления CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL образуют сайт связывания для антигена IL-1 $\beta$ .
- [0022] В некоторых вариантах осуществления CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL образуют сайт связывания для эпитопа IL-1 $\beta$ .

- [0023]** В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, является мультиспецифическим. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, способно связывать по меньшей мере два антигена. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, способно связывать по меньшей мере три антигена. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, способно связывать по меньшей мере четыре антигена. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, способно связывать по меньшей мере пять антигенов.
- 5
- [0024]** В другом аспекте в настоящем документе предложена связывающая молекула, содержащая антитело, предложенное в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления антитело генетически слито или химически конъюгировано с агентом.
- 10
- [0025]** В другом аспекте в настоящем документе предложена нуклеиновая кислота, кодирующая антитело, предложенное в настоящем документе.
- 15
- [0026]** В другом аспекте в настоящем документе предложен вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, предложенную в настоящем документе.
- [0027]** В другом аспекте в настоящем документе представлена клетка-хозяин, содержащая вектор, предложенный в настоящем документе.
- 20
- [0028]** В другом аспекте в настоящем документе предложен набор, содержащий вектор, предложенный в настоящем документе, и упаковка для него.
- [0029]** В еще одном аспекте в настоящем документе предложен набор, содержащий антитело, предложенное в настоящем документе, и упаковку для него.
- [0030]** В еще одном аспекте в настоящем документе предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело, предложенное в настоящем документе, и один или более фармацевтически приемлемых эксципиентов.
- 25
- [0031]** В другом аспекте в настоящем документе предложен способ получения фармацевтической композиции, предложенной в настоящем документе, включающий объединение антитела с одним или более фармацевтически приемлемыми эксципиентами для получения фармацевтической композиции.
- 30
- [0032]** В другом аспекте в настоящем документе предложен способ ингибирования IL-1 $\beta$  или IL-1 $\beta$ -опосредованной сигнализации в клетке, включающий приведение клетки в контакт с антителом, предложенным в настоящем документе.

[0033] В другом аспекте в настоящем документе предложен способ ингибирования IL-1 $\beta$ -индуцированной продукции IL-6, ENA-78 (CXCL5) и/или G-CSF в клетке, включающий приведение клетки в контакт с антителом, предложенным в настоящем документе.

5 [0034] В другом аспекте в настоящем документе предложен способ снижения продукции IL-6, ENA-78 (CXCL5) и/или G-CSF в клетке, включающий приведение клетки в контакт с антителом, предложенным в настоящем документе.

[0035] В другом аспекте в настоящем документе предложен способ ингибирования роста или пролиферации экспрессирующих IL-1 $\beta$  клеток, включающий приведение  
10 клеток в контакт с антителом, предложенным в настоящем документе.

[0036] В некоторых вариантах осуществления клетка или клетки находятся в организме субъекта, имеющего заболевание или расстройство.

[0037] В другом аспекте в настоящем документе предложен способ ингибирования IL-1 $\beta$  у субъекта, включающий введение субъекту антитела, предложенного в  
15 настоящем документе.

[0038] В другом аспекте в настоящем документе предложен способ лечения заболевания или расстройства у субъекта, включающий введение субъекту антитела, предложенного в настоящем документе.

[0039] В некоторых вариантах осуществления заболевание или расстройство  
20 представляет собой IL-1 $\beta$ -ассоциированное заболевание или расстройство. В некоторых вариантах осуществления IL-1 $\beta$ -ассоциированное заболевание или расстройство представляет собой воспалительное заболевание или расстройство. В некоторых вариантах осуществления IL-1 $\beta$ -ассоциированное заболевание или расстройство представляет собой рак. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой  
25 рак легкого. В некоторых вариантах осуществления рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого. В некоторых вариантах осуществления немелкоклеточный рак легкого достиг стадии 0, стадии 1, стадии 2, стадии 3 или стадии 4. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак почки. В некоторых вариантах осуществления рак почки представляет собой почечноклеточный  
30 рак. В некоторых вариантах осуществления почечноклеточный рак достиг стадии 1, стадии 2 или стадии 3.

#### 4. КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0040] **ФИГ. 1.** Картирование эпитопов выбранных антител на IL-1 $\beta$  с использованием ЖХ-МС на основе водородно-дейтериевого обмена. Сверху:

показанная последовательность представляет собой фрагмент **SEQ ID NO: 109**, остатки 117–269, соответствующие последовательности зрелого белка IL-1 $\beta$  (SEQ ID NO: 110). Двойное подчеркивание указывает на сильный эпитоп ( $\Delta\Delta G$  при связывании  $\leq -2$  ккал/моль), а одинарное подчеркивание указывает на слабый эпитоп ( $-2 < \Delta\Delta G$  при связывании  $\leq -1$  ккал/моль). Внизу: эпитопы наложены на рентгеновскую кристаллическую структуру IL-1 $\beta$  (PDB ID 1I1B). Черный цвет указывает сильный эпитоп, а серый — слабый эпитоп.

5  
10 **[0041] ФИГ. 2.** Эффективность 05H21A, 08F17A и 15N14A (все с мутацией YTE в области Fc) в репортерной системе NF-kB/AP-1. Активность по нейтрализации панели лучших антител к IL-1 $\beta$  оценивали в репортерных клетках HEK-Blue. Показаны кривые доза-эффект и значения IC50 панели лучших мАт к IL-1 $\beta$ .

**[0042] ФИГ. 3.** Ингибирующую активность панели лучших антител к IL-1 $\beta$  оценивали на клетках фибробластов легких человека MRC5. На фигуре показаны кривые доза-эффект панели лучших мАт к IL-1 $\beta$  и соответствующие определения IC50.

15 **[0043] ФИГ. 4.** Эффективность 05H21A, 08F17A и 15N14A в фибробластах легких человека. Активность по нейтрализации панели лучших антител к IL-1 $\beta$  оценивали в нормальных фибробластах легких человека (доноры NHLF 34325 и 35234). На фигурах показаны кривые доза-эффект для донора 34325 на основе измерений высвобождения IL-6 (A) и CXCL5 (B) с соответствующими представленными определениями IC50.

20 **[0044] ФИГ. 5.** Эффективность 05H21A, 08F17A и 15N14A в образцах человеческих донорских мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC). Активность по нейтрализации панели лучших антител к IL-1 $\beta$  оценивали на PBMC одного здорового донора-человека (донор TS235). (A) и (B) Кривые доза-эффект, измеряющие высвобождение IL-6 на панели лучших антител, и рассчитанные значения IC50.

25 **[0045] ФИГ. 6.** Эффективность 05H21A, 08F17A и 15N14A по анализу человеческой крови. Активность по нейтрализации панели лучших антител к IL-1 $\beta$  оценивали на образцах цельной человеческой крови (протестированные доноры: CC00448, M3767, M5988, M7286 и M7370). На графике представлены значения IC50 в нМ на основе измерений высвобождения IL-6, CXCL-5 и G-CSF методом MSD.

30 **[0046] ФИГ. 7.** Эффективность 05H21A, 08F17A и 15N14A в образцах фибробластов яванского макака. Активность по нейтрализации панели лучших антител к IL-1 $\beta$  оценивали в первичных фибробластах кожи и легких яванского макака (CDF и CLF соответственно). (A) и (B) Кривые доза-эффект, измеряющие высвобождение IL-6

панели лучших антител на CDF и CLF соответственно. Показаны рассчитанные значения IC50 для панели антител к IL-1 $\beta$ .

## 5. ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0047] Настоящее описание частично основано на новых антителах, которые связываются с IL-1 $\beta$ , и их превосходных характеристиках.

### 5.1. Определения

[0048] Методики и процедуры, описанные или указанные в настоящем документе, включают в себя те, которые в общем хорошо известны и/или часто применяются в рамках традиционной методологии специалистами в данной области, такие как, например, широко используемые методологии, описанные в Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3d ed. 2001); *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel et al. eds., 2003); *Therapeutic Monoclonal Antibodies: From Bench to Clinic* (An ed. 2009); *Monoclonal Antibodies: Methods and Protocols* (Albitar ed. 2010); и *Antibody Engineering Vols 1 and 2* (Kontermann and Dübel eds., 2d ed. 2010). Если в настоящем документе не определено иное, технические и научные термины, применяемые в настоящем описании, имеют значения, обычно понятные специалистам в данной области. Для целей интерпретации настоящего описания изобретения будут применяться приведенные ниже определения терминов, и в соответствующих случаях термины, применяемые в единственном числе, будут также включать в себя множественное число, и наоборот. В случае если любое представленное определение термина вступает в противоречие с любым документом, который путем ссылки включается в настоящий документ, представленное ниже определение термина будет иметь приоритет.

[0049] Термин «антитело», «иммуноглобулин» или «Ig» применяется в настоящем документе на взаимозаменяемой основе и применяется в наиболее широком смысле и, в частности, охватывает, например, моноклональные антитела (включая антитела-агонисты, антитела-антагонисты, нейтрализующие антитела, полноразмерные или интактные моноклональные антитела), композиции антител с полиэпитопной или моноэпитопной специфичностью, поликлональные или моновалентные антитела, мультивалентные антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела, при условии демонстрации требуемой биологической активности), образованные из по меньшей мере двух интактных антител, одноцепочечные антитела и их фрагменты (например, доменные антитела), как описано ниже. Антитело может быть человеческим, гуманизированным, химерным и/или с

созревшей аффинностью, а также антителом других видов, например мыши, кролика, ламы и т. д. Предполагается, что термин «антитело» включает в себя полипептидный продукт В-клеток, относящийся к иммуноглобулиновому классу полипептидов, который способен связываться со специфическим молекулярным антигеном и состоит из двух

5 идентичных пар полипептидных цепей, причем каждая пара имеет одну тяжелую цепь (около 50–70 кДа) и одну легкую цепь (около 25 кДа), при этом каждая аминоконцевая часть каждой цепи включает в себя вариабельную область из от около 100 до около 130 аминокислот и каждая карбоксиконцевая часть включает в себя константную область.

См., например, Antibody Engineering (Borregaard ed., 2d ed. 1995) и Kuby, Immunology (3d ed. 1997). К антителам также, без ограничений, относятся синтетические антитела, получаемые рекомбинантным способом антитела, антитела, в том числе от животных семейства верблюдовых (например, ламы или альпаки), или их гуманизированные варианты, интратела, антиидиотипические (анти-Id) антитела и функциональные фрагменты (например, антигенсвязывающие фрагменты) любых из указанных антител,

10 которые относятся к части полипептида тяжелой или легкой цепи антитела и сохраняют некоторую или полную активность связывания антитела, от которого был получен фрагмент. К не имеющим ограничительного характера примерам функциональных фрагментов (например, антигенсвязывающих фрагментов) относятся одноцепочечные Fvs (scFv) (например, в том числе моноспецифические, биспецифические и т. д.),

20 фрагменты Fab, фрагменты F(ab'), фрагменты F(ab)<sub>2</sub>, фрагменты F(ab')<sub>2</sub>, связанные дисульфидными мостиками Fvs (dsFv), фрагменты Fd, фрагменты Fv, диатело, триатело, тетратело и минитело. В частности, к антителам, предусмотренным в настоящем документе, относятся молекулы иммуноглобулина и проявляющие иммунологическую активность участки молекул иммуноглобулина, например

25 антигенсвязывающие домены или молекулы, которые содержат антигенсвязывающий сайт, который связывается с антигеном (например, одна или более CDR антитела). Такие фрагменты антитела можно найти, например, в Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual (1989); Mol. Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference (Myers ed., 1995); Huston *et al.*, 1993, *Cell Biophysics* 22:189–224; Plückthun and Skerra, 1989, *Meth. Enzymol.* 178:497–515; и Day, Advanced Immunochemistry (2d ed. 1990). Антитела, представленные в настоящем документе, могут относиться к любому классу (например, IgG, IgE, IgM, IgD и IgA) или к любому подклассу (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) молекулы иммуноглобулина. Антитела могут

30

представлять собой агонистические антитела или антагонистические антитела.

Антитела могут быть ни агонистическими, ни антагонистическими.

**[0050]** «Антиген» представляет собой структуру, с которой может избирательно

5 связываться антитело. Целевым антигеном может быть полипептид, углеводов, нуклеиновая кислота, липид, гаптен или другое природное или синтетическое соединение. В некоторых вариантах осуществления целевой антиген представляет собой полипептид. В определенных вариантах осуществления антиген ассоциирован с клеткой, например находится на поверхности или внутри клетки.

**[0051]** «Интактное» антитело представляет собой антитело, содержащее

10 антигенсвязывающий сайт, а также СL и по меньшей мере константные области тяжелой цепи, СH1, СH2 и СH3. Константные области могут включать в себя человеческие константные области или варианты их аминокислотных последовательностей. В определенных вариантах осуществления интактное антитело обладает одной или более эффекторными функциями.

**[0052]** Термины «связывается» или «связывание» относятся к взаимодействию

15 между молекулами, например, с образованием комплекса. К взаимодействиям могут относиться, например, нековалентные взаимодействия, в том числе водородные связи, ионные связи, гидрофобные взаимодействия и/или ван-дер-ваальсовы взаимодействия. Комплекс может также включать в себя связывание двух или более молекул,

20 удерживаемых вместе ковалентными или нековалентными связями, взаимодействиями или силами. Прочность всех нековалентных взаимодействий между единичным антигенсвязывающим сайтом в антителе и единичным эпитопом целевой молекулы, такой как антиген, представляет собой аффинность антитела или функционального фрагмента к этому эпитопу. Отношение скорости диссоциации ( $k_{off}$ ) к скорости

25 ассоциации ( $k_{on}$ ) молекулы (например, антитела), связывающей моновалентный антиген ( $k_{off}/k_{on}$ ), представляет собой константу диссоциации  $K_D$ , которая обратно

пропорциональна аффинности. Чем меньше значение  $K_D$ , тем выше аффинность

антитела. Значение  $K_D$  меняется для различных комплексов антитела и антигена и

зависит от обеих констант  $k_{on}$  и  $k_{off}$ . Константу диссоциации  $K_D$  для антитела,

30 обеспеченного в настоящем документе, можно определять с помощью любого способа,

приведенного в настоящем документе, или любого другого способа, хорошо известного

специалистам в данной области. Аффинность в одном сайте связывания не всегда

отражает истинную прочность взаимодействия между антителом и антигеном. Когда

сложные антигены, содержащие множество повторяющихся антигенных детерминант,

например поливалентный антиген, входят в контакт с антителами, содержащими множество сайтов связывания, взаимодействие антитела с антигеном в одном сайте будет увеличивать вероятность взаимодействия на втором сайте. Прочность таких множественных взаимодействий между мультивалентным антителом и антигеном называется авидностью.

**[0053]** Применяемые в отношении связывающих молекул, описанных в настоящем документе, такие термины, как «связываются с», «которые специфически связываются с», и аналогичные им термины также применяются взаимозаменяемо в настоящем документе и относятся к связывающим молекулам антигенсвязывающих доменов, которые специфически связываются с антигеном, например полипептидом.

Связывающая молекула или антигенсвязывающий домен, которые связываются или специфически связываются с антигеном, могут быть идентифицированы, например, методами иммуноанализа, Octet<sup>®</sup>, Biacore<sup>®</sup> или другими методиками, известными специалистам в данной области. В некоторых вариантах осуществления в тех случаях, когда связывающая молекула или антигенсвязывающий домен связывается с или специфически связывается с антигеном, он связывается с антигеном с более высокой аффинностью по сравнению с любыми перекрестно-реагирующими антигенами, что может определяться с помощью экспериментальных методик, таких как радиоиммунный анализ (РИА) и твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA).

Как правило, специфическая или избирательная реакция будет по меньшей мере в два раза превышать фоновый сигнал или шум и может превышать фон более чем в 10 раз. См., например, Fundamental Immunology 332–36 (Paul ed., 2d ed. 1989), где приведено описание специфичности связывания. В определенных вариантах осуществления степень связывания связывающей молекулы или антигенсвязывающего домена с

«нецелевым» белком менее около 10% связывания связывающей молекулы или антигенсвязывающего домена с их определенным целевым антигеном, например, как это определяется с помощью анализа с применением сортировки клеток с активацией флуоресценции (FACS) или РИА. К связывающей молекуле или антигенсвязывающему домену, который связывается с антигеном, относятся те, которые выполнены с

возможностью связывания с антигеном с аффинностью, достаточной для использования связывающей молекулы, например, в качестве терапевтического и/или диагностического агента с целевым воздействием на антиген. В определенных вариантах осуществления константа диссоциации ( $K_D$ ) связывающей молекулы или антигенсвязывающего домена, который связывается с антигеном, составляет 1 мкМ, 800

нМ, 600 нМ, 550 нМ, 500 нМ, 300 нМ, 250 нМ, 100 нМ, 50 нМ, 10 нМ, 5 нМ, 4 нМ, 3 нМ, 2 нМ, 1 нМ, 0,9 нМ, 0,8 нМ, 0,7 нМ, 0,6 нМ, 0,5 нМ, 0,4 нМ, 0,3 нМ, 0,2 нМ или 0,1 нМ или менее. В определенных вариантах осуществления связывающая молекула или антигенсвязывающий домен связывается с эпитопом антигена, который является консервативным среди антигенов разных видов.

**[0054]** В определенных вариантах осуществления связывающие молекулы или антигенсвязывающие домены могут содержать «химерные» последовательности, в которых часть тяжелой и/или легкой цепи идентичен или гомологичен соответствующим последовательностям в антителах, полученных из конкретного вида или принадлежащих конкретному классу или подклассу антител, а оставшаяся часть цепи (-ей) идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, полученных из другого вида или принадлежащих другому классу или подклассу антител, а также фрагменты таких антител, если они обладают нужной биологической активностью (см. патент США № 4,816,567; и Morrison *et al.*, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851–55). Химерные последовательности могут включать в себя гуманизированные последовательности.

**[0055]** В определенных вариантах осуществления связывающие молекулы или антигенсвязывающие домены могут включать в себя части «гуманизированных» форм нечеловеческих (например, верблюжьих, мышинных, обезьяньих), которые включают в себя последовательности человеческих иммуноглобулинов (например, антитела реципиента) антител, в которых остатки нативной CDR заменены на остатки соответствующей CDR видов, не относящихся к человеку (например, донорское антитело), таких как верблюд, мышь, крыса, кролик или примат, не относящийся к человеку, с требуемыми специфичностью, аффинностью и способностью. В некоторых примерах один или более остатков FR области последовательностей человеческого иммуноглобулина заменяется соответствующими нечеловеческими остатками. Более того, гуманизированные антитела могут содержать остатки, которые отсутствуют в антителе реципиента или антителе донора. Эти модификации вносятся для еще большего улучшения показателей антитела. Тяжелая или легкая цепь гуманизированного антитела может содержать по существу все из по меньшей мере одного или более переменных доменов, в которых все или по существу все CDR соответствуют таковым в иммуноглобулине от не относящегося к человеку животного, а все или по существу все FR соответствуют таковым последовательности человеческого иммуноглобулина. В определенных вариантах осуществления гуманизированное

антитело будет содержать по меньшей мере часть константной области (Fc) иммуноглобулина, как правило, человеческого иммуноглобулина. Для получения дополнительной информации см. Jones *et al.*, Nature 321:522–25 (1986); Riechmann *et al.*, Nature 332:323–29 (1988); Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593–96 (1992); Carter *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285–89 (1992) патенты США №: 6,800,738; 6,719,971; 6,639,055; 6,407,213 и 6,054,297.

**[0056]** В определенных вариантах осуществления связывающие молекулы или антигенсвязывающие домены могут содержать участки «полностью человеческого антитела» или «человеческого антитела», причем термины в настоящем документе используются взаимозаменяемо и относятся к антителу, которое содержит применяются переменную область и, например, человеческую константную область. Связывающие молекулы могут содержать последовательность антитела. В конкретных вариантах осуществления термины относятся к антителу, которое содержит переменную область и константную область человеческого происхождения. Термин «полностью человеческие» антитела в определенных вариантах осуществления может также охватывать антитела, которые связывают полипептиды и кодируются нуклеотидными последовательностями, которые представляют собой соматические варианты нуклеотидных последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека природного происхождения. Термин «полностью человеческое антитело» включает в себя антитела с переменной и константной областями, соответствующим последовательностям иммуноглобулина зародышевой линии человека, как это описано Kabat *et al.* (см. Kabat *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91–3242). «Человеческое антитело» представляет собой антитело, аминокислотная последовательность которого соответствует последовательности антитела, продуцированного человеком и/или полученного с помощью любой из методик приготовления человеческих антител. Из данного определения человеческого антитела, в частности, исключено гуманизированное антитело, содержащее нечеловеческие антигенсвязывающие остатки. Человеческие антитела могут быть получены с помощью различных методик, известных в данной области, включая библиотеки фагового дисплея (Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol. 227:381 (1991); Marks *et al.*, J. Mol. Biol. 222:581 (1991)) и библиотеки дрожжевого дисплея (Chao *et al.*, Nature Protocols 1: 755–68 (2006)). Кроме того, для получения человеческих моноклональных антител можно использовать способы, описанные в Cole *et al.*, Monoclonal Antibodies and Cancer

Therapy 77 (1985); Boerner *et al.*, J. Immunol. 147(1):86–95 (1991); а также van Dijk and van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol. 5: 368–74 (2001). Человеческие антитела можно получать посредством введения антигена трансгенному животному, которое было модифицировано для продукции таких антител в ответ на антигенную стимуляцию, но эндогенные локусы которого были деактивированы, например, мышам (см., например, Jakobovits, Curr. Opin. Biotechnol. 6(5):561–66 (1995); Brüggemann and Taussing, Curr. Opin. Biotechnol. 8(4):455–58 (1997); и патенты США № 6,075,181 и 6,150,584 в отношении технологии XENOMOUSE™). См. также, например, Li, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557–62 (2006), для информации о человеческих антителах, созданных с использованием технологии человеческой В-клеточной гибридомы.

[0057] В определенных вариантах осуществления связывающие молекулы или антигенсвязывающие домены могут содержать участки «рекомбинантного человеческого антитела», причем фраза относится к человеческим антителам, которые получены, экспрессированы, созданы или выделены рекомбинантными методами, таким как антитела, экспрессированные с применением рекомбинантного вектора экспрессии, трансфицированного в клетку-хозяин, антитела, выделенные из рекомбинантной комбинаторной библиотеки человеческого антитела, антитела, выделенные из организма животного (например, мыши или коровы), которое является трансгенным и/или трансхромосомным для генов человеческого иммуноглобулина (см., например, Taylor, L. D. *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 20:6287–6295 (1992)), или антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любыми другими средствами, которые предусматривают сплайсинг последовательностей гена человеческого иммуноглобулина с другими последовательностями ДНК. Такие рекомбинантные человеческие антитела могут включать в себя переменную и константную области, полученные из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека (см. Kabat *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91–3242). Вместе с тем в определенных вариантах осуществления такие рекомбинантные человеческие антитела подвергаются мутагенезу *in vitro* (либо при использовании животных, трансгенных по человеческому иммуноглобулину, соматическому мутагенезу *in vivo*), и таким образом аминокислотные последовательности областей VH и VL рекомбинантных антител оказываются последовательностями, которые, хотя и получены из последовательностей VH и VL

областей зародышевых линий человека и связаны с ними, могут отсутствовать в *in vivo* наборе последовательностей зародышевых линий человека природного происхождения.

**[0058]** В определенных вариантах осуществления связывающие молекулы или антигенсвязывающие домены могут содержать часть «моноклонального антитела»,

5 причём используемый в настоящем документе термин относится к антителу,

полученному из популяции по существу гомогенных антител, например,

индивидуальные антитела, образующие популяцию, идентичны, за исключением

возможных мутаций природного происхождения, которые могут присутствовать в

небольших количествах, или хорошо известных посттрансляционных модификаций,

10 таких как изомеризация или дезамидирование аминокислот, окисление метионина или

дезамидирование аспарагина или глутамина, при этом каждое моноклональное

антитело будет обычно распознавать один эпитоп на антигене. В конкретных вариантах

осуществления используемый в настоящем документе термин «моноклональное

антитело» относится к антителу, продуцируемому одной гибридомой или другой

15 клеткой. Термин «моноклональное» не носит ограничительного характера в отношении

любого конкретного способа получения антитела. Например, моноклональные

антитела, используемые в настоящем описании, могут быть получены посредством

использования гибридомной методологии, впервые описанной Kohler *et al.*, Nature

256:495 (1975), или могут создаваться посредством использования способов

20 рекомбинантной ДНК в бактериальных или эукариотических клетках животных или

растений (см., например, патент США № 4,816,567). «Моноклональные антитела»

можно выделить из фаговых библиотек антител с помощью методик, описанных,

например, в публикации Clackson *et al.*, Nature 352:624–28 (1991) и Marks *et al.*, J. Mol.

Biol. 222:581–97 (1991). Специалистам в данной области хорошо известны другие

25 способы получения клональных клеточных линий и экспрессируемых ими

моноклональных антител. См., например, Short Protocols in Molecular Biology (Ausubel

*et al.* eds., 5th ed. 2002).

**[0059]** Обычная единица 4-цепочечного антитела представляет собой

гетеротетрамерный гликопротеин, состоящий из двух идентичных легких (L) цепей и

30 двух идентичных тяжелых (H) цепей. В случае IgG масса 4-цепочечной единицы по

существу составляет около 150 000 дальтон. Каждая L-цепь соединена с H-цепью

посредством одной ковалентной дисульфидной связи, а две H-цепи соединены друг с

другом посредством одной или более дисульфидных связей в зависимости от изоформа

H-цепи. H- и L-цепи также имеют расположенные на одинаковом расстоянии

межцепочечные дисульфидные мостики. Каждая H-цепь имеет N-конец, переменный домен (VH) с последующими тремя константными доменами (CH) в каждой из  $\alpha$ - и  $\gamma$ -цепей и четырьмя доменами CH в изотипах  $\mu$  и  $\epsilon$ . Каждая L-цепь имеет N-конец, переменный домен (VL) с последующим константным доменом (CL) на другом конце.

5 VL совмещен с VH, а CL совмещен с первым константным доменом тяжелой цепи (CH1). Считается, что конкретные аминокислотные остатки образуют границу раздела между переменными доменами легкой цепи и тяжелой цепи. Объединение в пару VH и VL образует один антигенсвязывающий сайт. Для информации о структуре и свойствах разных классов антител см., например, Basic and Clinical Immunology 71 (Stites *et al.* eds., 8th ed. 1994); и Immunobiology (Janeway *et al.* eds., 5<sup>th</sup> ed. 2001).

10 **[0060]** Термин «Fab» или «область Fab» относится к области антитела, которая связывается с антигенами. Традиционный IgG, как правило, содержит две области Fab, причем каждая из них находится в одном из двух плеч Y-образной структуры IgG. Каждая область Fab обычно образована одной переменной областью и одной  
15 константной областью каждой из тяжелой и легкой цепей. Более конкретно, переменная область и константная область тяжелой цепи в области Fab представляют собой области VH и CH1, а переменная область и константная область легкой цепи области Fab представляют собой области VL и CL. VH, CH1, VL и CL в области Fab могут быть организованы различным образом, чтобы обеспечивать способность  
20 связывать антиген в соответствии с настоящим описанием. Например, области VH и CH1 могут располагаться в одном полипептиде, а области VL и CL могут находиться в другом полипептиде, подобно области Fab в традиционном IgG. Альтернативно области VH, CH1, VL и CL могут находиться в одном и том же полипептиде и ориентированы в различном порядке, как это более подробно описано в разделах ниже.

25 **[0061]** Термин «переменная область», «переменный домен», «область V» или «домен V» относится к части легкой или тяжелой цепей антитела, которая обычно находится в аминоконцевом участке легкой или тяжелой цепи с длиной от около 120 до 130 аминокислот в тяжелой цепи и от около 100 до 110 аминокислот в легкой цепи, и применяется для обеспечения связывания и специфичности каждого конкретного  
30 антитела по отношению к его конкретному антигену. Переменная область тяжелой цепи может обозначаться как «VH». Переменная область легкой цепи может обозначаться как «VL». Термин «переменный» фактически означает, что последовательности определенных сегментов переменных областей значительно различаются между антителами. Область V опосредует связывание с антигеном и

определяет специфичность конкретного антитела к конкретному антигену. Вместе с тем  
вариабельность распределяется неравномерно по всему 110-аминокислотному участку  
вариабельной области. Напротив, области V состоят из менее вариабельных (например,  
5 сравнительно инвариантных) участков, называемых каркасными областями (FR) из  
около 15–30 аминокислот, разделенных более короткими областями с более высокой  
вариабельностью (например, чрезвычайно высокой вариабельностью), называемыми  
«гипервариабельными областями», каждая из которых имеет длину около 9–12  
аминокислот. Вариабельные области тяжелых и легких цепей в каждом случае содержат  
четыре FR, по большей части принимающих конфигурацию  $\beta$ -листа, соединенных  
10 тремя гипервариабельными областями, которые образуют петли, соединяющие и в  
некоторых случаях образуют часть структуры  $\beta$ -листа. Гипервариабельные области  
каждой цепи удерживаются вместе в непосредственной близости при помощи FR и  
вместе с гипервариабельными областями другой цепи способствуют образованию  
антигенсвязывающего сайта антител (см., например, Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of  
15 Immunological Interest (5th ed. 1991)). Константные области не участвуют напрямую в  
связывании антитела с антигеном, но проявляют различные эффекторные функции,  
такие как участие антитела в антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) и  
комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC). Вариабельные области различных  
антител существенно отличаются друг от друга. В конкретных вариантах  
20 осуществления вариабельная область представляет собой человеческую вариабельную  
область.

**[0062]** Термин «нумерация остатков вариабельной области по Кабату» или  
«нумерация положений аминокислот по Кабату» и его варианты относятся к системе  
нумерации, используемой для вариабельных областей тяжелой цепи или вариабельных  
25 областей легкой цепи компиляции антител, описанных в Kabat *et al.*, выше. При  
применении данной системы нумерации фактическая линейная аминокислотная  
последовательность может содержать меньше или больше дополнительных  
аминокислот, что соответствует укорочению или вставке в FR или CDR вариабельного  
домена. Например, вариабельная область тяжелой цепи может включать в себя одну  
30 аминокислотную вставку (остаток 52a по Кабату) после остатка 52 и три вставленных  
остатка (например, остатки 82a, 82b и 82c и т. д. по Кабату) после остатка 82.  
Нумерация остатков по Кабату может быть определена для данного антитела путем  
совмещения в гомологичных областях последовательности антитела с  
последовательностью, имеющей «стандартный» номер по Кабату. Систему нумерации

по Кабату по существу используют при указании остатка в вариабельном домене (приблизительно остатки 1–107 легкой цепи и остатки 1–113 тяжелой цепи) (например, Kabat *et al.* выше). «Система нумерации ЕС» или «индекс ЕС» по существу используют при указании остатка в константной области тяжелой цепи иммуноглобулина

5 (например, индекс ЕС, указанный в Kabat *et al.* выше). «Индекс ЕС по Кабату» означает нумерацию остатков человеческого антитела IgG 1 ЕС. Описаны и другие системы нумерации, например AbM, по Чотиа, Contact, IMGT и АНоп.

**[0063]** Термин «тяжелая цепь» при применении в отношении антитела означает полипептидную цепь около 50–70 кДа, в которой аминоконцевая часть включает в себя  
10 вариабельную область около от 120 до 130 или более аминокислот, а карбоксиконцевая часть включает в себя константную область. Константная область может быть отнесена к одному из пяти четко различающихся типов (например, изотипов), обозначаемых как альфа ( $\alpha$ ), дельта ( $\delta$ ), эpsilon ( $\epsilon$ ), гамма ( $\gamma$ ) и мю ( $\mu$ ), на основе аминокислотной последовательности константной области тяжелой цепи. Различные тяжелые цепи  
15 отличаются размерами:  $\alpha$ ,  $\delta$  и  $\gamma$  содержат приблизительно 450 аминокислот, тогда как  $\mu$  и  $\epsilon$  содержат приблизительно 550 аминокислот. При объединении с легкой цепью эти различающиеся типы тяжелых цепей приводят к формированию пяти хорошо известных классов (например, изотипов) антител — IgA, IgD, IgE, IgG и IgM соответственно, включая четыре подкласса IgG, а именно IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.

20 **[0064]** Термин «легкая цепь» при применении в отношении антитела означает полипептидную цепь около 25 кДа, в которой аминоконцевая часть включает в себя вариабельную область около от 100 до около 110 или более аминокислот, а карбоксиконцевая часть включает в себя константную область. Приблизительная длина легкой цепи составляет от 211 до 217 аминокислот. Выделяют два различных типа,  
25 называемых каппа ( $\kappa$ ) или лямбда ( $\lambda$ ) в зависимости от аминокислотной последовательности константных доменов.

**[0065]** В настоящем документе термины «гипервариабельная область», «HVR», «определяющая комплементарность область» и «CDR» применяются взаимозаменяемо. Термин «CDR» относится к одной из трех гипервариабельных областей (H1, H2 или H3)  
30 в пределах некаркасной области  $\beta$ -складчатого каркаса VH иммуноглобулина (Ig или антитела) или одной из трех гипервариабельных областей (L1, L2 или L3) в пределах некаркасной области  $\beta$ -складчатого каркаса VL антитела. CDR1, CDR2 и CDR3 в домене VH также называются HCDR1, HCDR2 и HCDR3 соответственно. CDR1, CDR2 и CDR3 в домене VL также называются LCDR1, LCDR2 и LCDR3 соответственно.

Соответственно, CDR представляют собой последовательности вариабельной области, перемежающиеся с последовательностями каркасной области.

**[0066]** Области CDR хорошо известны специалистам в данной области, и их определяют с помощью хорошо известных систем нумерации. Например,

5 определяющие комплементарность области (CDR) по Кабату выделяются на основании вариабельности последовательности и используются наиболее широко (см., например, Kabat *et al.* выше; Nick Deschacht *et al.*, *J Immunol* 2010; 184:5696–5704). В отличие от указанного выше, Чотиа в своей системе нумерации ссылается на расположение структурных петель (см., например, Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901–17 (1987)).

10 Конец петли CDR-H1 по Чотиа при нумерации с применением системы нумерации по Кабату варьируется между H32 и H34 в зависимости от длины петли (это связано с тем, что в схеме нумерации по Кабату в позициях H35A и H35B размещены вставки; если ни одна из позиций 35A или 35B не присутствует, петля заканчивается на позиции 32; если присутствует только 35A, петля заканчивается на позиции 33; если присутствуют как

15 35A, так и 35B, петля заканчивается на позиции 34). Гипервариабельные области по AbM представляют собой компромисс между CDR по Кабату и структурными петлями по Чотиа и используются в программном обеспечении Oxford Molecular для моделирования антител по AbM (см., например, Antibody Engineering Vol. 2 (Kontermann and Dübel eds., 2d ed. 2010)). «Контактные» гипервариабельные области

20 основаны на анализе доступных комплексных кристаллических структур. Другой разработанной и широко применяемой универсальной системой нумерации является ImMunoGeneTics (IMGT) Information System<sup>®</sup> (Lafranc *et al.*, *Dev. Comp. Immunol.* 27(1):55–77 (2003)). IMGT представляет собой интегрированную информационную систему, специализирующуюся на иммуноглобулинах (IG), Т-клеточных рецепторах

25 (TCR) и главном комплексе гистосовместимости (МНС) человека и других позвоночных. В настоящем документе CDR обозначают как по аминокислотной последовательности, так и по местоположению в легкой или тяжелой цепи. Поскольку «местоположение» CDR в структуре вариабельного домена иммуноглобулина сохраняется среди видов и присутствует в структурах, называемых петлями, применяя

30 системы нумерации, в которых последовательности вариабельного домена совмещаются в соответствии со структурными особенностями, можно легко идентифицировать остатки CDR и каркасной области. Эту информацию можно применять для прививания и замены остатков CDR из иммуноглобулинов одного вида в акцепторную каркасную область, как правило, из человеческого антитела.

Дополнительная система нумерации (АНон) была разработана Honegger and Plückthun, J. Mol. Biol. 309: 657–70 (2001). Соответствие между системами нумерации, включая, например, нумерацию по Кабату и уникальную систему нумерации IMGT, хорошо известно специалисту в данной области (см., например, Kabat выше; Chothia and Lesk, выше; Martin, выше; Lefranc *et al.*, выше). Примеры остатков каждой из этих гипервариабельных областей или CDR приведены ниже в таблице 1.

**Таблица 1. Примеры CDR по различным системам нумерации**

Петля	По Кабату	По AbM	По Чотиа	По Contact	По IMGT
CDR L1	L24--L34	L24--L34	L26--L32 или L24-- L34	L30--L36	L27--L38
CDR L2	L50--L56	L50--L56	L50--L52 или L50-- L56	L46--L55	L56--L65
CDR L3	L89--L97	L89--L97	L91--L96 или L89-- L97	L89--L96	L105--L117
CDR H1	H31--H35B (Нумерация по Кабату)	H26--H35B	H26-- H32..34	H30--H35B	H27--H38
CDR H1	H31--H35 (Нумерация по Чотиа)	H26--H35	H26--H32	H30--H35	
CDR H2	H50--H65	H50--H58	H53--H55 или H52-- H56	H47--H58	H56--H65
CDR H3	H95--H102	H95--H102	H96--H101 или H95-- H102	H93--H101	H105-H117

[0067] Границы конкретной CDR могут меняться в зависимости от схемы, применяемой для идентификации. Таким образом, если не указано иное, термины «CDR» и «определяющая комплементарность область» конкретного антитела или его области, такой как переменная область, а также отдельные CDR (например, CDR-H1, CDR-H2) антитела или его области, следует понимать как охватывающие определяющую комплементарность область в соответствии с определением по любой из известных схем, описанных выше в настоящем документе. В некоторых случаях указывается схема идентификации конкретной CDR или нескольких CDR, например CDR в соответствии с определением по IMGT, Кабату, Чотиа или Contact. В других случаях приводится конкретная аминокислотная последовательность CDR. Следует отметить, что области CDR также могут определяться комбинацией различных систем

нумерации, например комбинацией систем нумерации по Кабату и Чотиа или комбинацией систем нумерации по Кабату и IMGT. Следовательно, такой термин, как «CDR1, представленная в конкретном VH», включает в себя любую CDR1 в соответствии с примерами систем нумерации CDR, описанными выше, но без ограничений. После указания варибельной области (например, VH или VL) специалистам в данной области будет понятно, что CDR в пределах области могут определяться разными системами нумерации или их комбинациями.

**[0068]** Гиперварибельные области могут содержать следующие «расширенные гиперварибельные области»: 24–36 или 24–34 (L1), 46–56 или 50–56 (L2) и 89–97 или 89–96 (L3) в VL и 26–35 или 26–35A (H1), 50–65 или 49–65 (H2) и 93–102, 94–102 или 95–102 (H3) в VH.

**[0069]** Термин «константная область» или «константный домен» относится к карбоксиконцевой части легкой и тяжелой цепи, которая непосредственно не участвует в связывании антитела с антигеном, но демонстрирует различные эффекторные функции, такие как взаимодействие с Fc-рецептором. Термин относится к части молекулы иммуноглобулина, имеющей более консервативную аминокислотную последовательность по сравнению с другой частью иммуноглобулина, то есть варибельной областью, которая содержит антигенсвязывающий сайт. Константная область может содержать области CH1, CH2 и CH3 тяжелой цепи и область CL легкой цепи.

**[0070]** Термин «каркасная область» или «FR» относится к тем остаткам варибельной области, фланкирующим CDR. Остатки FR присутствуют, например, в химерных, гуманизированных, человеческих, доменных антителах, диателах, линейных антителах и биспецифических антителах. Остатки FR представляют собой остатки варибельного домена, отличные от остатков гиперварибельной области или остатков CDR.

**[0071]** Термин «область Fc» в настоящем документе используется для определения участка C-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина, включая, например, области Fc с нативной последовательностью, рекомбинантные области Fc и варианты области Fc. Хотя границы области Fc тяжелой цепи иммуноглобулина могут варьироваться, часто считается, что человеческая область Fc тяжелой цепи IgG простирается от аминокислотного остатка в положении Cys226 или от Pro230 до C-конца. C-концевой лизин (остаток 447 согласно системе нумерации EC) области Fc может быть удален, например, во время продукции или очистки антитела или

посредством рекомбинантного создания нуклеиновой кислоты, кодирующей тяжелую цепь антитела. Соответственно, композиция интактных антител может содержать популяции антител с удаленными у всех антител остатками К447, популяции антител с сохраненными остатками К447 и популяции антител, содержащие антитела как с удаленным, так и с сохраненным остатком К447. «Функциональная область Fc» обладает «эффекторной функцией» области Fc с нативной последовательностью. К примерам «эффекторной функции» относится связывание C1q; CDC; связывание с Fc-рецептором; ADCC; фагоцитоз; снижение экспрессии рецепторов клеточной поверхности (например, рецептор В-клеток) и т. д. Осуществление таких эффекторных функций по существу требует комбинирования области Fc со связывающей областью или связывающим доменом (например, вариабельной областью или доменом антитела), и их можно оценивать с применением различных анализов, известных специалистам в данной области. «Вариантная область Fc» содержит аминокислотную последовательность, которая отличается от последовательности в составе области Fc с нативной последовательностью за счет по меньшей мере одной аминокислотной модификации (например, замещения, добавления или делеции). В определенных вариантах осуществления вариантная область Fc содержит по меньшей мере одну замену аминокислот по сравнению с областью Fc с нативной последовательностью или с областью Fc исходного полипептида, например от около одной до около десяти аминокислотных замен, или от около одной до около пяти замен аминокислот в области Fc с нативной последовательностью или в области Fc исходного полипептида. Упомянутая в настоящем документе вариантная область Fc может обладать по меньшей мере около 80% гомологией с областью Fc с нативной последовательностью и/или с областью Fc нативного полипептида, или по меньшей мере около 90% гомологией с ними, например по меньшей мере около 95% гомологией с ними.

**[0072]** В настоящем документе термин «эпитоп» является принятым в данной области определением и относится к локализованной области антигена, с которой может специфически связываться связывающаяся молекула (например, антитело). Эпитоп может представлять собой линейный эпитоп или конформационный, нелинейный или прерывистый эпитоп. В случае полипептидного антигена эпитоп, например, может представлять собой смежные аминокислоты полипептида («линейный эпитоп»), или же эпитоп может содержать аминокислоты из двух или более несвязных областей полипептида («конформационный», «нелинейный» или «прерывистый» эпитоп). Следует понимать, что, специалистам в данной области будет очевидно, что в

общем случае линейный эпитоп может быть зависимым или независимым от вторичной, третичной или четвертичной структуры. Например, в некоторых вариантах осуществления связывающая молекула связывается с группой аминокислот независимо от того, уложены ли они в природную трехмерную белковую структуру. В других вариантах осуществления для связывающей молекулы необходимо, чтобы аминокислотные остатки, образующие эпитоп, демонстрировали определенную конформацию (например, изгиб, скручивание, поворот или складку), чтобы обеспечить распознавание и связывание эпитопа.

**[0073]** Термины «процент (%) идентичности аминокислотной последовательности» и «гомология» по отношению к последовательности пептида, полипептида или антитела определяются как процентная доля аминокислотных остатков в потенциальной последовательности, идентичных аминокислотным остаткам в специфической последовательности пептида или полипептида, после выравнивания последовательностей и введения гэпов, при необходимости, для достижения максимального процента идентичности последовательности и без учета при определении идентичности последовательности каких-либо консервативных замен. Выравнивание для определения процента идентичности аминокислотной последовательности может быть достигнуто различными способами, известными в данной области, например, с помощью общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как программа BLAST, BLAST-2, ALIGN или MEGALIGN™ (DNASTAR). Специалисты в данной области могут определить соответствующие параметры для измерения выравнивания, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей.

**[0074]** Термин «специфичность» означает селективное распознавание антигенсвязывающим белком конкретного эпитопа антигена. Природные антитела, например, являются моноспецифическими. Термин «мультиспецифический» в настоящем документе означает, что антигенсвязывающий белок имеет два или более антигенсвязывающих сайта, из которых по меньшей мере два связывают разные антигены. Термин «биспецифический» в настоящем документе означает, что антигенсвязывающий белок имеет две различные антигенсвязывающие специфичности. Термин «моноспецифическое» антитело в настоящем документе означает антигенсвязывающий белок, который имеет один или более сайтов связывания, каждый из которых связывает один и тот же антиген.

**[0075]** Термин «валентный» в настоящем документе означает наличие установленного числа сайтов связывания в антигенсвязывающем белке. Естественное антитело, например, или полноразмерное антитело имеет два связывающих сайта и является двухвалентным. Таким образом, термины «трехвалентный»,

5 «четыревалентный», «пятивалентный» и «шестивалентный» означает наличие двух сайтов связывания, трех сайтов связывания, четырех сайтов связывания, пяти сайтов связывания и шести сайтов связывания соответственно в молекуле антигенсвязывающего белка.

**[0076]** Термины «полипептид», «пептид» и «белок» в настоящем документе используются взаимозаменяемо и относятся к полимерам из аминокислот любой

10 длины. Полимер может быть линейным или разветвленным, он может содержать модифицированные аминокислоты и может прерываться кислотами, не относящимися к аминокислотам. Термины также охватывают аминокислотный полимер, который был модифицирован естественным образом или посредством вмешательства; например,

15 образование дисульфидной связи, гликозилирование, липидизация, ацетилирование, фосфорилирование или любая другая манипуляция или модификация. Определение также включает в себя, например, полипептиды, содержащие один или более аналогов аминокислот, включая, без ограничений, не встречающиеся в природе аминокислоты, а также другие модификации, известные в данной области. Следует понимать, что

20 поскольку полипептиды настоящего описания могут формироваться на основе антител или других представителей суперсемейства иммуноглобулинов, в определенных вариантах осуществления в качестве «полипептида» может выступать единичная цепь или две или более ассоциированных цепи.

**[0077]** Термины «полинуклеотид» или «нуклеиновая кислота», которые применяют

25 в настоящем документе как взаимозаменяемые, относятся к полимерам нуклеотидов любой длины и включают в себя ДНК и РНК. Нуклеотиды могут представлять собой дезоксирибонуклеотиды, рибонуклеотиды, модифицированные нуклеотиды или основания и/или их аналоги, или любой субстрат, который может быть введен в полимер посредством ДНК- или РНК-полимеразы или путем реакции синтеза.

30 Полинуклеотид может содержать модифицированные нуклеотиды, такие как метилированные нуклеотиды и их аналоги. В настоящем документе термин «олигонуклеотид» относится к коротким по существу одноцепочечным синтетическим полинуклеотидам, которые по существу, но необязательно, имеют длину менее около 200 нуклеотидов. Термины «олигонуклеотид» и «полинуклеотид» не являются

взаимоисключающими. Приведенное выше описание для полинуклеотидов в равной и полной степени применимо к олигонуклеотидам. Клетка, которая продуцирует связывающую молекулу настоящего описания, может представлять собой исходную гибридную клетку, а также бактериальные или эукариотические клетки-хозяева, в которые ввели нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела. Если не указано иное, левый конец любой одноцепочечной полинуклеотидной последовательности, описанной в настоящем документе, является 5'-концом; левое направление двухцепочечных полинуклеотидных последовательностей называется 5'-направлением. Направление добавления от 5' к 3' формирующихся транскриптов РНК называется направлением транскрипции; области последовательности на цепочке ДНК с той же последовательностью, что и транскрипт РНК, которые представляют собой транскрипт РНК от 5' к 5' концу, называются «последовательностями против хода транскрипции»; области последовательности на цепочке ДНК с той же последовательностью, что и транскрипт РНК, которые представляют собой транскрипт РНК от 3' к 3' концу, называются «последовательностями по ходу транскрипции».

**[0078]** «Выделенной нуклеиновой кислотой» называется нуклеиновая кислота, например РНК, ДНК или смешанные нуклеиновые кислоты, которая по существу отделена от других геномных последовательностей ДНК, а также белков или комплексов, таких как рибосомы и полимеразы, которые в природе сопутствуют нативной последовательности. «Выделенная» молекула нуклеиновой кислоты представляет собой отделенную от других молекул нуклеиновых кислот, присутствующих в природном источнике молекулы нуклеиновой кислоты. Кроме того, «выделенная» молекула нуклеиновой кислоты, в частности молекула кДНК, может в значительной мере быть свободна от другого клеточного материала или культуральной среды, когда она получена при использовании рекомбинантной методики, либо по существу не содержать химических предшественников или других химических веществ, когда она синтезирована химическим путем. В конкретном варианте осуществления выделяется или очищается одна или более молекул нуклеиновой кислоты, кодирующая антитело в соответствии с описанием в настоящем документе.

Термин охватывает последовательности нуклеиновых кислот, которые были извлечены из своей природной среды, а также включает в себя изоляты рекомбинантной или клонированной ДНК и химически синтезированные аналоги или аналоги, биологически синтезированные гетерологическими системами. По существу чистая молекула может включать в себя изолированные формы молекулы. В частности, «выделенная» молекула

нуклеиновой кислоты, которая кодирует антитело, описанное в настоящем документе, представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, которая была идентифицирована и отделена от по меньшей мере одной молекулы нуклеиновой кислоты-примеси, с которой она обычно ассоциируется в контексте среды, в которой ее получают.

5 **[0079]** Если не указано иное, «нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность», включает в себя все нуклеотидные последовательности, которые являются вырожденными версиями друг друга и которые кодируют одну и ту же аминокислотную последовательность. Фраза «нуклеотидная последовательность, которая кодирует белок или РНК» может также учитывать  
10 интроны в той мере, в которой нуклеотидная последовательность, кодирующая белок, может в некоторой версии содержать интрон (-ы).

**[0080]** Термин «управляющие последовательности» обозначает последовательности ДНК, необходимые для экспрессии функционально связанной кодирующей последовательности в конкретном организме-хозяине. Управляющие  
15 последовательности, которые приемлемы для прокариотов, например, включают в себя промотор, необязательно последовательность оператора и сайт связывания с рибосомой. Известно, что эукариотические клетки используют промоторы, сигналы полиаденилирования и энхансеры.

**[0081]** В настоящем документе термин «функционально связанный» и аналогичные  
20 фразы (например, генетически слитый) при применении в отношении нуклеиновых кислот или аминокислот относится к функциональной связи нуклеотидных последовательностей или аминокислотных последовательностей соответственно, находящихся в функциональном взаимодействии друг с другом. Например, функционально связанные промотор, энхансерные элементы, открытая рамка считывания, 5' и 3' UTR и последовательности терминатора обеспечивают  
25 безошибочную продукцию молекулы нуклеиновой кислоты (например, РНК). В некоторых вариантах осуществления функционально связанные элементы нуклеиновых кислот приводят к транскрипции открытой рамки считывания и, в конечном счете, к продукции полипептида (т. е. к экспрессии открытой рамки считывания). В другом  
30 примере функционально связанным полипептидом является тот, в котором функциональные домены разнесены на надлежащее расстояние друг от друга, чтобы обеспечить реализацию искомой функции для каждого домена.

**[0082]** Термин «вектор» относится к веществу, которое применяется для переноса или включения нуклеотидной последовательности, включая, например, нуклеотидную

последовательность, кодирующую связывающую молекулу (например, антитело), как описано в настоящем документе, для введения нуклеотидной последовательности в клетку-хозяина. К векторам, которые могут быть применены, относятся, например, векторы экспрессии, плазмиды, фаговые векторы, вирусные векторы, эписомы и

5 искусственные хромосомы, которые могут включать в себя селективные последовательности или маркеры, выполненные с возможностью стабильной интеграции в хромосому клетки-хозяина. Кроме того, векторы могут включать в себя один или более селективных маркерных генов и подходящие последовательности

10 управления экспрессией. Например, селективных маркерных генов, которые могут быть использованы в данном случае, например, обеспечивают устойчивость к антибиотикам или токсинам, дополняют ауксотропный дефицит или обеспечивают критически важные питательные вещества, отсутствующие в питательной среде.

Последовательности управления экспрессией могут включать в себя конститутивные и индуцируемые промоторы, энхансеры транскрипции, терминаторы транскрипции и т.

15 п., которые хорошо известны специалистам в области. В случае коэкспрессии двух или более нуклеиновых кислот (например, тяжелой и легкой цепи антитела или VH и VL антитела) обе молекулы нуклеиновых кислот могут быть вставлены, например, в один вектор экспрессии или в отдельные векторы экспрессии. В случае одного вектора экспрессии кодирующие нуклеиновые кислоты могут быть функционально связаны с

20 одной общей последовательностью управления экспрессией или связаны с различными последовательностями управления экспрессией, например одним индуцируемым промотором и одним конститутивным промотором. Введение молекул нуклеиновой кислоты в клетку-хозяина может быть подтверждено с применением способов, хорошо известных в данной области. К таким способам, например, относятся анализ

25 нуклеиновой кислоты, такой как нозерн-блоттинг или амплификация мРНК в полимеразной цепной реакции (ПЦР), иммуноблоттинг для экспрессии генетических продуктов или другие приемлемые аналитические способы тестирования экспрессии введенной нуклеотидной последовательности или ее соответствующего генетического

30 продукта. Специалистам в данной области будет очевидно, что молекулы нуклеиновых кислот экспрессируются в достаточных количествах для получения искомого продукта, и специалистам в области также будет очевидно, что уровни экспрессии могут быть оптимизированы для достижения достаточной экспрессии с применением способов, хорошо известных в данной области.

**[0083]** В настоящем документе термин «организм-хозяин» относится к животному, такому как млекопитающее (например, человек).

**[0084]** В настоящем документе термин «клетка-хозяин» относится к определенной клетке субъекта, которая может быть трансфицирована молекулой нуклеиновой кислоты, и к потомкам или к потенциальным потомкам такой клетки. Потомки такой клетки могут не быть идентичными исходной клетке, трансфицированной молекулой нуклеиновой кислоты, по причине мутаций или воздействия окружающей среды, которые могут проявляться в последующих поколениях, или интеграции молекулы нуклеиновой кислоты в геном клетки-хозяина.

**[0085]** В настоящем документе термины «трансфицированный», «трансформированный» или «трансдуцированный» относятся к способу, посредством которого экзогенная нуклеиновая кислота переносится или вводится в клетку-хозяина. «Трансфицированная», «трансформированная» или «трансдуцированная» клетка представляет собой клетку, которая была трансфицирована, трансформирована или трансдуцирована экзогенной нуклеиновой кислотой. Клетка включает в себя первичную клетку субъекта и ее потомство.

**[0086]** В настоящем документе термин «фармацевтически приемлемый» означает одобренный регулирующим органом федерального правительства или правительства штата или приведенный в Фармакопее США, Европейской фармакопее или других общепризнанных фармакопеех для применения на животных, и в частности на человеке.

**[0087]** «Экспципиент» означает фармацевтически приемлемый материал, композицию или несущую среду, такие как жидкий или твердый наполнитель, разбавитель, растворитель или инкапсулирующий материал. К экспципиентам, например, относятся инкапсулирующие материалы или добавки, такие как ускорители всасывания, антиоксиданты, связующие вещества, буферы, носители, покрывающие агенты, красители, разбавители, вещества для улучшения распадаемости таблеток, эмульгаторы, вещества для повышения объема, наполнители, ароматизаторы, увлажнители, смазывающие вещества, отдушки, консерванты, пропелленты, антиадгезивы, стерилизующие агенты, подсластители, солюбилизаторы, смачивающие агенты и их смеси. Термин «экспципиент» может также относиться к разбавителю, адьюванту (например, адьюванту Фрейнда (полному или неполному) или к несущей среде.

**[0088]** В некоторых вариантах осуществления эксципиенты являются фармацевтически приемлемыми эксципиентами. Примеры фармацевтически приемлемых эксципиентов включают в себя буферные растворы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты; низкомолекулярный (например, 5 содержащий менее около 10 аминокислотных остатков) полипептид; белки; гидрофильные полимеры; аминокислоты; моносахариды, дисахариды и другие углеводы; хелатообразующие агенты; сахарные спирты; солеобразующие противоионы и/или неионные поверхностно-активные вещества. Не имеющие ограничительного характера примеры фармацевтически приемлемых эксципиентов описаны в Remington and Gennaro, Remington's Pharmaceutical Sciences (18th ed. 1990). 10

**[0089]** В одном варианте осуществления каждый компонент является «фармацевтически приемлемым» в смысле совместимости с другими ингредиентами фармацевтического состава и приемлемости для применения в контакте с тканью или органом людей или животных без чрезмерной токсичности, раздражения, 15 аллергической реакции, иммуногенности или других проблем или осложнений, в соответствии с приемлемым соотношением польза/риск. См., например, Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, 2005; Handbook of Pharmaceutical Excipients, 6th ed.; Rowe et al., Eds.; The Pharmaceutical Press and the American Pharmaceutical Association: 2009; Handbook of Pharmaceutical Additives, 3rd ed.; Ash and Ash Eds.; Gower 20 Publishing Company: 2007; Pharmaceutical Preformulation and Formulation, 2nd ed.; Gibson Ed.; CRC Press LLC: Boca Raton, FL, 2009. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемые эксципиенты не токсичны для клетки или организма млекопитающего, на которые они оказывают воздействие, в используемых дозировках и концентрациях. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемый эксципиент представляет собой водный раствор с забуференным pH. 25

**[0090]** В некоторых вариантах осуществления эксципиенты представляют собой стерильные жидкости, такие как вода и масла, в том числе нефтяного, животного, растительного или синтетического происхождения. Вода является примером эксципиента при введении композиции (например, фармацевтической композиции) 30 внутривенно. Физиологические растворы, водный раствор декстрозы и растворы глицерина также можно использовать в качестве жидких эксципиентов, в частности в растворах для инъекций. Если требуется, композиция может также содержать небольшие количества смачивающих веществ, или эмульгаторов, или буферных

веществ для поддержания рН. Композиции могут иметь форму растворов, суспензий, эмульсий, таблеток, пилюль, капсул, порошков и т. п.

5 **[0091]** Композиции, включая фармацевтические композиции, могут содержать связывающую молекулу (например, антитело, как описано в настоящем документе), например в выделенной или очищенной форме, вместе с приемлемым количеством эксципиентов.

10 **[0092]** В настоящем документе термин «эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество» относится к количеству антитела или терапевтической молекулы, содержащей агент и антитело, или фармацевтической композиции, предложенной в настоящем документе, которой достаточно для достижения требуемого результата.

15 **[0093]** Термины «субъект» и «пациент» могут применяться взаимозаменяемо. В настоящем документе в определенных вариантах осуществления слово «субъект» означает млекопитающее, такое как относящееся или не относящееся к приматам (например, человеку). В конкретных вариантах осуществления субъектом является человек. В одном варианте осуществления субъект представляет собой млекопитающее, например человека, у которого диагностировано заболевание или расстройство. В другом варианте осуществления субъектом является млекопитающее, например человек, подверженный риску развития заболевания или расстройства.

20 **[0094]** «Вводить» или «введение» относится к процедуре инъекции или физической доставки иным образом вещества в том виде, в котором оно находится вне организма, в организм пациента, например посредством мукозальной, внутрикожной, внутривенной, внутримышечной доставки, и/или любым другим способом физической доставки, описанным в настоящем документе или известным в данной области.

25 **[0095]** В настоящем документе термины «лечить», «лечение» и «проведение лечения» означают снижение или облегчение прогрессирования, тяжести и/или продолжительности заболевания или состояния в результате введения одного или более лекарственного средства. Результат проведения лечения можно определять посредством оценки того, было ли достигнуто снижение, ослабление и/или смягчение одного или  
30 более симптомов, связанных с основным заболеванием, так что у пациента отмечается улучшение, несмотря на то что пациент может по-прежнему страдать от основного заболевания. Термин «проведение лечения» включает в себя как сдерживание, так и облегчение заболевания. Термин «сдерживать», «сдерживание» и «обеспечение

сдерживания» относится к положительным эффектам, которые субъект получает по результатам терапии, которая необязательно приводит к излечению заболевания.

**[0096]** Термины «предотвращать», «предотвращающий» и «профилактика» относятся к снижению вероятности возникновения (или рецидива) заболевания, расстройства, состояния или ассоциированного (-ых) симптома (-ов) (например, 5 диабета или рака).

**[0097]** Термины «прерывать», «прерывающий» и «прерывание» относятся к проведению терапии на ранней стадии процесса заболевания (например, на стадии 10 предсимптоматического и/или предракового заболевания) для предотвращения, ингибирования или задержки прогрессирования заболевания (например, для предотвращения, ингибирования или задержки прогрессирования заболевания до поздней стадии рака, такого как злокачественный рак).

**[0098]** В настоящем документе «задержка» развития рака означает отсрочку, 15 препятствие, замедление, торможение, стабилизацию и/или откладывание развития заболевания. Эта задержка может иметь различную продолжительность, которая зависит от анамнеза заболевания и/или субъекта, получающего лечение. Как очевидно специалисту в данной области, достаточная или значительная задержка фактически может охватывать профилактику в том случае, если у субъекта не развивается 20 заболевание. Способ, который «задерживает» развитие ракового заболевания, представляет собой способ, который снижает вероятность развития заболевания в данный период времени и/или уменьшает степень заболевания в данный период времени по сравнению с ситуацией без использования способа. Такие сравнения, как правило, основаны на клинических исследованиях с использованием статистически 25 достоверного числа субъектов. Развитие рака можно обнаруживать с использованием стандартных способов, включая, без ограничений, компьютерную аксиальную томографию (CAT Scan), магнитную резонансную визуализацию (МР-визуализация), ультразвуковое исследование органов брюшной полости, анализы на свертывание крови, ангиографию или биопсию. Развитие может также относиться к прогрессированию рака, которое может первоначально не обнаруживаться, и включает 30 в себя возникновение, рецидив и проявление.

**[0099]** Термин «IL-1 $\beta$ -ассоциированное заболевание или расстройство» в настоящем документе относится к заболеванию или расстройству, которое включает в себя клетку или ткань, в КОТОРОЙ IL-1  $\beta$  экспрессируется или сверхэкспрессируется. В некоторых вариантах осуществления IL-1 $\beta$ -АССОЦИИРОВАННОЕ заболевание или расстройство

включает в себя клетку, в которой аномально экспрессируется IL-1 $\beta$ . В других вариантах осуществления IL-1 $\beta$ -АССОЦИИРОВАННОЕ заболевание или расстройство включает в себя клетку, у которой или в которой имеется дефицит IL-1 $\beta$  по меньшей мере по одному из его активностей.

5 [00100] Термины «около» и «приблизительно» означают в пределах 20%, в пределах 15%, в пределах 10%, в пределах 9%, в пределах 8%, в пределах 7%, в пределах 6%, в пределах 5%, в пределах 4%, в пределах 3%, в пределах 2%, в пределах 1% или менее от заданного значения или диапазона.

10 [00101] Используемые в настоящем описании и пунктах формулы изобретения формы единственного числа включают в себя обозначения множественного числа, если иное четко не следует из контекста.

15 [00102] Следует понимать, что везде, где варианты осуществления в настоящем документе описаны с применением термина «содержащий», также предусмотрены иные аналогичные варианты осуществления, описанные с применением терминов «состоящий из» и/или «состоящий по существу из». Следует также понимать, что везде, где варианты осуществления в настоящем документе описаны с применением выражения «состоящий по существу из», также предусмотрены иные аналогичные варианты осуществления, описанные с применением терминов «состоящий из».

20 [00103] Термин «в пределах» при его применении в выражении как «в пределах от А до В» или «в пределах А–В» относится к диапазону, включающему в себя А и В.

25 [00104] Термин «и/или» при использовании в выражении как «А и/или В» в настоящем документе предполагает включение и А, и В; А или В; А (отдельно); и В (отдельно). Аналогичным образом термин «и/или» при использовании в выражении как «А, В и/или С» предназначен для включения каждого из следующих вариантов осуществления: А, В и С; А, В или С; А или С; А или В; В или С; А и С; А и В; В и С; А (отдельно); В (отдельно); и С (отдельно).

## 5.2 Связывающие IL-1 $\beta$ молекулы

### 5.2.1. Антитела, которые связываются с IL-1 $\beta$

30 [00105] В одном аспекте в настоящем документе предложены антитела, способные связываться с IL-1 $\beta$ . IL-1 $\beta$  представляет собой плейотропный цитокин с многочисленными функциями как в физиологических, так и в патологических состояниях. При раке IL-1 $\beta$  способствует поддерживающему опухоль микроокружению с помощью различных механизмов. Кроме того, путь IL-1 способствует экспрессии фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и фактора роста фибробластов (FGF), двух

ключевых проангиогенных факторов, которые приводят к новообразованию капилляров, являющемуся признаком прогрессирования опухоли и необходимым для инвазивности и метастазирования опухоли IL-1 $\beta$  также способствует эпителиально-мезенхимальному переходу (EMT) *in vitro*, что является критическим этапом в ранней фазе метастатического каскада IL-1 $\beta$  может рекрутировать и перепрограммировать множество типов клеток; например, было показано, что IL-1 $\beta$  способствует инфильтрации макрофагов и нейтрофилов, мобилизует иммуносупрессивные миелоидные популяции (например, MDSC), усиливает инфильтрацию нейтрофилов и ослабляет инфильтрацию и активацию Т-клеток. Нуклеиновая кислота и аминокислотные последовательности IL-1 $\beta$  известны (см. GCID: GC02M112829, в HGNC как 5992, NCBI Entrez Gene: 3553, Ensembl: ENSG00000125538, OMIM®: 147720 и UniProtKB/Swiss-Prot: P01584). В некоторых вариантах осуществления антитела, предложенные в настоящем документе, связываются с человеческим IL-1 $\beta$ . В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложено антитело к IL-1 $\beta$ , которое модулирует одну или более активностей IL-1 $\beta$ . В некоторых вариантах осуществления антитело к IL-1 $\beta$ , предложенное в настоящем документе, представляет собой антагонистическое антитело.

**[00106]** В одном варианте осуществления антитела согласно описанию представляют собой антагонисты IL-1 $\beta$ . В другом варианте осуществления антитело или функциональный фрагмент, содержащий антигенсвязывающий участок, связывает целевой белок IL-1 $\beta$  и снижает связывание IL-1 $\beta$  с интерлейкиновым рецептором типа 1 (IL-1RI) до базального уровня. В одном аспекте данного варианта осуществления антитело или функциональный фрагмент уменьшает количество IL-1 $\beta$ , которое связывается с IL-1RI. В дополнительном аспекте данного варианта осуществления антитело или функциональный фрагмент полностью предотвращает связывание IL-1 $\beta$  с IL-1RI. В дополнительном варианте осуществления антитело или функциональный фрагмент ингибирует активацию сигнализации IL-1. Ингибирование антителом одного или более из этих функциональных свойств IL-1 $\beta$  (например, биохимическую, иммунохимическую, клеточную, физиологическую или другие биологические активности или т. п.), как определено в соответствии со методиками, известными в данной области и описанными в настоящем документе, следует понимать как относящееся к статистически значимому снижению конкретной активности по сравнению с состоянием, наблюдаемым в отсутствие антитела (или, например, когда присутствует контрольное антитело нерелевантной специфичности). В некоторых

вариантах осуществления антитело, которое ингибирует активность IL-1 $\beta$ , осуществляет такое статистически значимое снижение по меньшей мере на 10% от измеренного параметра, по меньшей мере на 50%, 80% или 90%, а в некоторых вариантах осуществления антитело описания может ингибировать более чем 95%, 98% или 99% функциональной активности IL-1 $\beta$ .

5 [00107] В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложено антитело к IL-1 $\beta$ , которое связывается с IL-1 $\beta$  (например, человеческий IL-1 $\beta$ ) с константой диссоциации (KD)  $\leq 1$  мкМ,  $\leq 200$  нМ,  $\leq 100$  нМ,  $\leq 50$  нМ,  $\leq 20$  нМ,  $\leq 10$  нМ,  $\leq 1$  нМ,  $\leq 0,1$  нМ,  $\leq 0,05$  нМ,  $\leq 0,02$  нМ,  $\leq 0,01$  нМ,  $\leq 0,001$  нМ (например, 20 пМ, 10 22 пМ, 64 пМ, 70 пМ, 180 пМ или 1,7 нМ, например  $10^{-8}$  М или менее, например от  $10^{-8}$  М до  $10^{-13}$  М, например от  $10^{-9}$  М до  $10^{-13}$  М, например от  $10^{-10}$  М до  $10^{-13}$  М). В данной области известны различные способы измерения аффинности связывания, любой из которых может использоваться для целей настоящего описания, в том числе способ РИА, например, с использованием Fab-версии антитела, представляющего интерес, и его антигена (Chen et al., 1999, J. Mol Biol 293:865–81); интерферометрия биослоя (BLI) 15 или поверхностный плазмонный резонанс (SPR) методом Octet® с применением, например, системы Octet®Red96, или методом Biacore® с применением, например, Biacore®TM-2000 или Biacore®TM-3000. «Скорость связывания», или «скорость ассоциации», или «константу ассоциации», или  $k_{on}$  можно также определять с 20 помощью тех же методик интерферометрии биослоев (BLI) или поверхностного плазмонного резонанса (SPR), описанных выше, например с применением Octet®Red96, Biacore®TM-2000 или системы Biacore®TM-3000.

[00108] В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложены антитела к IL-1 $\beta$ , которые описаны в разделе 7 ниже. Таким образом, в некоторых 25 вариантах осуществления предложено антитело, которое содержит одну или более последовательностей CDR любой из SEQ ID NO: 13–102. Последовательности CDR могут определяться в соответствии с хорошо известными системами нумерации. В некоторых вариантах осуществления нумерация CDR приводится по IMGT. В некоторых вариантах осуществления нумерация CDR приводится по Кабату. В 30 некоторых вариантах осуществления нумерация CDR приводится по AbM. В некоторых вариантах осуществления нумерация CDR приводится по Чотиа. В некоторых вариантах осуществления нумерация CDR приводится по Contact. В некоторых вариантах осуществления антитело к IL-1 $\beta$  является гуманизированным. В некоторых

вариантах осуществления антитело к  $\text{IL-1}\beta$  содержит акцепторный каркас человека, например каркас иммуноглобулина человека или консенсусный каркас человека.

**[00109]** В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложено антитело к  $\text{IL-1}\beta$ , которое содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в соответствии с SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложено антитело к  $\text{IL-1}\beta$ , которое содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в соответствии с SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложено антитело к  $\text{IL-1}\beta$ , которое содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в соответствии с SEQ ID NO: 11. Последовательности CDR могут определяться в соответствии с известными системами нумерации или их комбинацией. В некоторых вариантах осуществления нумерация CDR приводится по IMGT. В некоторых вариантах осуществления нумерация CDR приводится по Кабату. В некоторых вариантах осуществления нумерация CDR приводится по AbM. В некоторых вариантах осуществления нумерация CDR приводится по Чотиа. В некоторых вариантах осуществления нумерация CDR приводится по Contact.

**[00110]** В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложено антитело к  $\text{IL-1}\beta$ , которое содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в соответствии с SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложено антитело к  $\text{IL-1}\beta$ , которое содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в соответствии с SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложено антитело к  $\text{IL-1}\beta$ , которое содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в соответствии с SEQ ID NO: 12. Последовательности CDR могут определяться в соответствии с известными системами нумерации или их комбинацией. В некоторых вариантах осуществления нумерация CDR приводится по IMGT. В некоторых вариантах осуществления нумерация CDR приводится по Кабату. В некоторых вариантах осуществления нумерация CDR приводится по AbM. В некоторых вариантах осуществления нумерация CDR приводится по Чотиа. В некоторых вариантах осуществления нумерация CDR приводится по Contact.

**[00111]** В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, предложенный в настоящем документе, содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в соответствии с SEQ ID NO: 7, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в соответствии с SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, предложенный в настоящем документе, содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в соответствии с SEQ ID NO: 9, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в соответствии с SEQ ID

NO: 10. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, предложенный в настоящем документе, содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в соответствии с SEQ ID NO: 11, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в соответствии с SEQ ID NO: 12. Последовательности CDR могут определяться в соответствии с известными системами нумерации или их комбинацией. В некоторых вариантах осуществления нумерация CDR приводится по IMGT. В некоторых вариантах осуществления нумерация CDR приводится по Кабату. В некоторых вариантах осуществления нумерация CDR приводится по AbM. В некоторых вариантах осуществления нумерация CDR приводится по Чотиа. В некоторых вариантах осуществления нумерация CDR приводится по Contact.

**[00112]** В других вариантах осуществления в настоящем документе предложено антитело, которое связывается с IL-1 $\beta$ , содержащим HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную любой из SEQ ID NO: 13, 19, 25, 31, 37, 43, 49, 55, 61, 67, 73, 79, 85, 91 и 97; (ii) HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную любой из SEQ ID NO: 14, 20, 26, 32, 38, 44, 50, 56, 62, 68, 74, 80, 86, 92 и 98, (iii) HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 15, 21, 27, 33, 39, 45, 51, 57, 63, 69, 75, 81, 87, 93 и 99; (iv) LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную любой из SEQ ID NO: 16, 22, 28, 34, 40, 46, 52, 58, 64, 70, 76, 82, 88, 94 и 100; (v) LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную любой из SEQ ID NO: 17, 23, 29, 35, 41, 47, 53, 59, 65, 71, 77, 83, 89, 95 и 101; и/или (iv) LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную любой из SEQ ID NO: 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66, 72, 78, 84, 90, 96 и 102. В некоторых вариантах осуществления антитело к IL-1 $\beta$  является гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления антитело к IL-1 $\beta$  содержит акцепторный каркас человека, например каркас иммуноглобулина человека или консенсусный каркас человека.



содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 87, LCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88, LCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89 и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90.

- 5 **[00114]** В некоторых конкретных вариантах осуществления в антителе или антигенсвязывающем фрагменте, предложенном в настоящем документе, HCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, HCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, LCDR1 содержит
- 10 аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, LCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23 и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24. В некоторых конкретных вариантах осуществления в антителе или антигенсвязывающем фрагменте, предложенном в настоящем документе, HCDR1 содержит аминокислотную
- 15 последовательность SEQ ID NO: 37, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38, HCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39, LCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40, LCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41 и LCDR3 содержит аминокислотную
- 20 последовательность SEQ ID NO: 42. В некоторых конкретных вариантах осуществления в антителе или антигенсвязывающем фрагменте, предложенном в настоящем документе, HCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56, HCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57, LCDR1 содержит
- 25 аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58, LCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59 и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60. В некоторых конкретных вариантах осуществления в антителе или антигенсвязывающем фрагменте, предложенном в настоящем документе, HCDR1 содержит аминокислотную
- 30 последовательность SEQ ID NO: 73, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74, HCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75, LCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76, LCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77 и LCDR3 содержит аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 78. В некоторых конкретных вариантах осуществления в антители или антигенсвязывающем фрагменте, предложенном в настоящем документе, HCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92, HCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93, LCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 94, LCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95 и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 96.

**[00115]** В некоторых конкретных вариантах осуществления в антители или антигенсвязывающем фрагменте, предложенном в настоящем документе, HCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, HCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, LCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, LCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29 и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30. В некоторых конкретных вариантах осуществления в антители или антигенсвязывающем фрагменте, предложенном в настоящем документе, HCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44, HCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45, LCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46, LCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47 и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48. В некоторых конкретных вариантах осуществления в антители или антигенсвязывающем фрагменте, предложенном в настоящем документе, HCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62, HCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63, LCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64, LCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65 и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66. В некоторых конкретных вариантах осуществления в антители или антигенсвязывающем фрагменте, предложенном в настоящем документе, HCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, HCDR2 содержит аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 80, HCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81, LCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82, LCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83 и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84. В некоторых конкретных вариантах осуществления в антителе или антигенсвязывающем фрагменте, предложенном в настоящем документе, HCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 97, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 98, HCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99, LCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100, LCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 101 и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102.

**[00116]** В некоторых вариантах осуществления антитело дополнительно содержит одну или более каркасных областей SEQ ID NO: 13–102. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, представляет собой гуманизованное антитело. Каркасные области, описанные в настоящем документе, определяются на основании границ системы нумерации CDR. Иными словами, если CDR определяются, например, по Кабату, по IMGT или по Чотиа, границами каркасных областей являются аминокислотные остатки, окружающие CDR в вариабельной области в формате от N-конца к С-концу: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Например, FR1 определяется аминокислотными остатками от N-конца до аминокислотных остатков CDR1 в соответствии с определением, например, системы нумерации по Кабату, системы нумерации по IMGT или системы нумерации по Чотиа, FR2 определяется аминокислотными остатками между аминокислотными остатками CDR1 и CDR2 в соответствии с определением, например, системы нумерации по Кабату, системы нумерации по IMGT или системы нумерации по Чотиа, FR3 определяется аминокислотными остатками между аминокислотными остатками CDR2 и CDR3 в соответствии с определением, например, системы нумерации по Кабату, системы нумерации по IMGT или системы нумерации по Чотиа, а FR4 определяется аминокислотными остатками от С-конца до аминокислотных остатков CDR3 в соответствии с определением, например, системы нумерации по Кабату, системы нумерации по IMGT или системы нумерации по Чотиа.

**[00117]** В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, предложенный в настоящем документе, содержит VH, имеющую

- аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, предложенный в настоящем документе, содержит VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, предложенный в настоящем документе, содержит VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12.
- 5
- 10 **[00118]** В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в настоящем документе, содержит аминокислотные последовательности с определенным процентом идентичности по отношению к любому антителу, предложенному в настоящем документе, например описанному в разделе б ниже.
- 15 **[00119]** Определение процента идентичности двух последовательностей (например, аминокислотных последовательностей или нуклеотидных последовательностей) можно осуществлять с помощью математического алгоритма. Не имеющим ограничительного характера примером математического алгоритма, используемого для сравнения двух последовательностей, является алгоритм Karlin and Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:2264 2268 (1990) с изменениями, представленными в Karlin and Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:5873 5877 (1993). Такой алгоритм включен в программы NBLAST и XBLAST, приведенные в Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403 (1990). Поиск нуклеотидов в BLAST можно выполнять с использованием набора параметров программы NBLAST для нуклеотидов, например «счет» = 100, «длина слова» = 12, чтобы получить нуклеотидные последовательности, гомологичные молекулам нуклеиновых кислот, описанным в настоящем документе. Поиск белков в BLAST можно выполнять с использованием набора параметров программы XBLAST, например «счет» = 50, «длина слова» = 3, чтобы получать аминокислотные последовательности, гомологичные молекуле белка, описанные в настоящем документе. Чтобы получить совмещенные гэпы для сравнения, можно использовать программу Gapped BLAST, как описано в Altschul et al. (Nucleic Acids Res. 25:3389 3402 (1997)). Альтернативно PSI BLAST можно использовать для выполнения итерационного поиска, посредством которого определяют дистантные взаимосвязи между молекулами (Id.). При использовании программ BLAST, Gapped BLAST и PSI Blast можно использовать параметры по умолчанию
- 20
- 25
- 30

соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST) (см., например, National Center for Biotechnology Information (NCBI) в сети Интернет, [ncbi.nlm.nih.gov](http://ncbi.nlm.nih.gov)). Другим не имеющим ограничительного характера примером математического алгоритма, используемого для сравнения последовательностей, является алгоритм Myers and Miller, CABIOS 4:11–17 (1998). Такой алгоритм включен в программу ALIGN (версия 2.0), которая является частью пакета программ совмещения последовательностей GCG. При использовании программы ALIGN для сравнения последовательностей аминокислот можно применять таблицу весов аминокислотных остатков PAM120, а также штраф за длину гэпа 12 и штраф за гэп 4. Процент идентичности двух последовательностей можно определять, используя методики, подобные описанным выше, с допущением пропусков или без них. При расчете процента идентичности, как правило, подсчитывают только точные совпадения.

**[00120]** В некоторых вариантах осуществления антитела, предложенное в настоящем документе, содержит замены (например, консервативные замены), вставки или делеции относительно эталонной последовательности, но антитело к IL-1 $\beta$ , содержащее эту последовательность, сохраняет способность связываться с IL-1 $\beta$ . В некоторых вариантах осуществления в общей сложности от 1 до 10 аминокислот были замещены, вставлены и/или удалены в эталонной аминокислотной последовательности. В некоторых вариантах осуществления замены, вставки или делеции происходят в областях за пределами CDR (т. е. в FR). В некоторых вариантах осуществления антитело к IL-1 $\beta$ , предложенное в настоящем документе, включает в себя посттрансляционные модификации эталонной последовательности.

**[0001]** В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, предложенный в настоящем документе, содержит домен VH, имеющий по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 7, и домен VL, имеющий по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность с аминокислотной последовательностью с SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий

фрагмент, предложенный в настоящем документе, содержит домен VH, имеющий по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 9, и домен VL, имеющий по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность с аминокислотной последовательностью с SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, предложенный в настоящем документе, содержит домен VH, имеющий по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 11, и домен VL, имеющий по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность с аминокислотной последовательностью с SEQ ID NO: 12. Во всех вариантах осуществления, описанных выше, антитела связываются с IL-1 $\beta$ .

**[00121]** В некоторых вариантах осуществления функциональные эпитопы могут быть картированы, например, с помощью комбинаторного аланинового сканирования, для идентификации аминокислот в белке IL-1 $\beta$ , которые необходимы для взаимодействия с антителами к IL-1 $\beta$ , предложенными в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления для идентификации эпитопов можно использовать конформационную и кристаллическую структуру антитела к IL-1 $\beta$ , связанного с IL-1 $\beta$ . В некоторых вариантах осуществления в настоящем описании предложено антитело, которое специфически связывается с тем же эпитопом, что и любое из антител к IL-1 $\beta$ , предложенных в настоящем документе. Например, в некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, предложенный в настоящем документе, связывается с тем же эпитопом, что и антитело к IL-1 $\beta$ ,

содержащее VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, предложенный в настоящем документе, связывается с тем же эпитопом, что и антитело к IL-1 $\beta$ ,  
5 содержащее VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, предложенный в настоящем документе, связывается с тем же эпитопом, что и антитело к IL-1 $\beta$ ,  
10 содержащее VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12.

**[00122]** В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложено антитело к IL-1 $\beta$  или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с IL-1 $\beta$ , конкурируя с любым из антител к IL-1 $\beta$ , описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий  
15 фрагмент, предложенный в настоящем документе, специфически связываются с IL-1 $\beta$ , конкурируя с антителом к IL-1 $\beta$ , содержащим VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, предложенный в настоящем документе,  
20 специфически связываются с IL-1 $\beta$ , конкурируя с антителом к IL-1 $\beta$ , содержащим VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, предложенный в настоящем документе, специфически связываются с IL-1 $\beta$ , конкурируя с антителом к  
25 IL-1 $\beta$ , содержащим VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12.

**[00123]** В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложен связывающийся с IL-1 $\beta$  белок, содержащий любое из антител к IL-1 $\beta$ , описанных выше. В некоторых вариантах осуществления связывающийся с IL-1 $\beta$  белок представляет  
30 собой моноклональное антитело, включая мышинное, химерное, гуманизованное или человеческое антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело к IL-1 $\beta$  представляет собой фрагмент антитела, например scFv. В некоторых вариантах осуществления связывающийся с IL-1 $\beta$  белок представляет собой слитный белок, содержащий антитело к IL-1 $\beta$ , предложенное в настоящем документе. В других

вариантах осуществления связывающийся с  $\text{IL-1}\beta$  белок представляет собой мультиспецифическое антитело, содержащее антитело к  $\text{IL-1}\beta$ , предложенное в настоящем документе. Другие примеры связывающихся с  $\text{IL-1}\beta$  молекул более подробно описаны в следующих разделах.

- 5 **[00124]** В некоторых вариантах осуществления антитело к  $\text{IL-1}\beta$  или антигенсвязывающий белок согласно любому из вышеуказанных вариантов осуществления может иметь любой из признаков, по отдельности или в комбинации, как описано в разделах 5.2.2–5.2.7 ниже.

### 5.2.2. Фрагменты антител

- 10 **[00125]** В настоящем документе термин «антитело» также включает в себя различные фрагменты антитела. Антитела, предложенные в настоящем документе, включают в себя, без ограничений, молекулы иммуноглобулина и иммунологически активные участки молекул иммуноглобулина. Молекулы иммуноглобулина, представленные в  
15 настоящем документе, могут относиться к любому классу (например, IgG, IgE, IgM, IgD и IgA) или к любому подклассу (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) молекулы иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело IgG. В некоторых вариантах осуществления антитело IgG представляет собой антитело IgG1. В некоторых вариантах осуществления антитело IgG представляет собой антитело IgG2, IgG3 или IgG4.

- 20 **[00126]** Варианты и производные антител включают в себя функциональные фрагменты антител, которые сохраняют способность связываться с антигеном. Примеры функциональных фрагментов включают в себя Fab-фрагменты (например, фрагмент антитела, содержащий антигенсвязывающий домен и состоящий из легкой цепи и части тяжелой цепи, соединенных дисульфидной связью); Fab' (например,  
25 фрагмент антитела, содержащий один антигенсвязывающий домен, состоящий из Fab и дополнительной части тяжелой цепи, присоединенной через шарнирную область);  $F(ab')_2$  (например, две молекулы Fab', соединенные межцепочечными дисульфидными связями в шарнирных областях тяжелых цепей; молекулы Fab' могут быть направлены на один и тот же или разные эпитопы); биспецифический Fab (например, молекула Fab, имеющая два антигенсвязывающих домена, каждый из которых может быть направлен  
30 на свой эпитоп); одну цепь, включающую в себя варибельную область, также известная как scFv (например, варибельная антигенсвязывающая детерминантная область одной легкой и одной тяжелой цепи антитела, соединенные между собой цепью из 10–25 аминокислот); связанные дисульфидной связью Fv или dsFv (например,

5 вариабельная антигенсвязывающая детерминантная область одной легкой и одной тяжелой цепи антитела, соединенные дисульфидной связью); камелизованную VH (вариабельную антигенсвязывающую детерминантную область одной тяжелой цепи антитела, в которой некоторые аминокислоты на контактной поверхности VH

10 соответствуют таковым тяжелой цепи натуральных верблюжьих антител); биспецифический scFv (например, молекула scFv или dsFv, имеющая два антигенсвязывающих домена, каждый из которых может быть направлен на свой эпитоп); диатело (например, димеризованный scFv, образующийся при соединении домена VH первого scFv с доменом VL второго scFv и домена VL первого scFv с

15 доменом VH второго scFv; две антигенсвязывающие области диатела могут быть направлены на одинаковые или разные эпитопы); триатело (например, тримеризованный scFv, образующийся способом, аналогичным диателу, но в котором три антигенсвязывающих домена создаются в едином комплексе; три

антигенсвязывающих домена могут быть направлены на одинаковые или разные

20 эпитопы) и тетратело (например, тетрамеризованный scFv, образующийся способом, аналогичным диателу, но в котором четыре антигенсвязывающих домена созданы в одном комплексе; четыре антигенсвязывающих домена могут быть направлены на

одинаковые или разные эпитопы).

**[00127]** Для получения фрагментов антитела было разработано множество методик.

20 Традиционно эти фрагменты получали посредством протеолитического расщепления интактных антител (см., например, Morimoto et al., 1992, J. Biochem. Biophys. Methods 24:107–17; и Brennan et al., 1985, Science 229:81–83). Тем не менее, эти фрагменты в настоящее время можно получать непосредственно с помощью рекомбинантных

25 клеток-хозяев. Например, фрагменты антител Fab, Fv и scFv можно экспрессировать в *E. coli* или клетках дрожжей и секретировать из них, что позволяет с легкостью продуцировать большие количества этих фрагментов. Фрагменты антител можно выделять из фаговых библиотек антител, обсуждаемых выше. Альтернативно

фрагменты Fab'-SH можно непосредственно выделять из *E. coli* и химически связывать с образованием фрагментов F(ab')<sub>2</sub> (Carter et al., 1992, Bio/Technology 10:163–67).

30 Согласно другому подходу, фрагменты F(ab')<sub>2</sub> можно выделять непосредственно из культуры рекомбинантных клеток-хозяев. Fab и фрагмент F(ab')<sub>2</sub> с увеличенным периодом полужизни *in vivo*, содержащие аминокислотные остатки, связывающегося с эпитопом рецептора реутилизации, описаны, например, в патенте США № 5,869,046.

Другие методики получения фрагментов антител очевидны практикующему

специалисту. В определенных вариантах осуществления антитело представляет собой одноцепочечный фрагмент Fv (scFv) (см., например, WO 93/16185; патенты США № 5,571,894 и 5,587,458). Fv и scFv имеют интактные соединения, которые не содержат константных областей; таким образом, они могут быть пригодны для уменьшения неспецифического связывания при использовании *in vivo*. Белки слияния scFv можно конструировать таким образом, чтобы обеспечить слияние эффекторного белка либо с амино-, либо с карбоксиконцом scFv (см., например, Vortebaesk ed. выше). Фрагмент антитела также может представлять собой «линейное антитело», например, как описано в приведенных выше источниках. Такие линейные антитела могут быть

5 неспецифическими или мультиспецифическими, например биспецифическими.

10 моноспецифическими или мультиспецифическими, например биспецифическими.

### 5.2.3. Гуманизированные антитела

**[00128]** Антитела, описанные в настоящем документе, включают в себя гуманизированные антитела. Гуманизированные антитела, такие как гуманизированные антитела, описанные в настоящем документе, могут быть получены с использованием различных методик, известных специалистам в области, включая, без ограничений,

15 прививки CDR (Европейский патент № EP 239,400; публикация заявки на международный патент № WO 91/09967; и патенты США № 5,225,539, 5,530,101 и 5,585,089), изменение поверхности антител или восстановление поверхностного доступа (Европейские патенты EP 592,106 и EP 519,596; Padlan, Molecular Immunology

20 28(4/5):489–498 (1991); Studnicka et al., Protein Engineering 7(6):805–814 (1994) и Roguska et al., PNAS 91:969–973 (1994)), перестановки в цепи (патент США № 5,565,332) и методики, описанные, например, в патенте США № 6,407,213, патенте США № 5,766,886, WO 9317105, Tan et al., J. Immunol. 169:1119–25 (2002), Caldas et al., Protein Eng. 13(5):353–60 (2000), Morea et al., Methods 20(3):267–79 (2000), Baca et al., J.

25 Biol. Chem. 272(16):10678–84 (1997), Roguska et al., Protein Eng. 9(10):895–904 (1996), Couto et al., Cancer Res. 55 (23 Supp):5973s–5977s (1995), Couto et al., Cancer Res. 55(8):1717–22 (1995), Sandhu JS, Gene 150(2):409–10 (1994) и Pedersen et al., J. Mol. Biol. 235(3):959–73 (1994). См. также публикацию заявки на патент США № US 2005/0042664 A1 (24 февраля 2005 года), причем каждая из них полностью включена в настоящий

30 документ путем ссылки.

**[00129]** В некоторых вариантах осуществления антитела, предложенные в настоящем документе, могут представлять собой гуманизированные антитела, которые связываются с IL-1 $\beta$ , в том числе с человеческим IL-1 $\beta$ . Например, гуманизированные антитела по настоящему описанию могут содержать одну или более CDR,

представленных в SEQ ID NO: 13–102. Разные способы гуманизации нечеловеческих антител известны в данной области. Например, гуманизированное антитело может иметь один или более аминокислотных остатков, введенных в его последовательность из источника, который не относится к человеку. Эти нечеловеческие аминокислотные остатки часто называют «импортными» остатками, которые, как правило, берут из «импортного» переменного домена. Гуманизацию можно выполнять, например, следующим способом по Jones et al., *Nature* 321:522–25 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332:323–27 (1988) и Verhoeven et al., *Science* 239:1534–36 (1988)), посредством замены последовательностей гипервариабельных областей на соответствующие последовательности человеческого антитела. В конкретном варианте осуществления гуманизацию антитела, предложенного в настоящем документе, проводят так, как описано в разделе 6 ниже.

**[00130]** В некоторых случаях гуманизированные антитела конструируют посредством прививания CDR, причем аминокислотные последовательности CDR родительского нечеловеческого антитела вставляются в каркас человеческого антитела. Например, Padlan et al. установили, что лишь около одной трети остатков в CDR в действительности контактирует с антигеном, и назвали их «остатками, определяющими специфичность», или SDR (Padlan et al., *FASEB J.* 9:133–39 (1995)). В рамках методики прививания SDR в каркас человеческого антитела прививают только остатки SDR (см., например, Kashmiri et al., *Methods* 36:25–34 (2005)).

**[00131]** Выбор человеческих переменных доменов, которые будут использовать для получения гуманизированных антител, может быть важен для снижения антигенности. Например, в соответствии с так называемым способом «наиболее точного соответствия» проводят скрининг последовательности переменного домена нечеловеческого антитела для сравнения со всей библиотекой известных человеческих последовательностей переменного домена. Человеческая последовательность, которая оказывается ближе всего к этому нечеловеческому антителу, может быть выбрана в качестве человеческого каркаса для гуманизированного антитела (Sims et al., *J. Immunol.* 151:2296–308 (1993) и Chothia et al., *J. Mol. Biol.* 196:901–17 (1987)). В другом способе применяют конкретный каркас, полученный из консенсусной последовательности всех человеческих антител конкретной подгруппы легких или тяжелых цепей. Один и тот же каркас может использоваться для нескольких разных гуманизированных антител (Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4285–89 (1992) и Presta et al., *J. Immunol.* 151:2623–32 (1993)). В некоторых случаях каркас получают из

консенсусных последовательностей наиболее распространенных человеческих подклассов,  $V_{L6}$ , подгруппа I ( $V_{L6I}$ ) и  $V_H$ , подгруппа III ( $V_{HIII}$ ). В другом способе в качестве источника каркасных областей применяют гены зародышевой линии человека.

**[00132]** В альтернативной парадигме, основанной на сопоставлении CDR, которая называется супергуманизацией, гомология FR не имеет значения. Способ заключается в сопоставлении нечеловеческой последовательности с набором функциональных генов зародышевой линии человека. Впоследствии выбирают те гены, которые кодируют идентичные или канонические структуры, близкие к мышинным последовательностям. После этого из генов с общими каноническими структурами с нечеловеческим антителом в качестве доноров FR выбирают те, что демонстрируют наибольшую гомологию внутри CDR. Наконец, нечеловеческие CDR прививают на эти FR (см., например, Tan et al., *J. Immunol.* 169:1119–25 (2002)).

**[00133]** Дополнительно по существу желательно, чтобы антитела были гуманизированы с сохранением своей аффинности к антигену и других предпочтительных биологических свойств. Для достижения этой цели в соответствии с одним способом гуманизированные антитела получают в процессе анализа исходных последовательностей и разных концептуальных гуманизированных продуктов, применяя трехмерные модели исходных и гуманизированных последовательностей. Трехмерные модели иммуноглобулина являются общедоступными и известными специалистам в данной области. Существуют компьютерные программы, демонстрирующие и отображающие вероятные трехмерные конформационные структуры выбранных потенциальных последовательностей иммуноглобулина. К ним, например, относятся WAM (Whitelegg and Rees, *Protein Eng.* 13:819–24 (2002)), Modeller (Sali and Blundell, *J. Mol. Biol.* 234:779–815 (1993)) и Swiss PDB Viewer (Guex and Peitsch, *Electrophoresis* 18:2714–23 (1997)). Исследование этих отображений позволяет анализировать вероятную роль остатков в функционировании иммуноглобулиновой последовательности кандидата, например проводить анализ остатков, которые влияют на способность иммуноглобулина кандидата связывать свой антиген. Таким способом остатки FR можно выбирать и комбинировать из реципиентных и импортных последовательностей так, чтобы получить желаемое свойство антитела, например увеличенную аффинность к целевому (-ым) антигену (-ам). В целом остатки гипервариабельной области напрямую и в наиболее существенной степени определяют влияние на связывание антигена.

**[00134]** Другой способ гуманизации антитела основан на параметре степени гуманизации, который называется содержанием участков человеческой последовательности (HSC). В данном способе мышьяная последовательность сопоставляется с набором генов зародышевой линии человека, и различия оцениваются как HSC. Впоследствии целевая последовательность гуманизируется посредством максимального увеличения ее HSC вместо использования глобального показателя идентичности для получения множества различных гуманизованных вариантов (Lazar et al., *Mol. Immunol.* 44:1986–98 (2007)).

**[00135]** В дополнение к описанным выше способам для получения и отбора гуманизованных антител можно применять эмпирические способы. К таким способам относятся основанные на построении больших библиотек гуманизованных вариантов и отборе наилучших клонов с применением технологий обогащения или методик высокопроизводительного скрининга. Варианты антитела могут быть выделены из библиотек фагового, рибосомального и дрожжевого дисплея, а также посредством скрининга колонии бактерий (см., например, Hoogenboom, *Nat. Biotechnol.* 23:1105–16 (2005); Dufner et al., *Trends Biotechnol.* 24:523–29 (2006); Feldhaus et al., *Nat. Biotechnol.* 21:163–70 (2003); и Schlapschy et al., *Protein Eng. Des. Sel.* 17:847–60 (2004)).

**[00136]** В рамках подхода с применением библиотек FR набор вариантов остатков вводят в определенные положения в FR с последующим скринингом библиотеки для выбора FR, которая наилучшим образом поддерживает привитую CDR. К остаткам для замены могут относиться некоторые или все из «верньерных» остатков, идентифицированных как потенциально определяющие структуру CDR (см., например, Foote and Winter, *J. Mol. Biol.* 224:487–99 (1992)), или из более ограниченного набора целевых остатков, идентифицированных Vasa et al. *J. Biol. Chem.* 272:10678–84 (1997).

**[00137]** При перестановках FR цельные FR комбинируются с нечеловеческими CDR вместо построения комбинаторных библиотек выбранных вариантов остатков (см., например, Dall'Acqua et al., *Methods* 36:43–60 (2005)). Можно применять процесс однократной перестановки FR. Была продемонстрирована эффективность такого процесса, так как полученные антитела демонстрировали улучшенные биохимические и физико-химические свойства, в том числе повышенную экспрессию, более высокую аффинность и термостабильность (см., например, Damschroder et al., *Mol. Immunol.* 44:3049–60 (2007)).

**[00138]** Способ «гуманиринга» основан на экспериментальной идентификации наиболее существенных минимальных детерминант специфичности (MSD) и основан

на последовательной подстановке нечеловеческих фрагментов в библиотеки человеческих FR и оценке связывания. Эта методология обычно приводит к сохранению эпитопа и идентификации антител из множества подклассов с определенным человеческим V-сегментом CDR.

5 **[00139]** Способ «генной инженерии» включает в себя изменение нечеловеческого антитела или фрагмента антитела посредством внесения специфических изменений в аминокислотную последовательность антитела, с тем чтобы получить модифицированное антитело с пониженной иммуногенностью в организме человека, которое, тем не менее, сохраняет желательные свойства связывания исходных  
10 нечеловеческих антител. Методика по существу включает в себя классификацию аминокислотных остатков нечеловеческого антитела как остатков «с низким риском», «с умеренным риском» или «с высоким риском». Классификацию выполняют с использованием расчетов глобального риска/пользы, с помощью которых оценивают прогнозируемую пользу проведения конкретной замены (например, с точки зрения  
15 иммуногенности в организме человека) по сравнению с риском влияния замены на фолдинг полученного антитела. Конкретный человеческий аминокислотный остаток, вводимый в данное положение (например, с низким или умеренным риском) последовательности нечеловеческого антитела, можно выбирать посредством совмещения аминокислотной последовательности переменных областей  
20 нечеловеческого антитела с соответствующей областью специфичной или консенсусной последовательностью человеческого антитела. Аминокислотные остатки в положениях с низким или умеренным риском в нечеловеческой последовательности можно заменять соответствующими остатками в последовательности человеческого антитела по результатам совмещения. Методики получения сконструированных человеческих  
25 белков более подробно описаны в Studnicka et al., Protein Engineering 7:805–14 (1994); патентах США № 5,766,886; 5,770,196; 5,821,123 и 5,869,619; а также в патентной публикации PCT № WO 93/11794.

**[00140]** Композитное человеческое антитело может быть получено с применением, например, технологии Composite Human Antibody™ (Antitope Ltd., г. Кембридж,  
30 Соединенное Королевство). Чтобы получить композитные человеческие антитела, последовательности переменной области конструируют из фрагментов множества последовательностей переменной области человеческого антитела таким образом, чтобы избежать эпитопов Т-клеток, и тем самым сводится к минимуму иммуногенность получаемого антитела.

**[00141]** Деиммунизированное антитело представляет собой антитело, из которого были удалены эпитопы Т-клеток. Описаны способы получения деиммунизированных антител. См., например, Jones et al., *Methods Mol Biol.* 525:405–23 (2009), xiv, и De Groot et al., *Cell. Immunol.* 244:148–153(2006)). Деиммунизированные антитела содержат переменные области без эпитопа Т-клеток и человеческие константные области. Коротко говоря, переменные области антитела клонируют, а затем идентифицируют эпитопы Т-клеток посредством тестирования перекрывающихся пептидов, полученных из переменных областей антитела, в процессе анализа пролиферации Т-клеток. Эпитопы Т-клеток идентифицируют способами *in silico* для выявления связывания пептидов с человеческим МНС класса II. В переменные области вводятся мутации, чтобы ослабить связывание с человеческим МНС II класса. Впоследствии мутированные переменные области используют для получения деиммунизированного антитела.

#### 5.2.4. Варианты антител

**[00142]** В некоторых вариантах осуществления рассматривают модификацию (-и) аминокислотных последовательностей антител, которые связываются с IL-1 $\beta$ , как описано в настоящем документе. Например, может быть желательно оптимизировать аффинность связывания и/или другие биологические свойства антитела, включая, без ограничений, специфичность, термостабильность, уровень экспрессии, эффекторные функции, гликозилирование, пониженную иммуногенность или растворимость. Таким образом, в дополнение к антителам, которые связываются с IL-1 $\beta$ , как описано в настоящем документе, рассматривается возможность получать варианты антител, которые связываются с IL-1 $\beta$ , описанным в настоящем документе. Например, варианты антител могут быть получены посредством внесения соответствующих нуклеотидных изменений в кодирующую ДНК и/или посредством синтеза требуемого антитела или полипептида. Специалистам в данной области будет очевидно, что аминокислотные изменения могут повлиять на посттрансляционные процессы антитела.

#### Химические модификации

**[00143]** В некоторых вариантах осуществления антитела, предложенные в настоящем документе, являются химически модифицированными, например посредством ковалентного присоединения молекулы любого типа к антителу. К производным антител могут относиться антитела, которые были химически модифицированы, например посредством гликозилирования, ацетилирования, пегилирования, фосфорилирования, амидирования, дериватизации с использованием известных

защитных/блокирующих групп, протеолитического расщепления, связывания с клеточным лигандом или другим белком, или конъюгации с одним или более доменами иммуноглобулина (например, Fc или частью Fc). Любые из множества химических модификаций могут проводиться с применением известных методик, включая, без  
5 ограничений, специфическое химическое расщепление, ацетилирование, формилирование, метаболический синтез туникамицина и т. д. Кроме того, антитела могут содержать одну или более неклассических аминокислот.

**[00144]** В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, изменено для повышения или понижения степени гликозилирования  
10 антитела. Добавление или делеция сайтов гликозилирования в антителе может быть удобно осуществлено путем изменения аминокислотной последовательности таким образом, чтобы создать или удалить один или более сайтов гликозилирования.

**[00145]** Когда антитело, предложенное в настоящем документе, слито с областью Fc, углевод, присоединенный к ней, можно изменить. Нативные антитела, продуцируемые  
15 клетками млекопитающих, обычно содержат разветвленный биантеннарный олигосахарид, который, как правило, присоединен с помощью N-связи к Asn<sup>297</sup> домена CH<sub>2</sub> области Fc. См., например, Wright et al. *TIBTECH* 15:26–32 (1997). Олигосахарид может содержать различные углеводы, например маннозу, N-ацетилглюкозамин (GlcNAc), галактозу и сиаловую кислоту, а также фукозу, присоединенную к GlcNAc в  
20 «стебле» структуры биантеннарного олигосахариды. В некоторых вариантах осуществления можно выполнить модификации олигосахариды в связывающих молекулах, предложенных в настоящем документе, для создания вариантов с определенными улучшенными свойствами.

**[00146]** В других вариантах осуществления, когда антитело, предложенное в  
25 настоящем документе, слито с областью Fc, варианты антитела, предложенные в настоящем документе, могут иметь углеводную структуру, в которой отсутствует фукоза, присоединенная (прямо или косвенно) к указанной области Fc. Например, количество фукозы в таком антителе может составлять от 1% до 80%, от 1% до 65%, от 5% до 65% или от 20% до 40%. Количество фукозы определяют посредством расчета  
30 среднего количества фукозы в цепочке сахара, присоединенной к остатку Asn<sup>297</sup>, относительно суммарного содержания всех гликоструктур, присоединенных к остатку Asn<sup>297</sup> (например, сложных, гибридных структур и структур с высоким содержанием маннозы), измеренного с помощью масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией и времяпролетным анализом (MALDI-TOF), как

описано, например, в WO 2008/077546. Asn297 обозначает остаток аспарагина, расположенный примерно в положении 297 области Fc (система нумерации EU для остатков в области Fc); однако Asn297 может также располагаться в положении примерно на  $\pm 3$  аминокислоты ближе к N-концу или ближе к C-концу относительно положения 297, т. е. между положениями 294 и 300, из-за минорных вариаций последовательности в антителах. Такие варианты фукозилирования могут иметь улучшенную функцию ADCC. См., например, патентные публикации США № US 2003/0157108 и US 2004/0093621. Примеры публикаций, относящихся к «дефукозилированным» или «фукозодефицитным» вариантам антител, включают в себя: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki et al. *J. Mol. Biol.* 336:1239–1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004). Примеры клеточных линий, способных продуцировать дефукозилированные антитела, включают в себя клетки Lec13 CHO с дефицитом фукозилирования белка (Ripka et al. *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533–545 (1986); заявка на патент США № US 2003/0157108 и WO 2004/056312, а также нокаутные клеточные линии, такие как клетки CHO, нокаутные по гену альфа-1,6-фукозилтрансферазы *FUT8*, (см., например, Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004); Kanda, Y. et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 94(4):680–688 (2006); и WO2003/085107).

**[00147]** Связывающие молекулы, содержащие антитело, предложенное в настоящем документе, дополнительно снабжены разделенными пополам олигосахаридами, например в которых биантеннарный олигосахарид, присоединенный к области Fc, разделен пополам посредством GlcNAc. Такие варианты могут иметь сниженное фукозилирование и/или улучшенную функцию ADCC. Примеры таких вариантов описаны, например, в WO 2003/011878 (Jean-Mairet et al.); патенте США № 6,602,684 (Umana et al.) и US 2005/0123546 (Umana et al.). Также предложены варианты с по меньшей мере одним остатком галактозы в олигосахариде, присоединенном к области Fc. Такие варианты могут иметь улучшенную функцию CDC. Такие варианты описаны, например, в WO 1997/30087; WO 1998/58964 и WO 1999/22764.

**[00148]** В молекулы, которые содержат настоящее антитело и область Fc, можно ввести одну или более аминокислотных модификаций в область Fc с получением таким образом варианта области Fc. Вариант области Fc может содержать последовательность

человеческой области Fc (например, области Fc человеческого IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4), содержащую аминокислотную модификацию (например, замену) в одном или более аминокислотных положениях.

[00149] В некоторых вариантах осуществления настоящая заявка предусматривает варианты, которые обладают некоторыми, но не всеми эффекторными функциями, что делает его желательным кандидатом для применений, в которых важно время полужизни связывающей молекулы *in vivo*, а некоторые эффекторные функции (такие как комплемент и ADCC) являются ненужными или вредными. Могут быть выполнены анализы цитотоксичности *in vitro* и/или *in vivo* для подтверждения снижения/истощения активностей CDC и/или ADCC. Например, можно провести анализы связывания с Fc-рецептором (FcR), чтобы проверить, что связывающая молекула неспособна связываться с Fc $\alpha$ R (следовательно, вероятно, не обладает активностью ADCC), но сохраняет способность связываться с FcR $\beta$ . Не имеющие ограничительного характера примеры анализов *in vitro* для оценки активности ADCC представляющей интерес молекулы описаны в патенте США № 5,500,362 (см., например, Hellstrom, I. et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83:7059–7063 (1986)) и Hellstrom, I et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82:1499–1502 (1985); 5,821,337 (см. Bruggemann, M. et al., *J. Exp. Med.* 166:1351–1361 (1987)). Альтернативно могут использоваться способы нерадиоактивных анализов (см., например, нерадиоактивный анализ цитотоксичности АСТП™ для проточной цитометрии (CellTechnology, Inc. г. Маунтин-Вью, штат Калифорния, США; и нерадиоактивный анализ цитотоксичности CytoTox 96® (Promega, г. Мэдисон, штат Висконсин, США). Применимые для таких анализов эффекторные клетки включают в себя мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) и натуральные клетки-киллеры (NK). Альтернативно или дополнительно активность ADCC представляющей интерес молекулы может быть оценена *in vivo*, например, на животной модели, такой как описанная в Clynes et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95:652–656 (1998). Также могут быть выполнены анализы связывания C1q для подтверждения того, что антитело не способно связываться с C1q и, следовательно, не обладает активностью CDC. См., например, анализ связывания C1q и C3c методом ELISA в WO 2006/029879 и WO 2005/100402. Для оценки активации комплемента может быть выполнен анализ CDC (см., например, Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996); Cragg, M.S. et al., *Blood* 101:1045–1052 (2003) и Cragg, M.S. and M.J. Glennie, *Blood* 103:2738–2743 (2004)). Определение связывания FcR $\beta$  и клиренса/времени полужизни *in vivo*

также может выполняться способами, известными в данной области (см., например, Petkova, S.B. et al., *Int'l. Immunol.* 18(12):1759–1769 (2006)).

**[00150]** Связывающие молекулы с пониженной эффекторной функцией включают в себя таковые с заменой одного или более остатков области Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 и 329 (патент США № 6,737,056). Такие мутанты Fc включают в себя мутантов Fc с заменами в двух или более аминокислотных положениях 265, 269, 270, 297 и 327, в том числе так называемый Fc-мутант «DANA» с заменой остатков 265 и 297 на аланин (патент США № 7,332,581).

**[00151]** Описаны некоторые варианты с улучшенным или пониженным связыванием с FcR. (См., например, патент США № 6,737,056; WO 2004/056312 и Shields et al., *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591–6604 (2001)).

**[00152]** В некоторых вариантах осуществления вариант содержит область Fc с одной или более аминокислотными заменами, которые улучшают ADCC, например с заменами в положениях 298, 333 и/или 334 области Fc (нумерация остатков по ЕС). В некоторых вариантах осуществления изменения внесены в область Fc, что приводит к изменению (т. е. улучшению или снижению) связывания с C1q и/или комплементзависимой цитотоксичности (CDC), например, как описано в патенте США № 6,194,551, WO 99/51642, а также Idusogie et al. *J. Immunol.* 164: 4178–4184 (2000).

**[00153]** Связывающие молекулы с увеличенным временем полужизни и улучшенным связыванием с неонатальным Fc-рецептором (FcRn), который отвечает за перенос материнских IgG плоду (Guyer et al., *J. Immunol.* 117:587 (1976) и Kim et al., *J. Immunol.* 24:249 (1994)), описаны в US2005/0014934A1 (Hinton et al.). Эти молекулы содержат область Fc с одной или более заменами, что улучшает связывание области Fc с FcRn. Такие варианты Fc включают в себя таковые с заменами в одном или более остатках области Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 или 434, например замену в области Fc остатка 434 (патент США № 7,371,826). См. также Duncan & Winter, *Nature* 322:738–40 (1988); патент США № 5,648,260; патент США № 5,624,821 и WO 94/29351 относительно других примеров вариантов области Fc.

**[00154]** В некоторых вариантах осуществления может быть желательно создание сконструированных с цистеином антител, в которых один или более остатков антитела замещены цистеиновыми остатками. В некоторых вариантах осуществления замещенные остатки встречаются в неэкранированных сайтах антитела. Путем замещения таких остатков цистеином реакционноспособные тиоловые группы тем

самым размещаются в незкранированных сайтах антитела и могут быть использованы для конъюгации антитела с другими фрагментами, такими как фрагменты лекарственного средства или фрагменты линкер-лекарственного средства для создания иммуноконъюгата, как описано далее в настоящем документе.

## 5 **Замены, делеции или вставки**

- 10 **[00155]** Изменения могут представлять собой замену, делецию или вставку одного или более кодонов, кодирующих антитело или полипептид, которые приводят к изменению аминокислотной последовательности по сравнению с оригинальным антителом или полипептидом. Сайты, представляющие интерес с точки зрения замещающего мутагенеза, включают в себя CDR и FR.
- 15 **[00156]** Аминокислотные замены могут быть результатом замещения одной аминокислоты на другую аминокислоту с аналогичными структурными и/или химическими свойствами, например замены лейцина на серин, например консервативными заменами аминокислот. Стандартные методики, известные специалистам в данной области, можно применять для введения мутаций в нуклеотидную последовательность, кодирующую молекулы, представленные в настоящем документе, в том числе, например, сайт-направленный мутагенез и ПЦР-опосредованный мутагенез, который приводит к аминокислотным заменам. Вставки или делеции могут необязательно охватывать в диапазоне от около 1 до 5 аминокислот.
- 20 В определенных вариантах осуществления замена, делеция или вставка, включает в себя менее 25 аминокислотных замен, менее 20 аминокислотных замен, менее 15 м, менее 10 аминокислотных замен, менее 5 аминокислотных замен, менее 4 аминокислотных замен, менее 3 аминокислотных замен или менее 2 аминокислотных замен по сравнению с исходной молекулой. В конкретном варианте осуществления замена представляет собой консервативную замену аминокислот, выполненную в одном или более предполагаемых несущественных аминокислотных остатков. Допустимое изменение может быть определено по систематическому выполнению вставок, делеций или замен аминокислот в последовательности и тестированию активности полученных вариантов по сравнению с исходными антителами.
- 25 **[00157]** Вставки аминокислотной последовательности включают в себя амино- и/или карбоксильные концевые слияния, длина которых варьируется от одного остатка до полипептидов, содержащих множество остатков, а также вставки внутрь последовательности одного или множества аминокислотных остатков. Примеры концевых вставок включают в себя антитело с N-концевым метиониловым остатком.
- 30

**[00158]** В настоящее описание включены антитела, полученные посредством консервативных аминокислотных замен. В рамках консервативной замены аминокислот аминокислотный остаток заменяется аминокислотным остатком с боковой цепью с близким зарядом. Как описано выше, семейства аминокислотных остатков, имеющие боковые цепи со сходными зарядами, включают в себя аминокислоты с кислыми боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Альтернативно мутации могут вводиться случайным образом во всей или части кодирующей последовательности, например, посредством мутагенеза насыщения, и можно проводить скрининг биологической активности полученных мутантов для идентификации мутантов, чья активность сохраняется. После мутагенеза можно экспрессировать кодируемый белок и можно определять активность белка. Можно выполнять консервативные замены (например, в пределах группы аминокислот с аналогичными свойствами и/или боковыми цепями), так чтобы сохранить или значительно не изменять свойства. Примеры замен приведены в таблице 2 ниже.

**Таблица 2. Аминокислотные замены**

Исходный Остаток	Пример нуклеотидного основания	Исходный Остаток	Пример нуклеотидного основания
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Leu (L)	Норлейцин; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys (K)	Arg; Gln; Asn
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Met (M)	Leu; Phe; Ile
Asp (D)	Glu; Asn	Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr
Cys (C)	Ser; Ala	Pro (P)	Ala
Gln (Q)	Asn; Glu	Ser (S)	Thr
Glu (E)	Asp; Gln	Thr (T)	Val; Ser
Gly (G)	Ala	Trp (W)	Tyr; Phe
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Норлейцин	Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Норлейцин

**[00159]** Аминокислоты можно разделять на группы в соответствии с подобием свойств их боковых цепей (см., например, Lehninger, *Biochemistry* 73–75 (2d ed. 1975)):

(1) неполярные: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M); (2) нейтральные полярные: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q); (3) кислые: Asp (D), Glu (E); и (4) основные: Lys (K), Arg (R), His(H). Альтернативно природные остатки могут подразделяться на группы на основании общих свойств

5 боковой цепи: (1) гидрофобные: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile; (2) нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln; (3) кислые: Asp, Glu; (4) основные: His, Lys, Arg; (5) остатки, которые влияют на ориентацию цепи: Gly, Pro; и (6) ароматические: Trp, Tyr, Phe. Например, любой остаток цистеина, не участвующий в поддержании  
 10 надлежащей конформации антитела, может также быть замещен, например, другой аминокислотой, такой как аланин или серин, для повышения устойчивости к окислению молекулы и предотвращения аберрантного поперечного сшивания. Неконсервативные замены будут включать в себя замену представителя одного из этих классов на представителя другого класса.

**[00160]** Одним типом варианта замены является замещение одного или более  
 15 остатков гипервариабельной области исходного антитела (например, гуманизированного или человеческого антитела). Как правило, полученный (-ые) вариант (-ы), выбранный (-ые) для дальнейшего исследования, будет (будут) иметь модификации (например, улучшения) определенных биологических свойств (например, повышенную аффинность, сниженную иммуногенность) относительно исходного  
 20 антитела и/или по существу сохранит определенные биологические свойства исходного антитела. Пример варианта замены представляет собой антитело с созревшей аффинностью, которое удобно получать, например, с использованием методик созревания аффинности на основе фагового дисплея, например, описанных в настоящем документе. Вкратце, один или более остатков в CDR мутируют, варианты  
 25 антител экспонируют на фаге и проводят скрининг конкретной биологической активности (например, аффинности связывания).

**[00161]** В CDR можно вносить изменения (например, замены), например, для повышения аффинности антитела. Такие изменения могут быть выполнены в «горячих точках» CDR, т. е. в остатках, кодируемые кодонами, которые с высокой частотой  
 30 подвергаются мутации во время процесса соматического созревания (см., например, Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179–196 (2008)) и/или SDR (а-CDR), причем полученный вариант антитела или его фрагмент тестируют на аффинность связывания. Описано созревание аффинности путем конструирования и повторной селекции из вторичных библиотек, например, Hoogenboom et al. in *Methods in Molecular Biology*

178:1–37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001). В некоторых вариантах осуществления созревания аффинности различия вводят в переменные гены, выбранные для созревания, любым из различных способов (например, ПЦР с внесением ошибок, перестановкой цепей или нацеленным на олигонуклеотиды мутагенезом). Затем создается вторичная библиотека. Далее библиотеку подвергают скринингу для идентификации любых вариантов антител с требуемой аффинностью. Другой способ введения различий предполагает подходы, направленные на CDR, при которых несколько остатков CDR (например, по 4–6 остатков за раз) изменяют случайным образом. Остатки CDR, участвующие в связывании антигена, можно конкретно идентифицировать, например, с использованием мутагенеза с аланиновым сканированием или моделирования. Более подробное описание созревания аффинности представлено в разделе ниже.

**[00162]** В некоторых вариантах осуществления замены, вставки или делеции могут возникать в пределах одной или более CDR, если только такие изменения по существу не снижают способность антитела связывать антиген. Например, консервативные изменения (например, консервативные замены, как представлено в настоящем документе), которые по существу не снижают аффинность связывания, могут быть выполнены в CDR. В некоторых вариантах осуществления вариантов последовательностей антител, предложенных в настоящем документе, каждая область CDR либо не изменена, либо содержит не более одной, двух или трех аминокислотных замен.

**[00163]** Полезным способом идентификации остатков или областей антитела, которые могут стать мишенью для мутагенеза, является «мутагенез с аланиновым сканированием», как описано в публикации Cunningham and Wells, *Science*, 244:1081–1085 (1989). В этом способе остаток или группу целевых остатков (например, заряженные остатки, такие как Arg, Asp, His, Lys и Glu) идентифицируют и замещают нейтральной или отрицательно заряженной аминокислотой (например, аланином или полиаланином) для определения того, повлияло ли это на взаимодействие антитела с антигеном. Можно вводить дополнительные замены в аминокислотные местоположения, демонстрирующие функциональную чувствительность к исходным заменам. Альтернативно или дополнительно точки контакта между антителом и антигеном идентифицируют по кристаллической структуре комплекса антитело–антиген. Такие контактирующие остатки и соседние остатки могут нацеливаться или

могут быть исключены из кандидатов на замену. Варианты можно подвергнуть скринингу для определения того, имеют ли они требуемые свойства.

5 [00164] Вставки аминокислотной последовательности включают в себя амино- и/или карбоксиконцевые слияния, длина которых варьирует от одного остатка до полипептидов, содержащих сотни или более остатков, а также вставки внутри последовательности одного или множества аминокислотных остатков. Примеры концевых вставок включают в себя антитело с N-концевым метиониловым остатком. Другие инсерционные варианты молекулы антитела включают в себя слияние N- или C-конца антитела с ферментом (например, для антитело-направленной ферментно-10 пролекарственной терапии (ADEPT)) или полипептидом, который увеличивает период полувыведения антитела из сыворотки.

[00165] Изменения могут вноситься с применением способов, известных специалистам в области, например, опосредованный олигонуклеотидами (сайт-направленный) мутагенез, аланиновое сканирование и ПЦР-мутагенез. Сайт-направленный мутагенез (см., например, Carter, *Biochem J.* 237:1–7 (1986); и Zoller *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 10:6487–500 (1982)), касетный мутагенез (см., например, Wells *et al.*, *Gene* 34:315–23 (1985)), или с клонированной ДНК можно выполнять другие известные методики, чтобы получать ДНК для варианта антитела.

### Мутации в Fc

20 [00166] Для облегчения образования гетеродимера между двумя тяжелыми цепями, например одной со слитным антителом к IL-1 $\beta$  или его антигенсвязывающим фрагментом и одной без него, или одной, содержащей Fc для плеча к IL-1 $\beta$ , и одной для плеча к тканевой мишени, гетеродимерные мутации вводят в Fc двух тяжелых цепей. Примеры таких мутаций в Fc включают в себя, без ограничений, мутации Zymework (см., например, US 10,457,742) и мутации «выступ во впадину» (см., например, Ridgway *et al.*, *Protein Eng.*, 9(7): 617–621, 1996). В настоящем описании также могут использоваться другие гетеродимерные мутации. В некоторых вариантах осуществления модифицированный СНЗ, как описано в настоящем документе, используют для облегчения образования гетеродимера между двумя тяжелыми цепями.

30 [00167] В конкретном варианте осуществления каждая из двух тяжелых цепей антитела содержит одну или более гетеродимерных мутаций или одну или более мутаций «выступ во впадину». В конкретном варианте осуществления одна или более гетеродимерных мутаций находятся в домене СНЗ.

**[00168]** В некоторых вариантах осуществления область Fc антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержит замены, которые изменяют связывание антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с неонатальным Fc-рецептором (FcRn). В некоторых вариантах осуществления область Fc антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержит замены, которые усиливают связывание антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с неонатальным Fc-рецептором (FcRn). В некоторых вариантах осуществления область Fc антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержит замены, которые усиливают связывание антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с неонатальным Fc-рецептором (FcRn) при pH ~ 6. В некоторых вариантах осуществления область Fc антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержит замены, которые усиливают связывание антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с неонатальным Fc-рецептором (FcRn) при pH ~ 6, таким образом усиливая FcRn-опосредованную эндосомальную рециркуляцию. В некоторых вариантах осуществления область Fc антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержит замены, которые усиливают связывание антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с неонатальным Fc-рецептором (FcRn) при pH ~ 6, что приводит к более длительной экспозиции в сыворотке. В некоторых вариантах осуществления область Fc антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержит замены, которые усиливают связывание при кислотном pH. В некоторых вариантах осуществления область Fc антитела или его антигенсвязывающего фрагмента имеет мутации M252Y/S254T/T256E (YTE), причем нумерация аминокислотных остатков соответствует индексу EU.

#### 5.2.5. Созревание аффинности *in vitro*

**[00169]** В некоторых вариантах осуществления варианты антител, имеющих улучшенные свойства, такие как аффинность, стабильность или уровень экспрессии, по сравнению с родительским антителом могут быть получены посредством созревания аффинности *in vitro*. Подобно природным прототипам созревание аффинности *in vitro* основано на принципах мутации и отбора. Отображают библиотеки антител на поверхности организма (например, фага, бактерии, дрожжей или клетки млекопитающих) или в ассоциации (например, ковалентно или нековалентно) с их кодирующей мРНК или ДНК. Селекция аффинности антител дисплея позволяет выделять организмы или комплексы с генетической информацией, кодирующей антитела. Два или три цикла мутации и отбора с применением способов дисплея, например фагового дисплея, обычно позволяют получать фрагменты антител с

аффинностью в нижней части наномолярного диапазона. Антитела с созревшей аффинностью могут обладать наномолярной или даже пикомолярной аффинностью к целевому антигену.

5 [00170] Фаговый дисплей является широко распространенным способом дисплея и отбора антител. Проводят дисплей антител на поверхности бактериофагов Fd или M13 в виде слияний с белком оболочки фага. Отбор включает в себя воздействие антигена, чтобы антитела фагового дисплея связывались со своими мишенями — процесс, который называют «пэннингом». Связанный с фагом антиген извлекают и используют для инфицирования бактерий, чтобы продуцировать фаг для дальнейших циклов отбора. См., например, обзор Hoogenboom, *Methods. Mol. Biol.* 178:1–37 (2002) и Bradbury and Marks, *J. Immunol. Methods* 290:29–49 (2004).

10 [00171] В системе дрожжевого дисплея (см., например, Boder *et al.*, *Nat. Biotech.* 15:553–57 (1997) и Chao *et al.*, *Nat. Protocols* 1:755–68 (2006)) антитело может быть слито с адгезионной субъединицей белка агглютинина дрожжей Aga2p, который  
15 прикрепляется к клеточной стенке дрожжей посредством дисульфидных связей с Aga1p. Дисплей белка посредством Aga2p отводит белок от клеточной поверхности, и таким образом сводятся к минимуму возможные взаимодействия с другими молекулами на стенке клетки дрожжей. Для скрининга библиотеки используют магнитное  
20 разделение и проточную цитометрию, чтобы отобрать антитела с повышенной аффинностью или стабильностью. Связывание с интересующим растворимым антигеном определяется за счет внесения в дрожжи метки в виде биотинилированного антигена и под действием вторичного реагента, такого как стрептавидин, конъюгированный с флуорофором. Вариации поверхностной экспрессии антитела могут оцениваться с помощью иммунофлуоресцентной метки, либо  
25 гемагглютининовой, либо с-Мус-эпитопной метки, фланкирующей одноцепочечное антитело (например, scFv). Было показано, что экспрессия коррелирует со стабильностью представленного на поверхности белка, и, таким образом, можно отбирать антитела с точки зрения более высокой стабильности, а также аффинности (см., например, Shusta *et al.*, *J. Mol. Biol.* 292:949–56 (1999)).  
30 Дополнительным преимуществом дрожжевого дисплея является то, что фолдинг представленных белков происходит в эндоплазматическом ретикулуме эукариотических клеток дрожжей с применением шаперонов с применением эндоплазматического ретикулума и механизмов контроля качества. После завершения созревания можно удобным образом «титровать» аффинность антитела при его представлении на поверхности дрожжей без

необходимости экспрессирования и очистки каждого клона. Теоретическим ограничением поверхностного дрожжевого дисплея является потенциально меньший размер функциональной библиотеки по сравнению с другими способами дисплея; однако в недавно предложенном подходе используют систему скрещивания клеток дрожжей, чтобы сформировать комбинаторное разнообразие, размеры которого, по оценкам, составляют  $10^{14}$  (см., например, патентную публикацию США 2003/0186374 и Blaise *et al.*, *Gene* 342:211–18 (2004)).

**[00172]** В рибосомном дисплее получают комплексы антитело-рибосома-мРНК (ARM) для отбора в бесклеточной системе. Библиотека ДНК, кодирующая конкретную библиотеку антител, генетически слита с последовательностью спейсера без стоп-кодона. Эта последовательность спейсера при трансляции по-прежнему связана с пептидилной тРНК и находится в просвете рибосомы, а потому позволяет интересующему белку проходить через рибосому и подвергаться фолдингу.

Полученный комплекс мРНК, рибосомы и белка может связываться с фиксированным на поверхности лигандом, обеспечивая одновременное выделение антитела и его кодирующей мРНК за счет аффинного связывания с лигандом. Впоследствии проходит обратная транскрипция связанной с рибосомой мРНК в кДНК, которую можно использовать в следующем цикле отбора после проведения мутагенеза (см., например, Fukuda *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 34:e127 (2006)). В дисплее мРНК образуется ковалентная связь между антителом и мРНК с использованием пурамицина в качестве адаптерной молекулы (Wilson *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:3750–55 (2001)).

**[00173]** Поскольку все перечисленные способы выполняют полностью *in vitro*, они обеспечивают два основных преимущества по сравнению с другими методиками отбора. Во-первых, разнообразие библиотеки не ограничивается эффективностью трансформации бактериальных клеток, а только числом рибосом и различных молекул мРНК, присутствующих в пробирке. Во-вторых, после каждого цикла отбора можно с легкостью вносить случайные мутации, например, некорректирующими полимеразами, поскольку нет необходимости в трансформации ни одной из библиотек после любой стадии диверсификации.

**[00174]** В некоторых вариантах осуществления можно использовать системы дисплея млекопитающих.

**[00175]** Разнообразие можно также вносить в CDR библиотек антител целевым образом или посредством случайного введения. Первый подход включает в себя направленное воздействие на все CDR антитела посредством высокого или низкого

уровня мутагенеза или направленное воздействие на выделенные «горячие точки» соматических гипермутаций (см., например, Но *et al.*, J. Biol. Chem. 280:607–17 (2005)) или на остатки, которые на основании экспериментальных данных или по структурным соображениям предположительно влияют на аффинность. Разнообразие можно также вносить посредством замены областей с присутствующим им природным разнообразием посредством перестановок ДНК или аналогичных методик (см., например, Lu *et al.*, J. Biol. Chem. 278:43496–507 (2003); патенты США № 5,565,332 и 6,989,250). В альтернативных методиках с направленным воздействием на гипервариабельные петли, распространяющиеся на остатки каркасной области (см., например, Bond *et al.*, J. Mol. Biol. 348:699–709 (2005)), применяют делеции в петлях и вставки в CDR или используют диверсификацию на основе гибридизации (см., например, патентную публикацию США № 2004/0005709). Дополнительные способы формирования разнообразия в CDR описаны, например, в патенте США № 7,985,840. Другие способы, которые можно использовать для построения библиотек антител и/или созревания аффинности антител, описаны, например, в патентах США № 8,685,897 и 8,603,930, а также в публикациях заявки на патент США № 2014/0170705, 2014/0094392, 2012/0028301, 2011/0183855 и 2009/0075378, каждый из которых путем ссылки включается в настоящий документ.

**[00176]** Скрининг библиотек можно осуществлять с помощью разных методик, известных специалистам в области. Например, антитела могут быть иммобилизованы на твердых подложках, колонках, контактах или целлюлозных / поливинилиденфторидных мембранах / других фильтрах, экспрессированы на клетках-хозяевах, фиксированных на адсорбционных планшетах, или использованы при сортировке клеток, или конъюгированы с биотином для фиксации на покрытых стрептавидином гранулах, или использованы в любом другом способе пэннинга библиотек дисплея.

**[00177]** Обзор способов созревания аффинности *in vitro* см., например, Hoogenboom, Nature Biotechnology 23:1105–16 (2005); Quiroz and Sinclair, Revista Ingeneria Biomedica 4:39–51 (2010); и ссылки в данной публикации.

### 30 **5.2.6. Модификации антител**

**[00178]** Ковалентные модификации антител включены в объем настоящего описания. Ковалентные модификации включают в себя взаимодействие целевых аминокислотных остатков антитела с органическим дериватирующим агентом, который в состоянии реагировать с выбранной боковой цепью или с N- или C-концевыми остатками

антитела. К другим модификациям относятся деамидирование глутаминильных и аспарагильных остатков до соответствующих глутамильных и аспартильных остатков соответственно, гидроксирование пролина и лизина, фосфорилирование гидроксильных групп серильных или треонильных остатков, метилирование  $\alpha$ -аминогрупп боковых цепей лизина, аргинина и гистидина (см., например, Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties 79–86 (1983)), ацетилирование N-концевого амина и амидирование любой C-концевой карбоксильной группы.

5  
10  
15  
[00179] К другим типам ковалентной модификации антитела, включенным в объем настоящего описания, относятся изменение природного характера гликозилирования антитела или полипептида (см., например, Beck *et al.*, *Curr. Pharm. Biotechnol.* 9:482–501 (2008) и Walsh, *Drug Discov. Today* 15:773–80 (2010)) и связывание антитела с одним из разнообразных небелковых полимеров, например полиэтиленгликолем (ПЭГ), полипропиленгликолем или полиоксиалкиленами, так, как это описано, например, в патенте США № 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192 или 4,179,337.

Антитело, которое связывается с IL-1 $\beta$  согласно описанию, может быть также генетически слито или конъюгировано с одной или более константными областями или участками иммуноглобулина (например, Fc) для увеличения периода полувыведения и/или обеспечения известных Fc-опосредованных эффекторных функций.

20  
25  
[00180] Антитело в соответствии с настоящим описанием, которое связывается с IL-1 $\beta$ , может также модифицироваться с образованием химерных молекул, содержащих антитело, которое связывается с IL-1 $\beta$ , слитое с другим гетерологичным полипептидом или аминокислотной последовательностью, например тэгом эпитопа (см., например, Terpe, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60:523–33 (2003)) или областью Fc молекулы IgG (см., например, Aruffo, Antibody Fusion Proteins 221–42 (Chamow and Ashkenazi eds., 1999)).

30  
[00181] В настоящем документе также предложен слитный белок, содержащий антитело, которое связывается с IL-1 $\beta$  в соответствии с описанием, и гетерологичный полипептид. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный полипептид, с которым генетически слито или химически конъюгировано антитело, используют для направленного воздействия антитела на клетки, имеющие IL-1 $\beta$ , экспрессированный на клеточной поверхности.

[00182] В настоящем документе также предложены панели антител, которые связываются с антигеном IL-1 $\beta$ . В конкретных вариантах осуществления панели антител отличаются разными скоростями ассоциации, разными скоростями

диссоциации, разной аффинностью к антигену  $\Pi$ -1 $\beta$  и/или разной специфичностью по отношению к антигену  $\Pi$ -1 $\beta$ . В некоторых вариантах осуществления панели содержат или состоят из от около 10 до около 1000 антител или более. Панели антител можно использовать, например, в 96-луночных или 384-луночных планшетах для таких анализов, как ELISA.

#### 5.2.7. Другие связывающие молекулы, содержащие антитела

**[00183]** В другом аспекте в настоящем документе предложена связывающая молекула, содержащая антитело к  $\Pi$ -1 $\beta$ , предложенное в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления предложено антитело к  $\Pi$ -1 $\beta$ , которое является частью других связывающих молекул. Примеры связывающих молекул согласно настоящему описанию представлены в настоящем документе.

#### Слитные белки

**[00184]** В различных вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, может быть генетически слито или химически конъюгировано с другим агентом, например с белковыми структурами. Антитело может быть химически конъюгировано с агентом или иным образом нековалентно конъюгировано с агентом. Агент может представлять собой пептид или антитело (или его фрагмент).

**[00185]** Таким образом, в некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложены антитела, которые рекомбинантно слиты или химически конъюгированы (ковалентные или нековалентные конъюгации) с гетерологичным белком или полипептидом (или его фрагментом, например с полипептидом из около 10, около 20, около 30, около 40, около 50, около 60, около 70, около 80, около 90, около 100, около 150, около 200, около 250, около 300, около 350, около 400, около 450, или около 500 аминокислот, или более 500 аминокислот) с получением слитных белков, а также варианты их использования. В частности, в настоящем документе предложены слитные белки, содержащие антигенсвязывающий фрагмент антитела, предложенного в настоящем документе (например, CDR1, CDR2 и/или CDR3), и гетерологичный белок, полипептид или пептид.

**[00186]** Более того, обеспеченные в настоящем документе антитела могут быть слиты с последовательностью маркера или «тега», например пептида, для облегчения очистки. В конкретных вариантах осуществления аминокислотная последовательность маркера или метки представляет собой гексагистидиновый пептид, гемагглютининовую метку («HA») и метку «FLAG».

**[00187]** Хорошо известны способы слияния или конъюгации функциональных групп (включая полипептиды) с антителами (см., например, Arnon et al., *Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy*, in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy* 243–56 (Reisfeld et al. eds., 1985); Hellstrom et al., *Antibodies for Drug Delivery*, in *Controlled Drug Delivery* 623–53 (Robinson et al. eds., 2d ed. 1987); Thorpe, *Antibody Carriers of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy: A Review*, in *Monoclonal Antibodies: Biological and Clinical Applications* 475–506 (Pinchera et al. eds., 1985); Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy, in *Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy* 303–16 (Baldwin et al. eds., 1985); Thorpe et al., *Immunol. Rev.* 62:119–58 (1982); патенты США № 5,336,603; 5,622,929; 5,359,046; 5,349,053; 5,447,851; 5,723,125; 5,783,181; 5,908,626; 5,844,095 и 5,112,946; EP 307,434; EP 367,166; EP 394,827; публикации PCT WO 91/06570, WO 96/04388, WO 96/22024, WO 97/34631 и WO 99/04813; Ashkenazi et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 10535–39 (1991); Traunecker et al., *Nature*, 331:84–86 (1988); Zheng et al., *J. Immunol.* 154:5590–600 (1995) и Vil et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:11337–41 (1992)).

**[00188]** Слитные белки можно получать, например, с помощью методик перестановки генов, перестановки мотивов, перестановки экзонов и/или перестановки кодонов (которые в совокупности называются «перестановками ДНК»). Перестановки ДНК можно использовать для изменения активности антител, представленных в настоящем документе, включая, например, антитела с более высокой аффинностью и более низкими скоростями диссоциации (см., например, патенты США № 5,605,793; 5,811,238; 5,830,721; 5,834,252 и 5,837,458; Patten et al., *Curr. Opinion Biotechnol.* 8:724–33 (1997); Narayana, *Trends Biotechnol.* 16(2):76–82 (1998); Hansson et al., *J. Mol. Biol.* 287:265–76 (1999) и Lorenzo and Blasco, *Biotechniques* 24(2):308–13 (1998)). Антитела или кодируемые антитела можно модифицировать посредством случайного мутагенеза при ПЦР сниженной точности, случайной вставки нуклеотидов или другими способами перед рекомбинацией. Полинуклеотид, кодирующий антитело, обеспеченное в настоящем документе, можно рекомбинировать с одним или более компонентами, мотивами, секциями, частями, доменами, фрагментами и т. д. одной или более гетерологичных молекул.

**[00189]** В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложено антитело, конъюгированное со вторым антителом с образованием гетероконъюгата антитела.

**[00190]** В различных вариантах осуществления антитело генетически слито с агентом. Генетическое слияние можно осуществлять посредством введения линкера (например, полипептида) между антителом и агентом. Линкер может представлять собой гибкий линкер.

5 **[00191]** В различных вариантах осуществления антитело генетически конъюгировано с терапевтической молекулой, причем шарнирная область связывает антитело с терапевтической молекулой.

**[00192]** В настоящем документе также предложены способы получения различных слитных белков, предложенных в настоящем документе. Различные способы, описанные в разделе 5.4, также могут использоваться для получения слитных белков, предложенных в настоящем документе.

10 **[00193]** В конкретном варианте осуществления слитный белок, предложенный в настоящем документе, экспрессируют рекомбинантным способом. Для рекомбинантной экспрессии слитного белка, обеспеченного в настоящем документе, может потребоваться конструирование вектор экспрессии, содержащего полинуклеотид, который кодирует белок или его фрагмент. После получения полинуклеотида, кодирующего белок, обеспеченный в настоящем документе, или его фрагмент, вектор продукции молекулы может быть получен с помощью методики рекомбинантной ДНК с применением хорошо известных в данной области методик. Таким образом, способы

15 получения белка посредством экспрессии полинуклеотида, содержащего кодирующую нуклеотидную последовательность, также описаны в настоящем документе. Способы, которые хорошо известны специалистам в данной области, можно применять для конструирования векторов экспрессии, содержащих кодирующие последовательности и соответствующие сигнальные метки для управления транскрипцией и трансляцией. К

20 этим способам относятся, например, методики рекомбинантной ДНК *in vitro*, синтетические методики и генетическая рекомбинация *in vivo*. Кроме того, предложены реплицируемые векторы, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую слитный белок, обеспеченный в настоящем документе, или его фрагмент, или CDR, функционально связанную с промотором.

25 **[00194]** Вектор экспрессии можно переносить в клетку-хозяина с помощью традиционных методик, и трансфицированные клетки впоследствии культивируют с помощью стандартных методик для получения слитного белка, предложенного в настоящем документе. Таким образом, в настоящем документе также обеспечены клетки-хозяева, содержащие полинуклеотид, кодирующий слитный белок,

предложенный в настоящем документе, или его фрагменты, функционально связанные с гетерологичным промотором.

**[00195]** Для экспрессии слитного белка, предложенного в настоящем документе, можно использовать различные системы хозяин-вектор экспрессии. Такие системы хозяин-вектор экспрессии представляют собой несущие среды для получения и последующей очистки интересующих кодирующих последовательностей, но также представляют собой клетки, которые при трансформации или трансфекции соответствующими кодирующими нуклеотидными последовательностями способны экспрессировать слитный белок, обеспеченный в настоящем документе, *in situ*. Сюда, без ограничений, относятся микроорганизмы, как бактерии (например, *E. coli* и *B. subtilis*), трансформированные с применением рекомбинантной ДНК бактериофага, векторов экспрессии плазмидной ДНК или космидной ДНК, содержащих кодирующие последовательности; дрожжи (например, *Saccharomyces Pichia*), трансформированные с применением рекомбинантных векторов экспрессии дрожжей, содержащих кодирующие последовательности; системы клеток насекомых, инфицированных рекомбинантными векторами экспрессии (например, бакуловирусом), содержащими кодирующие последовательности; системы клеток растений, инфицированные рекомбинантными векторами вируса экспрессии (например, вирус мозаики цветной капусты, CaMV, вирус табачной мозаики, TMV) или трансформированные с применением рекомбинантных векторов экспрессии плазмиды (например, плазмиды Ti), содержащими кодирующие последовательности; или системы клеток млекопитающих (например, клетки COS, CHO, ВНК, 293, NS0 и 3T3), несущие рекомбинантные конструкторы экспрессии, содержащие промоторы, полученные из генома клеток млекопитающих (например, металлотioneиновый промотор) или из вирусов млекопитающих (например, поздний промотор аденовируса; промотор вируса осповакцины 7.5К). Для экспрессии рекомбинантного слитного белка можно использовать бактериальные клетки, такие как *Escherichia coli*, или эукариотические клетки, в частности для экспрессии всей молекулы рекомбинантного антитела. Например, клетки млекопитающих, такие как клетки яичника китайского хомячка (CHO), в сочетании с вектором, таким как основной элемент промежуточного раннего гена-промотора цитомегаловируса человека, являются эффективной системой экспрессии антител или их вариантов. В конкретном варианте осуществления экспрессия нуклеотидных последовательностей, кодирующих слитные белки,

предложенные в настоящем документе, регулируют конститутивным промотором, индуцируемым промотором или тканеспецифичным промотором.

**[00196]** В бактериальных системах число векторов экспрессии можно преимущественно выбирать в зависимости от предполагаемого применения экспрессируемого слитного белка. Например, когда предполагается формировать большое количество такого слитного белка для получения фармацевтических композиций слитного белка, может быть желательно использовать векторы, определяющие экспрессию высоких уровней продуктов слитного белка, которые с легкостью поддаются очистке. К таким векторам, без ограничений, относятся экспрессионный вектор *E. coli* pUR278 (Ruther *et al.*, EMBO 12:1791 (1983)), в котором кодирующая антитело последовательность может быть по отдельности лигирована в вектор в рамке с кодирующей областью *lac Z*, чтобы получить слитный белок; векторы pIN (Inouye & Inouye, Nucleic Acids Res. 13:3101–3109 (1985); Van Heeke & Schuster, J. Biol. Chem. 24:5503–5509 (1989)); и т. п. Векторы pGEX можно также применять для экспрессии чужеродных полипептидов в качестве слитных белков с глутатион 5-трансферазой (GST). Как правило, такие слитные белки растворимы и могут быть легко очищены от лизированных клеток путем адсорбции и связывания с матрицей глутатион-агарозных гранул с последующим элюированием в присутствии свободного глутатиона. Векторы pGEX выполнены с возможностью включения тромбина или сайтов расщепления протеазы фактора Ха, чтобы клонированный целевой продукт целевого гена можно было отделять от функциональной группы GST.

**[00197]** В клетках-хозяевах млекопитающих можно использовать целый ряд вирусных систем экспрессии. В тех случаях, когда в качестве вектора экспрессии используют аденовирус, интересующую кодирующую последовательность можно лигировать с комплексом контроля транскрипции / трансляции аденовируса, например с поздним промотором и трехкомпонентной лидерной последовательностью. Этот химерный ген можно впоследствии вставлять в геном аденовируса с помощью рекомбинации *in vitro* или *in vivo*. Вставка неосновной области в вирусный геном (например, области E1 или E3) будет приводить к рекомбинантному вирусу, который жизнеспособен и способен экспрессировать слитный белок в инфицированных клетках-хозяевах (см., например, Logan & Shenk, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:355–359 (1984)). Для эффективной трансляции вставленных кодирующих последовательностей могут также потребоваться специфические сигналы инициации. К этим сигналам относятся кодон инициации ATG и смежные последовательности. Кроме того, для обеспечения

трансляции всей вставки кодон инициации должен быть в фазе с рамкой считывания  
 искомой кодирующей последовательности. Эти экзогенные контрольные сигналы  
 трансляции и кодоны инициации могут иметь самое различное происхождение, как  
 природное, так и синтетическое. Эффективность экспрессии может усиливаться за счет  
 5 включения подходящих энхансерных элементов транскрипции, терминаторов  
 транскрипции и т. д. (см., например, Bittner *et al.*, *Methods in Enzymol.* 153:51–544  
 (1987)).

**[00198]** Кроме того, можно выбирать штаммы клетки-хозяина, которые модулируют  
 экспрессию вставленных последовательностей или регулируют и обеспечивают  
 10 процессинг генного продукта конкретным заданным образом. Подобные модификации  
 (например, гликозилирование) и процессинг (например, расщепление) белковых  
 продуктов могут иметь важное значение для функционирования белка. Различные  
 клетки-хозяева обладают характерными и специфическими механизмами пост-  
 трансляционного процессинга и модификации белков и генных продуктов.

15 Соответствующие штаммы клеток или системы организма-хозяина можно выбирать для  
 обеспечения точной модификации и процессинга экспрессированного чужеродного  
 белка. Для этого можно применять эукариотическую клетку-хозяин, которая обладает  
 клеточным аппаратом для надлежащего процессинга первичного транскрипта,  
 гликозилирования и фосфорилирования генного продукта. К таким клеткам-хозяевам  
 20 млекопитающих могут, без ограничений, относиться клетки CHO, VERY, ВНК, Hela,  
 COS, MDCK, 293, 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 и T47D, NS0 (клетки линии  
 мышины миеломы, которые эндогенно не продуцируют никакие цепи  
 иммуноглобулина), CRL7030 и HsS78Bst.

**[00199]** Стабильную экспрессию можно использовать для долгосрочной  
 25 высокопроизводительной продукции рекомбинантных белков. Например, могут быть  
 сконструированы линии клеток, которые стабильно экспрессируют слитные белки.  
 Вместо использования векторов экспрессии, которые содержат вирусные источники  
 репликации, клетка-хозяин может быть трансформирована с помощью ДНК в условиях  
 регулирования, которое обеспечивается соответствующими элементами контроля  
 30 экспрессии (например, промотором, энхансером, последовательностями,  
 терминаторами транскрипции, сайтами полиаденилирования и пр.) и селективным  
 маркером. После введения экзогенной ДНК клетки, полученные методами генетической  
 инженерии, можно оставлять для роста в течение 1–2 дней в обогащенных средах и  
 впоследствии переносить в избирательные среды. Селективный маркер в

рекомбинантной плазмиде обеспечивает устойчивость к отбору и позволяет клеткам стабильно интегрировать плазмиду в свои хромосомы и расти с образованием очагов, которые затем можно клонировать и размножать в клеточные линии. Данный способ можно преимущественно использовать для конструирования клеточных линий, которые экспрессируют слитный белок. Такие сконструированные линии клеток можно, в частности, использовать для скрининга и оценки композиций, которые прямо или косвенно взаимодействуют со связывающей молекулой.

**[00200]** Можно использовать ряд систем селекции, включая, без ограничений, гены тимидинкиназы вируса простого герпеса (Wigler *et al.*, Cell 11:223 (1977)), гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансферазы (Szybalska & Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:202 (1992)) и аденинфосфорибозилтрансферазы (Lowy *et al.*, Cell 22:8–17 (1980)), которые можно использовать в tk-, hgprr- или aprt-клетках соответственно. Кроме того, устойчивость к антиметаболитам можно применять в качестве основы для селекции следующих генов: *dhfr*, который обеспечивает резистентность к метотрексату (Wigler *et al.*, Natl. Acad. Sci. USA 77:357 (1980); O'Hare *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527 (1981)); *gpt*, который обеспечивает устойчивость к микофеноловой кислоте (Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072 (1981)); neo, который обеспечивает резистентность к аминогликозиду G-418 (Wu and Wu, Biotherapy 3:87–95 (1991); Tolstoshev, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573–596 (1993); Mulligan, Science 260:926–932 (1993) и Morgan and Anderson, Ann. Rev. Biochem. 62:191–217 (1993); May, TIB TECH 11(5):155–215 (1993)); и *hygro*, который обеспечивает резистентность к гигромицину (Santerre *et al.*, Gene 30:147 (1984)). Способы, широко известные в области технологии рекомбинантной ДНК, можно стандартным образом применять для отбора искомого рекомбинантного клона, и такие способы описаны, например, в Ausubel *et al.* (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); Krieglner, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990); и в Chapters 12 and 13, Dracopoli *et al.* (eds.), Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY (1994); Colberre-Garapin *et al.*, J. Mol. Biol. 150:1 (1981), которые полностью включены в настоящий документ путем ссылки.

**[00201]** Уровень экспрессии слитного белка можно увеличивать с помощью вектора амплификации (обзор см. в Bebbington and Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Vol. 3 (Academic Press, New York, 1987)). В случае возможности амплификации маркера в векторной системе, экспрессирующей слитный белок, увеличение уровня ингибитора,

присутствующего в культуре клетки-хозяина, будет приводить к росту числа копий маркерного гена. Так как амплифицируемая область ассоциирована с геном слитного белка, продукция слитного белка также будет расти (Crouse *et al.*, Mol. Cell. Biol. 3:257 (1983)).

5 [00202] Возможна котрансфекция клетки-хозяина множеством векторов экспрессии, обеспеченных в настоящем документе. Векторы могут содержать идентичные селективные маркеры, которые обеспечивают равную экспрессию соответствующих кодирующих полипептидов. В альтернативном варианте осуществления можно использовать единичный вектор, который кодирует и способен экспрессировать  
10 множество полипептидов. Кодирующие последовательности могут содержать кДНК или геномную ДНК.

[00203] После того как молекула слитного белка, предложенного в настоящем документе, была получена посредством рекомбинантной экспрессии, ее можно очищать любым способом, известным специалистам в области очистки полипептидов, например  
15 хроматографией (например, ионообменной, аффинной, в частности по аффинности специфического антигена к белку А, колоночной хроматографией с распределением по размерам и каппа-селективной аффинной хроматографией), центрифугированием, дифференциальной растворимостью или с помощью любой другой стандартной методики для очистки белков. Дополнительно молекулы слитных белков, предложенные  
20 в настоящем документе, могут быть слиты с гетерологичными полипептидными последовательностями, описанными в настоящем документе, или иными, известными специалистам в данной области, для облегчения очистки.

### **Иммуноконъюгаты**

[00204] В некоторых вариантах осуществления в настоящем описании также  
25 предложены иммуноконъюгаты, содержащие любое из антител к IL-1 $\beta$ , описанных в настоящем документе, конъюгированное с одним или более цитотоксическими агентами, такими как химиотерапевтические агенты или лекарственные средства, агенты, ингибирующие рост, токсины (например, белковые токсины, ферментативно активные токсины бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения или их фрагменты) или радиоактивные изотопы.  
30

[00205] В некоторых вариантах осуществления иммуноконъюгат представляет собой конъюгат антитела и лекарственного средства (ADC), в котором антитело конъюгировано с одним или более лекарственными средствами, включая, без ограничений, майтанзиноид (см. патенты США № 5,208,020, 5,416,064 и европейский

патент EP 0 425 235 B1); ауристин, такой как фрагменты лекарственного средства монометилауристин DE и DF (ММАЕ и ММАФ) (см. патенты США № 5,635,483, и 5,780,588 и 7,498,298); доластин; калихимицин или его производное (см. патенты США № 5,712,374, 5,714,586, 5,739,116, 5,767,285, 5,770,701, 5,770,710, 5,773,001 и 5,877,296; Hinman et al., *Cancer Res.* 53:3336–3342 (1993) и Lode et al., *Cancer Res.* 58:2925–2928 (1998)); антрациклин, такой как дауномицин или доксорубицин (см. Kratz et al., *Current Med. Chem.* 13:477–523 (2006); Jeffrey et al., *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 16:358–362 (2006); Torgov et al., *Bioconj. Chem.* 16:717–721 (2005); Nagy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:829–834 (2000); Dubowchik et al., *Bioorg. & Med. Chem. Letters* 12:1529–1532 (2002); King et al., *J. Med. Chem.* 45:4336–4343 (2002) и патент США № 6,630,579); метотрексат; виндезин; таксан, такой как доцетаксел, паклитаксел, ларотаксел, тезетаксел и ортатаксел; трикотецен и СС1065.

**[00206]** В некоторых вариантах осуществления иммуноконъюгат содержит антитело, как описано в настоящем документе, конъюгированное с ферментативно активным токсином или его фрагментом, включая, без ограничений, цепь А дифтерийного токсина, несвязывающие активные фрагменты дифтерийного токсина, цепь А экзотоксина (из *Pseudomonas aeruginosa*), цепь А рицина, цепь А абрина, цепь А модексина, альфа-сарцин, белки *Aleurites fordii*, диантиновые белки, белки *Phytolaca americana* (РАPI, РАPII и РАР-S), ингибитор *Momordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор *Saroparia officinalis*, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин, эномицин и трикотецены.

**[00207]** В некоторых вариантах осуществления иммуноконъюгат содержит антитело, как описано в настоящем документе, конъюгированное с радиоактивным атомом с образованием радиоконъюгата. Для получения радиоконъюгатов существуют разнообразные радиоактивные изотопы. Примеры включают в себя  $At^{211}$ ,  $I^{131}$ ,  $I^{125}$ ,  $Y^{90}$ ,  $Re^{186}$ ,  $Re^{188}$ ,  $Sm^{153}$ ,  $Bi^{212}$ ,  $P^{32}$ ,  $Pb^{212}$  и радиоактивные изотопы Lu. При использовании для детекции радиоконъюгата он может содержать радиоактивный атом для скинтиграфических исследований, например  $^{99m}Tc$  или  $^{112}In$ , или спиновую метку для визуализации с использованием ядерного магнитного резонанса (ЯМР) (также называемой магнитной резонансной визуализацией (МР-визуализация)), например, опять же, йод-123, йод-131, индий-111, фтор-19, углерод-13, азот-15, кислород-17, гадолиний, марганец или железо.

**[00208]** Конъюгаты антитела и цитотоксического агента могут быть получены с использованием разнообразных бифункциональных агентов для соединения белков,

таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитиол)пропионат (SPDP), сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), иминотиолан (IT), бифункциональные производные сложных имидоэфиров (таких как диметиладипимидат HCl), активных сложных эфиров (таких как дисукцинимидилсуберат), альдегиды (такие как глутаральдегид), бис-азидные соединения (такие как бис-(п-азидобензоил)гександиамин), производные бис-диазония (такие как бис-(п-диазонийбензоил)-этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол-2,6-диизоцианат) и соединения с двумя активными фторгруппами (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол). Например, иммунотоксин рицин можно получать так, как описано в Vitetta et al., *Science* 238:1098 (1987). Меченная углеродом-14 1-изоцианатобензил-3-метилдиэтилентриаминпентауксусная кислота (MX-DTPA) является примером хелатирующего агента для конъюгации радионуклида с антителом. См. WO94/11026.

**[00209]** В качестве линкера можно использовать «расщепляемый линкер», который облегчает высвобождение конъюгированного агента в клетке, но в настоящем документе можно также использовать нерасщепляемые линкеры. К линкерам для применения в конъюгатах настоящего описания относятся, без ограничений, кислотно-неустойчивые линкеры (например, гидразоновые линкеры), дисульфидные линкеры, чувствительные к пептидазам линкеры (например, пептидные линкеры, содержащие аминокислоты, например валин и/или цитруллин, такие как валин-цитруллин или фенилаланин-лизин), фотолабильные линкеры, диметильные линкеры, тиозфирные линкеры или гидрофильные линкеры, предназначенные для преодоления мультилекарственной резистентности, опосредованной транспортерами.

**[00210]** Иммуноконъюгаты или ADC по настоящему документу предусматривают, без ограничений, такие конъюгаты, полученные с поперечно-сшивающими реагентами, включая, без ограничений, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, сульфо-EMCS, сульфо-GMBS, сульфо-KMUS, сульфо-MBS, сульфо-SIAB, сульфо-SMCC, сульфо-SMPB и SVSB (сукцинимидил-(4-винилсульфон)бензоат), которые доступны в продаже (например, от Pierce Biotechnology, Inc., г. Рокфорд, штат Иллинойс, США).

**[00211]** В других вариантах осуществления антитела, предложенные в настоящем документе, конъюгированы или рекомбинантно слиты, например, с диагностической молекулой. Такую диагностику и обнаружение можно осуществлять, например, посредством связывания антитела с регистрируемыми веществами, в том числе, без

ограничений, с разными ферментами, например, без ограничений, с пероксидазой хрена, щелочной фосфатазой, бета-галактозидазой или ацетилхолинэстеразой; простетическими группами, такими как, без ограничений, стрептавидин/биотин или авидин/биотин; флуоресцентными материалами, такими как, без ограничений, умбеллиферон, флуоресцеин, флуоресцеинизотиоцианат, родамин, дихлортриазиниламинфлуоресцеин, дансилхлорид или фикоэритрин; люминесцентными материалами, такими как, без ограничений, люминол; биолюминесцентными материалами, такими как, без ограничений, люцифераза, люциферин или экворин; хемилюминесцентными материалами, такими как 225Ac- $\gamma$ -излучающий, Оже-электрон-излучающий,  $\beta$ -излучающий, альфа-излучающий или позитрон-излучающий радиоактивный изотоп.

### 5.3. Полинуклеотиды

**[00212]** В определенных вариантах осуществления в описании предложены полинуклеотиды, которые кодируют настоящие антитела, которые связываются с  $\text{IL-1}\beta$ , и слитные белки, содержащие антитела, которые связываются с  $\text{IL-1}\beta$ , как описано в настоящем документе. Полинуклеотиды в соответствии с описанием могут быть в форме РНК или в форме ДНК. ДНК включает в себя кДНК, геномную ДНК и синтетическую ДНК; и может быть двухцепочечной или одноцепочечной, и в случае одноцепочечной может быть кодирующей цепью или некодирующей (антисенсовой) цепью. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид представлен в форме ДНК. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид представляет собой синтетический полинуклеотид.

**[00213]** Настоящее описание дополнительно относится к вариантам полинуклеотидов, описанных в настоящем документе, причем вариант кодирует, например, фрагменты, аналоги и/или производные антитела описания, связывающего  $\text{IL-1}\beta$ . В определенных вариантах осуществления в настоящем описании предложен полинуклеотид, содержащий полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере около 75% идентична, на по меньшей мере около 80% идентична, на по меньшей мере около 85% идентична, на по меньшей мере около 90% идентична, на по меньшей мере около 95% идентична и в некоторых вариантах осуществления на по меньшей мере около 96%, 97%, 98% или 99% идентична полинуклеотиду, кодирующему антитело описания, связывающее  $\text{IL-1}\beta$ . Подразумевается, что в настоящем документе выражение «полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, которая, например, по меньшей мере на 95%

«идентична» эталонной нуклеотидной последовательности» означает, что нуклеотидная последовательность полинуклеотида идентична эталонной последовательности, за исключением того, что последовательность полинуклеотида может содержать до пяти точечных мутаций на каждые 100 нуклеотидов эталонной нуклеотидной последовательности. Иными словами, чтобы получить полинуклеотид с нуклеотидной последовательностью, которая по меньшей мере на 95% идентична эталонной нуклеотидной последовательности, до 5% нуклеотидов в эталонной последовательности могут быть удалены или заменены на другой нуклеотид, или несколько нуклеотидов, составляющих до 5% от общего числа нуклеотидов в эталонной последовательности, могут быть вставлены в эталонную последовательность. Эти мутации в эталонной последовательности могут происходить в 5' или 3'-концевых положениях эталонной нуклеотидной последовательности или в любом месте между этими двумя концевыми положениями, рассеянными по отдельности между нуклеотидами в эталонной последовательности, или в одной или более непрерывных групп в пределах эталонной последовательности.

**[00214]** Варианты полинуклеотидов могут содержать изменения в кодирующих областях, в некодирующих областях или обеих упомянутых областях. В некоторых вариантах осуществления вариант полинуклеотида содержит изменения, которые формируют молчащие замены, добавления или делеции, но не изменяют свойств или активности кодируемого полипептида. В некоторых вариантах осуществления вариант полинуклеотида содержит молчащие замены, которые не приводят к изменению аминокислотной последовательности полипептида (из-за вырождения генетического кода). Варианты полинуклеотидов могут продуцироваться по разнообразным причинам, например для оптимизации экспрессии кодона для определенной клетки-хозяина (т. е. изменение кодонов в человеческой мРНК на те, которые предпочтительны для бактериальной клетки-хозяина, такой как *E. coli*). В некоторых вариантах осуществления вариант полинуклеотида содержит по меньшей мере одну молчащую мутацию в некодирующей или кодирующей области последовательности.

**[00215]** В некоторых вариантах осуществления вариант полинуклеотида получают для модулирования или изменения экспрессии (или уровни экспрессии) кодируемого полипептида. В некоторых вариантах осуществления вариант полинуклеотида получают для повышения экспрессии кодируемого полипептида. В некоторых вариантах осуществления вариант полинуклеотида получают для подавления экспрессии кодируемого полипептида. В некоторых вариантах осуществления вариант

полинуклеотида характеризуется повышенной экспрессией кодируемого полипептида по сравнению с исходной полинуклеотидной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления вариант полинуклеотида характеризуется пониженной экспрессией кодируемого полипептида по сравнению с исходной полинуклеотидной последовательностью.

**[00216]** Кроме того, представлены векторы, содержащие молекулы нуклеиновой кислоты, описанные в настоящем документе. В варианте осуществления молекулы нуклеиновых кислот можно встраивать в рекомбинантный вектор экспрессии. В настоящем описании обеспечены рекомбинантные векторы экспрессии, содержащие любую из нуклеиновых кислот по описанию. В настоящем документе термин «рекомбинантный вектор экспрессии» означает генетически модифицированный олигонуклеотидный или полинуклеотидный конструкт, который обеспечивает экспрессию мРНК, белка, полипептида или пептида клеткой-хозяином, когда конструкт содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую мРНК, белок, полипептид или пептид, а вектор приводят в контакт с клеткой в условиях, достаточных для экспрессии мРНК, белка, полипептида или пептида внутри клетки. Описанные в настоящем документе векторы не встречаются в природе в целом; однако части векторов могут быть природного происхождения. Описанные рекомбинантные векторы экспрессии могут содержать нуклеотиды любого типа, включая, без ограничений, ДНК и РНК, которые могут быть одноцепочечными или двухцепочечными, синтезированными или частично полученными из природных источников и которые могут содержать природные, неприродные или измененные нуклеотиды.

Рекомбинантные векторы экспрессии могут содержать межнуклеотидные связи природного происхождения или неприродного происхождения или оба типа связей.

Неприродные или измененные нуклеотиды или межнуклеотидные связи не препятствуют транскрипции или репликации вектора.

**[00217]** В варианте осуществления рекомбинантный вектор экспрессии описания может быть любым приемлемым рекомбинантным вектором экспрессии и может быть использован для трансформации или трансфекции любого приемлемого организма-хозяина. Приемлемые векторы включают в себя векторы, предназначенные для размножения и экспансии или для экспрессии, или и того, и другого, такие как плазмиды и вирусы. Вектор может быть выбран из группы, состоящей из серии pUC (Fermentas Life Sciences, г. Глен Берни, штат Мэриленд, США), серии pBluescript (Stratagene, г. Ла-Холья, штат Калифорния, США), серии pET (Novagen, г. Мэдисон,

штат Висконсин, США), серии pGEX (Pharmacia Biotech, г. Уппсала, Швеция) и серии pEX (Clontech, г. Пало-Альто, штат Калифорния, США). Можно использовать векторы бактериофагов, такие как  $\lambda$ GT10,  $\lambda$ GT11,  $\lambda$ EMBL4 и  $\lambda$ NM1149,  $\lambda$ ZapII (Stratagene).

5 Примеры векторов экспрессии растений включают в себя pBI01, pBI01.2, pBI121, pBI101.3 и pBIN19 (Clontech). Примеры векторов экспрессии на животных включают в себя pEUK-CI, pMAM и pMAMneo (Clontech). Рекомбинантный вектор экспрессии может быть вирусным вектором, например ретровирусным вектором, например гамма-ретровирусным вектором.

10 **[00218]** В варианте осуществления рекомбинантные векторы экспрессии получают с применением стандартных методик рекомбинантной ДНК, описанных, например, в Sambrook et al., выше, и Ausubel et al., выше. Могут быть получены конструкторы векторов экспрессии, которые являются кольцевыми или линейными, чтобы они содержали систему репликации, функционирующую в прокариотической или эукариотической клетке-хозяине. Системы репликации могут быть получены, например, из ColE1, SV40, 2 $\mu$  плазмиды,  $\lambda$ , вируса бычьей папилломы и т. п.

15 **[00219]** Рекомбинантный вектор экспрессии может содержать регуляторные последовательности, такие как иницирующие и терминирующие кодоны транскрипции и трансляции которые специфичны для типа хозяина (например, бактерии, растения, гриба или животного), в который при необходимости должен быть введен вектор, при этом учитывается, основан ли вектор на ДНК или РНК.

20 **[00220]** Рекомбинантный вектор экспрессии может включать в себя один или более маркерных генов, которые позволяют отбирать трансформированные или трансфицированные организмы-хозяева. Маркерные гены включают в себя гены резистентности к биоцидам, например гены резистентности к антибиотикам, тяжелым металлам и т. д., комплементации в ауксотрофном хозяине для обеспечения прототрофности и т. п. Приемлемые маркерные гены для описанных векторов экспрессии включают в себя, например, гены резистентности к неомицину/G418, гены резистентности к гистидинолу X, гены резистентности к гистидинолу, гены резистентности к тетрациклину и гены резистентности к ампициллину.

25 **[00221]** Рекомбинантный вектор экспрессии может включать в себя нативный или нормативный промотор, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью описания. Выбор промоторов, например сильных, слабых, тканеспецифичных, индуцируемых и специфичных для развития промоторов, находится в рамках квалификации обычного специалиста в данной области.

Аналогичным образом комбинирование нуклеотидной последовательности с промотором также находится в рамках квалификации специалиста в данной области техники. Промотор может представлять собой невирусный промотор или вирусный промотор, например промотор цитомегаловируса (CMV), промотор RSV, промотор SV40 или промотор, присутствующий в длинном концевом повторе вируса мышинных стволовых клеток.

**[00222]** Рекомбинантные векторы экспрессии могут быть разработаны либо для транзientной экспрессии, либо для стабильной экспрессии, либо для обоих типов.

Кроме того, рекомбинантные векторы экспрессии могут быть получены для конститутивной экспрессии или для индуцируемой экспрессии.

**[00223]** Дополнительно могут быть созданы рекомбинантные векторы экспрессии, включающие в себя суицидальный ген. В настоящем документе термин «суицидальный ген» относится к гену, который заставляет клетку, экспрессирующую суицидальный ген, погибать. Суицидальный ген может быть геном, который придает чувствительность к агенту, например лекарственному средству, клетке, в которой экспрессируется ген, и заставляет клетку погибать, когда клетку приводят в контакт с агентом или когда она подвергается его воздействию. Суицидальные гены известны в данной области и включают в себя, например, ген тимидинкиназы (ТК) вируса простого герпеса (HSV), цитозиндезаминазу, пурин-нуклеозидфосфорилазу и нитроредуктазу.

**[00224]** В определенных вариантах осуществления полинуклеотид выделяют. В определенных вариантах осуществления полинуклеотид является по существу чистым.

**[00225]** Кроме того, обеспечены клетки-хозяева, содержащие молекулы нуклеиновой кислоты, описанные в настоящем документе. Клеткой-хозяина может быть любая клетка, которая содержит гетерологичную нуклеиновую кислоту. Гетерологичная нуклеиновая кислота может представлять собой вектор (например, экспрессионный вектор). Например, клеткой-хозяином может быть клетка любого организма, которая отбирается, модифицируется, трансформируется, выращивается, используется или проходит любые манипуляции для продуцирования клеткой вещества, например экспрессии клеткой гена, последовательности ДНК или РНК, белка или фермента.

Может определяться подходящая клетка-хозяин. Например, клетка-хозяин может быть выбрана на основании каркаса вектора и желаемого результата. В качестве примера в прокариотическую клетку можно вводить плазмиду или космиду для репликации нескольких типов векторов. В качестве клеток-хозяев для репликации и/или экспрессии вектора можно использовать бактериальные клетки, такие как, без ограничений, DH5 $\alpha$ ,

JM109 и KCB, SURE® Competent Cells и SOLOPACK Gold Cells. Кроме того, в качестве клеток-хозяев для фаговых вирусов можно использовать бактериальные клетки, например *E. coli* LE392. К эукариотическим клеткам, которые можно использовать в качестве клеток-хозяев, относятся, без ограничений, дрожжи (например, YPH499, YPH500 и YPH501), клетки насекомых и млекопитающих. Примеры эукариотических клеток-хозяев млекопитающих для репликации и/или экспрессии вектора, без ограничений, включают в себя HeLa, NIH3T3, Jurkat, 293, COS, Saos, PC12, SP2/0 (American Type Culture Collection (ATCC), г. Манассас, штат Вирджиния, CRL-1581), NS0 (European Collection of Cell Cultures (ECACC), г. Солсбери, Уилтшир, Великобритания, ECACC № 85110503), FO (ATCC CRL-1646) и Ag653 (ATCC CRL-1580) мышинные клеточные линии. Примером клеточной линии миеломы человека является U266 (ATCC CRL-TIB-196). Другие используемые клеточные линии включают в себя линии, полученные из клеток яичника китайского хомячка (CHO), например CHO-K1SV (Lonza Biologics, г. Уолкерсвилл, штат Мэриленд, США), CHO-K1 (ATCC CRL-61) или DG44.

#### 5.4. Получение антител и способ их изготовления

**[00226]** Описаны способы получения антител. См., например, Els Pardon et al, *Nature Protocol*, 9(3): 674 (2014). Антитела (такие как фрагменты scFv) могут быть получены с использованием известных в данной области способов, например посредством иммунизации представителей семейства *верблюдовых* (таких как верблюд или лама) и получения из них гибридом или посредством клонирования библиотеки антител с использованием известных в данной области методик молекулярной биологии и последующего отбора с помощью ELISA отдельных клонов неселектируемых библиотек или посредством использования фагового дисплея.

**[00227]** Антитела, предложенные в настоящем документе, могут продуцироваться посредством культивирования клеток, трансформированных или трансфицированных вектором, содержащим нуклеиновые кислоты, кодирующие антитело. Полинуклеотидные последовательности, кодирующие полипептидные компоненты антитела настоящего описания могут быть получены с применением стандартных рекомбинантных методик. Желаемые полинуклеотидные последовательности можно выделять и секвенировать из клеток, продуцирующих антитела, например клеток гибридомы или В-клеток. Альтернативно полинуклеотиды могут быть синтезированы с помощью синтезатора нуклеотидов или методик ПЦР. После получения последовательности кодирующие полипептиды вставляют в рекомбинантный вектор,

способный к репликации и экспрессии гетерологичных полинуклеотидов в клетках-хозяевах. Для целей настоящего описания можно использовать множество векторов, доступных и известных в данной области техники. Выбор подходящего вектора в основном зависит от размера нуклеиновых кислот, которые вставляют в вектор, и конкретной клетки-хозяина, трансформируемой вектором. К клеткам-хозяина, приемлемым для экспрессии антител настоящего описания, относятся прокариоты, такие как археобактерии и эубактерии, в том числе грамотрицательные или грамположительные организмы, эукариотические микробы, такие как мицелиальные грибы или дрожжи, клетки беспозвоночных, такие как клетки насекомых или растений, а также клетки позвоночных, такие как линии клеток-хозяев млекопитающих. Клетки-хозяева трансформируют вышеописанными векторами экспрессорами и культивируют в традиционной питательной среде, модифицированной надлежащим образом, для индуцирования промоторов, выбора трансформантов или амплификации генов, кодирующих желаемые последовательности. Антитела, продуцируемые клетками-хозяина, очищают с помощью стандартных способов очистки белков, известных специалистам в области.

**[00228]** Способы продукции антител, включая конструирование вектора, экспрессию и очистку, более подробно описаны в Plückthun *et al.*, Antibody Engineering: Producing antibodies in Escherichia coli: From PCR to fermentation 203-52 (McCafferty *et al.* eds., 1996); Kwong and Rader, *E. coli Expression and Purification of Fab Antibody Fragments, in Current Protocols in Protein Science* (2009); Tachibana and Takekoshi, *Production of Antibody Fab Fragments in Escherichia coli, in Antibody Expression and Production* (Al-Rubeai ed., 2011); и Therapeutic Monoclonal Antibodies: From Bench to Clinic (An ed., 2009).

**[00229]** Конечно же, подразумевается, что альтернативные способы, которые хорошо известны специалистам в области, можно использовать для получения антител к IL-1 $\beta$ . Например, соответствующая аминокислотная последовательность или ее части могут быть получены прямым пептидным синтезом с использованием твердофазных методик (см., например, Stewart *et al.*, Solid-Phase Peptide Synthesis (1969) и Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85:2149–54 (1963)). *In vitro* синтез белка можно выполнять вручную или с применением автоматических методик. Разные участки антитела к IL-1 $\beta$  могут химически синтезироваться отдельно и комбинироваться с помощью химических или ферментативных способов, чтобы получить искомое антитело к IL-1 $\beta$ . Альтернативно антитела можно очищать от клеток или биологических жидкостей, таких как молоко,

трансгенного животного, сконструированного для экспрессии антитела, как это описано, например, в патентах США № 5,545,807 и 5,827,690.

### **Поликлональные антитела**

5 [00230] Поликлональные антитела, как правило, получают у животных в результате многократных подкожных (п/к) или внутрибрюшинных (в/б) инъекций соответствующего антигена и адьюванта. Может быть полезно конъюгировать соответствующий антиген с белком, который является иммуногенным у видов, подлежащих иммунизации, например гемоцианином лимфы улитки (KLH), сывороточным альбумином, бычьим тиреоглобулином или соевым ингибитором

10 трипсина, с использованием бифункционального или дериватирующего агента, например сложного эфира малеимидобензоила и сульфосукцинимиды (конъюгация через остатки цистеина), N-гидроксисукцинимиды (через остатки лизина), глутаральдегида, янтарного ангидрида,  $\text{SOCl}_2$  или  $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ , где R и  $\text{R}^1$  независимо представляют собой низшие алкильные группы. Примеры адьювантов, которые могут

15 использоваться, включают в себя полный адьювант Фрейнда и адьювант MPL-TDM (монофосфорил-липид А, синтетический дикориномиколят трегалозы). Протокол иммунизации может быть выбран специалистом в данной фрагмента техники без излишних экспериментов.

20 [00231] Например, животных иммунизируют против антигена, иммуногенных конъюгатов или производных посредством объединения, например, 100 мкг или 5 мкг белка или конъюгата (для кроликов или мышей соответственно) с 3 объемами полного адьюванта Фрейнда и внутрикожной инъекции этого раствора во множестве мест. Через месяц животным вводят бустерные инъекции от 1/5 до 1/10 исходного количества пептида или конъюгата в полном адьюванте Фрейнда посредством подкожной

25 инъекции во множестве мест. Через семь–четырнадцать дней у животных берут кровь и анализируют сыворотку на титр антител. Животным вводят бустерные инъекции до достижения титром плато. Конъюгаты также могут быть получены в культуре рекомбинантных клеток в виде слитных белков. Кроме того, для усиления иммунного ответа подходят агрегирующие агенты, такие как квасцы.

### 30 **Моноклональные антитела**

[00232] Моноклональные антитела получают из популяции по существу гомогенных антител, т. е. отдельные антитела, составляющие популяцию, являются идентичными, за исключением возможных мутаций и/или посттрансляционных модификаций природного происхождения (например, изомеризации, амидирования), которые могут

присутствовать в малых количествах. Таким образом, определение «моноклональный» указывает, что антитело не является смесью отдельных антител.

**[00233]** Например, моноклональные антитела могут быть получены способом с гибридомой, впервые описанным в Kohler *et al.*, *Nature*, 256:495 (1975), или могут быть  
5 получены способами рекомбинантной ДНК (патент США № 4,816,567).

**[00234]** В способе с гибридомой подходящее животное-хозяина иммунизируют для извлечения лимфоцитов, которые продуцируют или способны продуцировать антитела, которые будут специфически связывать белок, используемый для иммунизации.

Альтернативно лимфоциты могут быть иммунизированы *in vitro*. Затем выполняют  
10 слияние лимфоцитов с клетками миеломы с использованием приемлемого вызывающего слияние агента, такого как полиэтиленгликоль, с образованием клетки гибридомы (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59–103 (Academic Press, 1986).

**[00235]** Иммунизирующий агент будет, как правило, включать в себя антигенный  
15 белок или его гибридный вариант. Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press (1986), pp. 59–103. Иммутизированные клеточные линии обычно представляют собой трансформированные клетки млекопитающих.

Полученные таким образом клетки гибридомы культивируют в приемлемой культуральной среде, которая предпочтительно содержит одно или более веществ,  
20 ингибирующих рост или выживаемость неслитых родительских клеток миеломы.

Предпочтительными иммутизированными клетками миеломы являются линии, которые обеспечивают эффективное слияние, поддерживают стабильный высокий уровень продукции антитела выбранными антителопродуцирующими клетками и являются восприимчивыми к среде, такой как среда НАТ.

**[00236]** Культуральная среда, в которой выращивают клетки гибридомы, оценивают  
25 на продукцию моноклональных антител, направленных против антигена.

Культуральную среду, в которой культивируют клетки гибридомы, анализируют на наличие моноклональных антител, направленных против требуемого антигена. Такие методики и анализы известны в данной области. Например, аффинность связывания  
30 можно определить с помощью анализа Скатчарда, описанного в Munson *et al.*, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

**[00237]** После идентификации клеток гибридомы, которые продуцируют антитела требуемой специфичности, аффинности и/или активности, клоны могут быть субклонированы с помощью процедур серийного разведения и выращены

стандартными способами (см. Goding выше). Приемлемые культуральные среды для этой цели включают в себя, например, среду D-MEM или RPMI-1640. Кроме того, клетки гибридомы могут быть выращены *in vivo* в виде опухолей у млекопитающего.

**[00238]** Моноклональные антитела, секретируемые субклонами, соответствующим образом отделяют от культуральной среды, асцитической жидкости или сыворотки стандартными методами очистки иммуноглобулина, такими как, например, хроматография с белком А-сефарозой, гидроксиапатитом, гель-электрофорез, диализ или аффинная хроматография.

**[00239]** Моноклональные антитела могут также быть получены способами рекомбинантной ДНК, такими как описанные в патенте США № 4,816,567, а также как описано выше. ДНК, кодирующая моноклональные антитела, может быть легко выделена и секвенирована с помощью стандартных методов (например, с помощью олигонуклеотидных зондов, которые способны специфически связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи мышиных антител). Клетки гибридомы являются предпочтительным источником такой ДНК. После выделения ДНК может быть помещена в экспрессионные векторы, которые затем трансфицируют в клетки-хозяева, например клетки *E. coli*, клетки обезьяны COS, клетки яичника китайского хомячка (СНО) или клетки миеломы, которые сами по себе не продуцируют иммуноглобулин, чтобы синтезировать моноклональные антитела в таких рекомбинантных клетках-хозяевах. Обзорные статьи о рекомбинантной экспрессии в бактериях ДНК, кодирующей антитело, включают в себя Skerra *et al.*, *Curr. Opinion in Immunol.*, 5:256–262 (1993) и Pliickthun, *Immunol. Revs.* 130:151–188 (1992).

**[00240]** В дополнительном варианте осуществления антитела могут быть выделены из фаговых библиотек антител, созданных методиками, описанными в McCafferty *et al.*, *Nature*, 348:552–554 (1990). Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624–628 (1991) и Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581–597 (1991). В последующих публикациях описана продукция высокоаффинных (в наномолярном диапазоне) человеческих антител посредством перестановки цепей (Marks *et al.*, *Bio/Technology*, 10:779–783 (1992)), а также комбинаторного инфицирования и рекомбинации *in vivo* в качестве стратегии конструирования очень больших фаговых библиотек (Waterhouse *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 21:2265–2266 (1993)). Таким образом, эти методики представляют собой реальные альтернативы традиционным методикам с использованием гибридом, продуцирующих моноклональные антитела, для выделения моноклональных антител.

[00241] ДНК также может быть модифицирована, например, путем замены кодирующей последовательности (патент США № 4,816,567; Morrison, *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81:6851 (1984)) или посредством ковалентного присоединения к кодирующей последовательности всей или части последовательности, кодирующей не относящийся к иммуноглобулину полипептид. Такие неиммуноглобулиновые полипептиды можно подвергнуть замещению для создания химерного двухвалентного антитела, содержащего один антигенсвязывающий сайт, обладающий специфичностью к одному антигену, и другой антигенсвязывающий сайт, обладающий специфичностью к другому антигену.

10 [00242] Химерные или гибридные антитела также можно получать *in vitro* с использованием известных в области химии синтетических белков способов, включая способы, включающие в себя поперечно-сшивающие агенты. Например, иммунотоксины могут быть сконструированы с помощью реакции дисульфидного обмена или посредством образования тиоэфирной связи. Примеры подходящих для этой цели реагентов включают в себя имиотиолат и метил-4-меркаптобутиримидат.

#### **Рекомбинантная продукция в прокариотических клетках**

[00243] Полинуклеотидные последовательности, кодирующие антитела по настоящему описанию, могут быть получены с использованием стандартных рекомбинантных методик. Требуемые полинуклеотидные последовательности можно выделять и секвенировать из клеток, продуцирующих антитела, например из клеток гибридомы. Альтернативно полинуклеотиды могут быть синтезированы с помощью синтезатора нуклеотидов или методик ПЦР. После получения последовательности, кодирующие полипептиды, вставляют в рекомбинантный вектор, способный к репликации и экспрессии гетерологичных полинуклеотидов в прокариотических клетках-хозяевах. Для целей настоящего описания можно использовать множество векторов, доступных и известных в данной области техники. Выбор подходящего вектора в основном зависит от размера нуклеиновых кислот, которые вставляют в вектор, и конкретной клетки-хозяина, трансформируемой вектором. Каждый вектор содержит различные компоненты в зависимости от его функции (амплификация или экспрессия гетерологичного полинуклеотида или и то, и другое) и его совместимости с конкретной клеткой-хозяином, в которой он находится. Компоненты вектора, как правило, включают в себя, без ограничений, точку начала репликации, ген селективного маркера, промотор, сайт связывания с рибосомой (RBS), сигнальную

последовательность, гетерологичную полинуклеотидную вставку и последовательность терминации транскрипции.

**[00244]** В общем случае плазмидные векторы, содержащие репликон и управляющие последовательности, которые получают из видов, совместимых с клеткой-хозяином, используют в связи с этими хозяевами. Обычно вектор несет участок репликации, а также маркерные последовательности, которые способны обеспечить отбор по фенотипу трансформированных клеток. Например, *E. coli* обычно трансформируют с использованием рBR322, плазмиды, полученной из вида *E. coli*. Примеры производных рBR322, используемых для экспрессии конкретных антител, подробно описаны Carter *et. al.*, в патенте США № 5,648,237.

**[00245]** Кроме того, фаговые векторы, содержащие репликон и управляющие последовательности, которые совместимы с микроорганизмом-хозяином, можно использовать в качестве трансформирующих векторов вместе с этими хозяевами. Например, бактериофаг, такой как GEM™-11, можно использовать для создания рекомбинантного вектора, который можно использовать для трансформации восприимчивых клеток-хозяев, таких как *E.coli* LE392.

**[00246]** Экспрессионный вектор в соответствии с настоящей заявкой может содержать две или более пар промотор-цистрон, кодирующих каждый из полипептидных компонентов. Промотор представляет собой нетранслируемую регуляторную последовательность, расположенную ближе к 5'-концу от цистрона, которая модулирует его экспрессию. Прокариотические промоторы, как правило, делятся на два класса: индуцибельные и конститутивные. Индуцибельный промотор представляет собой промотор, который инициирует увеличение уровней транскрипции управляемого им цистрона в ответ на изменения состояния культуры, например появление или исчезновение питательного вещества или изменение температуры.

**[00247]** Хорошо известно большое число промоторов, распознаваемых различными потенциальными клетками-хозяевами. Выбранный промотор может быть функционально связан с цистронной ДНК, кодирующей настоящее антитело, путем удаления промотора из исходной ДНК посредством расщепления рестрикционным ферментом и вставки выделенной промоторной последовательности в вектор согласно настоящей заявке. Для управления амплификацией и/или экспрессией целевых генов можно использовать как нативную последовательность промотора, так и множество гетерологичных промоторов. В некоторых вариантах осуществления используются гетерологичные промоторы, так как они, как правило, обеспечивают увеличенную

транскрипцию и более высокий выход экспрессируемого целевого гена по сравнению с нативным целевым полипептидным промотором.

**[00248]** Промоторы, приемлемые для применения с прокариотическими хозяевами, включают в себя промотор PhoA, галактамазные и лактозные промоторные системы, триптофановую (*trp*) промоторную систему и гибридные промоторы, такие как промотор *tac* или *trc*. Однако также подходят и другие промоторы, которые функционируют в бактериях (например, другие известные бактериальные или фаговые промоторы). Их нуклеотидные последовательности опубликованы, что позволяет квалифицированному специалисту эффективно лигировать их к цистронам, кодирующим целевой пептид (Siebenlist *et al. Cell* 20: 269 (1980)) с использованием линкеров или адаптеров для обеспечения любыми необходимыми сайтами рестрикции.

**[00249]** В одном аспекте каждый цистрон внутри рекомбинантного вектора содержит компонент сигнальной последовательности секреции, который направляет транслокацию экспрессированных полипептидов по мембране. Как правило, сигнальная последовательность может представлять собой компонент вектора или она может быть частью целевой полипептидной ДНК, которая вставляется в вектор. Сигнальная последовательность, выбранная для целей данного изобретения, должна представлять собой последовательность, которая распознается и процессируется (т. е. расщепляется сигнальной пептидазой) клеткой-хозяином. В случае прокариотических клеток-хозяев, которые не распознают и не процессируют сигнальные последовательности, кодирующие гетерологичные полипептиды, сигнальную последовательность можно заместить прокариотической сигнальной последовательностью, выбранной, например, из группы, состоящей из лидерных последовательностей щелочной фосфатазы, пенициллиназы, *Irr* или термостабильного энтеротоксина II, *LamB*, *PhoE*, *PelB*, *OmpA* и *MVP*.

**[00250]** В некоторых вариантах осуществления продукция антител согласно настоящему описанию может происходить в цитоплазме клетки-хозяина, и, следовательно, для этого не требуется наличие сигнальных последовательностей секреции в каждом цистроне. Определенные штаммы-хозяева (например, штаммы *E. coli* *trxB*<sup>-</sup>) создают в цитоплазме условия, благоприятные для образования дисульфидных связей, таким образом способствуя правильной укладке и сборке экспрессированных субъединиц белка.

**[00251]** Прокариотические клетки-хозяева, приемлемые для экспрессии антител настоящего описания, включают в себя архебактерии и эубактерии, например

грамположительные и грамотрицательные организмы. Примеры используемых бактерий включают в себя *Escherichia* (например, *E. coli*), *Bacilli* (например, *B. subtilis*), *Enterobacteria*, виды *Pseudomonas* (например, *P. aeruginosa*), *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescans*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Shigella*, *Rhizobia*, *Vitreoscilla* или *Paracoccus*. В некоторых вариантах осуществления используются грамотрицательные клетки. В одном варианте осуществления клетки *E. coli* используются в качестве хозяев. Примеры штаммов *E. coli* включают в себя штамм W3110 (Bachmann, *Cellular and Molecular Biology*, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), pp. 1190–1219; номер в ATCC 27,325) и его производные, включая штамм 33D3, имеющий генотип W3110 AfhuA (AtonA) ptr3 lac Iq lacL8 AompT A(nmpc-fepE) degP41 kan<sup>R</sup> (патент США № 5,639,635). Также приемлемы и другие штаммы и их производные, такие как *E. coli* 294 (ATCC 31,446), *E. coli* B, *E. coli* 1776 (ATCC 31,537) и *E. coli* RV308 (ATCC 31,608). Эти примеры имеют иллюстративный, а не ограничительный характер. Способы конструирования производных любых из вышеперечисленных бактерий, имеющих установленные генотипы, известны в данной области и описаны, например, в Bass *et al.*, *Proteins*, 8:309–314 (1990). Как правило, необходимо отбирать подходящие бактерии, учитывая воспроизводимость репликона в клетках бактерии. Например, виды *E. coli*, *Serratia* или *Salmonella* можно соответствующим образом использовать в качестве хозяина, если в качестве источника репликона используют хорошо известные плазмиды, такие как pBR322, pBR325, pACYC177 или pKN410.

**[00252]** Как правило, клетка-хозяин должна секретировать минимальные количества протеолитических ферментов, и в клеточную культуру может быть желательно включить дополнительные ингибиторы протеазы.

**[00253]** Клетки-хозяева трансформируют вышеописанными векторами экспрессорами и культивируют в традиционной питательной среде, модифицированной надлежащим образом, для индуцирования промоторов, выбора трансформантов или амплификации генов, кодирующих желаемые последовательности. Трансформация означает внедрение ДНК в прокариотическую клетку-хозяина так, чтобы ДНК была реплицируемой, либо в качестве экстрахромосомного элемента, либо в качестве интегрированного в хромосому элемента. В зависимости от используемой клетки-хозяина трансформацию выполняют с использованием стандартных методик, подходящих для таких клеток. В случае бактериальных клеток, которые содержат плотную клеточную стенку, как правило, выполняют обработку кальцием с использованием хлорида кальция. В другом способе трансформации используют

полиэтиленгликоль/ДМСО. Еще одной используемой методикой является электропорация.

5 **[00254]** Прокариотические клетки, используемые для продуцирования антител настоящей заявки, выращивают в среде, известной в данной области и приемлемой для культуры выбранных клеток-хозяев. Примеры приемлемых сред включают в себя бульон Лурия (LB) плюс необходимые питательные добавки. В некоторых вариантах осуществления среды также содержат селективный агент, выбранный на основе конструирования экспрессионного вектора, для обеспечения селективного роста прокариотических клеток, содержащих экспрессионный вектор. Например, ампициллин добавляют в среды для роста клеток, экспрессирующих ген устойчивости к ампициллину.

15 **[00255]** Любые необходимые добавки помимо источников углерода, азота и неорганического фосфата также можно включать в подходящих концентрациях при введении по отдельности или в виде смеси с другой добавкой или средой, такой как комплексный источник азота. Необязательно культуральная среда может содержать один или более восстановителей, выбранных из группы, состоящей из глутатиона, цистеина, цистамина, тиогликолята, дитиозеритритола и дитиотреитола. Прокариотические клетки-хозяева культивируют при подходящих температурах и значениях pH.

20 **[00256]** При использовании в экспрессионном векторе настоящей заявки индуцибельного промотора экспрессию белка индуцируют в условиях, приемлемых для активации промотора. В одном аспекте настоящей заявки для управления транскрипцией полипептидов используют промоторы PhoA. Соответственно, трансформированные клетки-хозяева культивируют для индукции в среде с ограниченным содержанием фосфата. Предпочтительно среда с ограниченным содержанием фосфата представляет собой среду C.R.A.P (см., например, Simmons *et al.*, *J. Immunol. Methods* 263:133–147 (2002)). В зависимости от используемого конструкта вектора можно использовать множество других индукторов, известных в данной области.

30 **[00257]** Экспрессированные антитела настоящего описания секретируются в периплазму клеток-хозяев, из которой их выделяют. Выделение белка обычно происходит с разрушением микроорганизма, как правило, с помощью таких средств, как осмотический шок, ультразвуковая обработка или лизис. После разрушения клеток остатки клеток или цельные клетки можно удалить посредством центрифугирования

или фильтрации. Белки можно дополнительно очистить, например, с помощью аффинной хроматографии на смоле. Альтернативно белки можно перенести в культуральную среду и выделить из нее. Клетки можно удалить из культуры и фильтруемого супернатанта культуры и сконцентрировать для дополнительной очистки продуцированных белков. Экспрессированные полипептиды можно дополнительно выделить и идентифицировать с использованием широко известных способов, таких как электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) и вестерн-блоттинг.

**[00258]** Альтернативно продукцию белков выполняют в большом количестве способом ферментации. Для продукции рекомбинантных белков используют различные крупномасштабные процедуры периодической ферментации с добавлением субстрата. Для улучшения производственного выхода и качества антител настоящего описания можно модифицировать различные условия ферментирования. Например, было продемонстрировано, что белки-шапероны способствуют правильному фолдингу и увеличивают растворимость гетерологичных белков, продуцируемых в бактериальных клетках-хозяевах. Chen *et al.* *J Bio Chem* 274:19601–19605 (1999); патент США № 6,083,715; патент США № 6,027,888; Bothmann and Pluckthun, *J. Biol. Chem.* 275:17100–17105 (2000); Ramm and Pluckthun, *J. Biol. Chem.* 275:17106–17113 (2000); Arie *et al.*, *Mol. Microbiol.* 39:199–210 (2001).

**[00259]** Для минимизации протеолиза экспрессированных гетерологичных белков (в особенности восприимчивых к протеолизу) в настоящем изобретении можно использовать некоторые штаммы-хозяева, не содержащие протеолитических ферментов, как описано, например, в патенте США № 5,264,365; патенте США № 5,508,192; Hara *et al.*, *Microbial Drug Resistance*, 2:63–72 (1996). Штаммы *E. coli*, дефицитные по протеолитическим ферментам и трансформированные плазмидами, сверхэкспрессирующими один или более белков-шаперонов, могут использоваться в качестве клеток-хозяев в системе экспрессии, кодирующей антитела настоящей заявки.

**[00260]** Антитела, продуцированные в соответствии с настоящим документом, можно дополнительно очистить для получения препаратов, которые являются по существу гомогенными, с целью дополнительных анализов и использования. Можно применять стандартные способы очистки белков, известные в данной области. Следующие процедуры представляют собой примеры приемлемых процедур очистки: фракционирование на иммуноаффинных или ионообменных колонках, осаждение этанолом, обращенно-фазовая ВЭЖХ, хроматография на диоксиде кремния или на катионообменной смоле, например диэтиламиноэтилен (DEAE),

хроматофокусирование, ДСН-ПААГ, осаждение сульфатом аммония и гель-фильтрация с использованием, например, сефадекса G-75. Белок А, иммобилизованный на твердой фазе, например, может использоваться в некоторых вариантах осуществления для иммуноаффинной очистки связывающих молекул по настоящему описанию. Твердая фаза, на которой иммобилизован белок А, представляет собой предпочтительно колонку, содержащую поверхность из стекла или диоксида кремния, более предпочтительно колонку из стекла с заданным размером пор или колонку из кремниевой кислоты. В некоторых вариантах осуществления колонка была покрыта реагентом, таким как глицерин, для предотвращения неспецифического прилипания загрязняющих веществ. Затем твердую фазу промывали для удаления загрязняющих веществ, неспецифически связанных с твердой фазой. В конечном итоге представляющие интерес антитела извлекали из твердой фазы посредством элюирования.

#### **Рекомбинантная продукция в эукариотических клетках**

15 [00261] В случае эукариотической экспрессии компоненты вектора, как правило, включают в себя, без ограничений, одно или более из сигнальной последовательности, точки начала репликации, одного или более маркерных генов, энхансерного элемента, промотора и последовательности терминации транскрипции.

20 [00262] Вектор, используемый в эукариотическом хозяине, также может вставку, которая кодирует сигнальную последовательность или другой полипептид, имеющий специфический сайт расщепления на N-конце зрелого белка или полипептида. Выбранная гетерологичная сигнальная последовательность предпочтительно представляет собой последовательность, которая распознается и процессируется (т. е. расщепляется сигнальной пептидазой) клеткой-хозяином. При экспрессии в клетке млекопитающего доступны сигнальные последовательности млекопитающего, а также вирусные секреторные лидерные последовательности, например сигнальная последовательность gD вируса простого герпеса. ДНК такой области-предшественника можно лигировать в рамке считывания к ДНК, кодирующей антитела согласно настоящей заявке.

30 [00263] Как правило, компонент начала репликации не нужен для экспрессионных векторов млекопитающих (точка начала SV40 может, как правило, использоваться только в связи с тем, что она содержит ранний промотор).

[00264] Векторы экспрессии и клонирования могут содержать ген селекции, также называемый селективным маркером. Гены селекции могут кодировать белки, которые

придают устойчивость к антибиотикам или другим токсинам, например ампициллину, неомицину, метотрексату или тетрациклину; восполнять ауксотрофные дефициты или поставлять критически важные питательные вещества, отсутствующие в комплексных средах.

5 **[00265]** В одном примере схемы селекции используют лекарственное средство, которое вызывает остановку роста клетки-хозяина. Те клетки, которые были успешно трансформированы гетерологичным геном, продуцируют белок, придающий  
10 устойчивость к лекарственному средству, и, таким образом, выживают при схеме селекции. В примерах такой доминантной селекции используют лекарственные средства неомицин, микофеноловую кислоту и гигромицин.

**[00266]** Другим примером приемлемых селективных маркеров для клеток млекопитающих являются маркеры, которые позволяют идентифицировать клетки, поглотившие нуклеиновую кислоту, кодирующую антитела по настоящей заявке. Например, клетки, трансформированные геном селекции DHFR, сначала  
15 идентифицируют посредством культивирования всех трансформантов в культуральной среде, которая содержит метотрексат (Mtx), представляющий собой конкурентный антагонист DHFR. Пример подходящей клетки-хозяина при использовании DHFR дикого типа представляет собой линию клеток яичника китайского хомячка (CHO), дефицитную по активности DHFR. Альтернативно клетки-хозяева (в особенности  
20 хозяева дикого типа, которые содержат эндогенную DHFR), трансформированные или котрансформированные кодирующими полипептид последовательностями ДНК, белком DHFR дикого типа и другим селективным маркером, таким как аминокликозид-3'-фосфотрансфераза (APH), могут быть выбраны посредством выращивания клеток в среде, содержащей агент селекции для селективного маркера, такой как  
25 аминокликозидный антибиотик.

**[00267]** Экспрессионные векторы и векторы клонирования обычно содержат промотор, который распознается организмом-хозяином и функционально связан с нуклеиновой кислотой, кодирующей требуемые полипептидные последовательности. Эукариотические гены имеют обогащенную АТ область, расположенную  
30 приблизительно на 25–30 оснований ближе к 5'-концу от сайта инициации транскрипции. Можно включить другую последовательность, находящуюся на 70–80 оснований ближе к 5'-концу от точки начала транскрипции многих генов. 3'-конец большинства эукариот может быть сигналом для добавления поли(А)-хвоста к 3'-концу

кодирующей последовательности. Все из этих последовательностей могут быть вставлены в эукариотические экспрессионные векторы.

**[00268]** Транскрипцией полипептидов с векторов в клетках-хозяевах

млекопитающего можно управлять, например, промоторами, полученными из геномов вирусов, таких как вирус полиомы, вирус оспы кур, аденовирус (например, аденовирус 2), бычий вирус папилломы, птичий вирус саркомы, цитомегаловирус, ретровирус, вирус гепатита В и вирус обезьяны 40 (SV40), из гетерологичных промоторов млекопитающих, например промотора актина или промотора иммуноглобулина, из промоторов белков теплового шока, при условии, что такие промоторы совместимы с системами клетки-хозяина.

**[00269]** Транскрипция ДНК, кодирующей антитело по настоящему описанию, у высших эукариот часто увеличивается после вставки энхансерной последовательности в вектор. В настоящее время известно множество энхансерных последовательностей в генах млекопитающих (глобина, эластазы, альбумина,  $\alpha$ -фетопротеина и инсулина).

Примеры включают в себя энхансер SV40 на поздней стороне точки начала репликации (п. н. 100–270), энхансер раннего промотора цитомегаловируса, энхансер полиомы на поздней стороне точки начала репликации и энхансеры аденовируса. *См. также* публикацию Yaniv, *Nature* 297:17–18 (1982) об элементах, усиливающих активацию эукариотических промоторов. Энхансер может быть встроен в вектор в положении 5' или 3' от кодирующей полипептид последовательности, но предпочтительно расположен в сайте 5' от промотора.

**[00270]** Экспрессионные векторы, используемые в эукариотических клетках-хозяевах (клетки дрожжей, грибов, насекомых, растений, животных, человека или ядерные клетки других многоклеточных организмов), также содержат последовательности, необходимые для терминации транскрипции и для стабилизации мРНК. Такие последовательности обычно находятся со стороны 5'-конца и иногда 3'-конца и представляют собой нетранслируемые области эукариотических или вирусных ДНК или кДНК. Эти области содержат нуклеотидные сегменты, транскрибируемые в виде полиаденилированных фрагментов, в нетранслируемом участке кодирующей полипептид мРНК. Одним используемым компонентом терминации транскрипции является область полиаденилирования гена бычьего гормона роста.

**[00271]** Клетки-хозяева, пригодные для клонирования или экспрессии ДНК в векторах, описанных в настоящем документе, включают в себя клетки высших эукариот, описанные в настоящем документе, включая клетки-хозяева позвоночных.

Размножение клеток позвоночных в культуре (тканевой культуре) стало рутинной процедурой. Примерами используемых линий клеток-хозяев млекопитающих являются линия CV1 из почек обезьяны, трансформированная с помощью SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); линия человеческих эмбриональных клеток почки (клетки 293 или клетки 293, субклонированные для выращивания в суспензионной культуре, Graham *et al.*, *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); клетки почки новорожденного хомячка (ВНК, ATCC CCL 10); клетки яичника китайского хомячка / –DHFR (CHO, Urlaub *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); мышинные клетки Сертоли (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23:243–251 (1980)); клетки почки обезьяны (CV1 ATCC CCL 70); клетки почки африканской зеленой обезьяны (VERO-76, ATCC CRL-1587); клетки карциномы шейки матки человека (HELA, ATCC CCL 2); клетки почки собаки (MDCK, ATCC CCL 34); клетки печени крыс линии Buffalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); клетки легкого человека (W138, ATCC CCL 75); клетки печени человека (Hep G2, HB 8065); опухоль молочной железы мышей (MMT 060562, ATCC CCL51); клетки TR1 (Mather *et al.*, *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44–68 (1982)); клетки MRC 5; клетки FS4 и линия клеток гепатомы человека (Hep G2).

**[00272]** Клетки-хозяева можно трансформировать вышеописанными векторами экспрессии или клонирования для продукции антител и культивировать в стандартной питательной среде, модифицированной надлежащим образом, для индуцирования промоторов, выбора трансформантов или амплификации генов, кодирующих требуемые последовательности.

**[00273]** Клетки-хозяева, используемые для продуцирования антител по настоящей заявке, можно культивировать в разнообразных средах. Для культивирования клеток-хозяев подходят коммерчески доступные среды, такие как F10 Хэма (Sigma), минимальная питательная среда ((MEM), Sigma), RPMI-1640 (Sigma) и среда Игла в модификации Дульбекко ((DMEM), Sigma). Кроме того, в качестве культуральной среды для клеток-хозяев можно использовать любую среду, описанную в Ham *et al.*, *Meth. Enz.* 58:44 (1979), Barnes *et al.*, *Anal. Biochem.* 102:255 (1980), патентах США № 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655 или 5,122,469; WO 90/03430; WO 87/00195 или переизданном патенте США № 30,985. В любые из этих сред могут быть при необходимости добавлены гормоны и/или другие факторы роста (такие как инсулин, трансферрин или эпидермальный фактор роста), соли (такие как хлорид натрия, кальций, магний и фосфат), буферные растворы (такие как HEPES), нуклеотиды (такие как аденозин и тимидин), антибиотики (такие как лекарственный препарат

GENTAMYCIN™), следовые элементы (определяемые как неорганические соединения, обычно присутствующие в конечных концентрациях в микромолярном диапазоне) и глюкоза или эквивалентный источник энергии. Специалисты в данной области могут также включить любые другие известные им необходимые добавки в соответствующих концентрациях. Условия культивирования, такие как температура, рН и т. п., являются такими, которые ранее использовались для клетки-хозяина, выбранной для экспрессии, и будут очевидны для специалиста в данной области техники.

**[00274]** При использовании рекомбинантных методик антитела можно продуцировать внутриклеточно, в периплазматическом пространстве или непосредственно секретировать в среду. При внутриклеточном продуцировании антитела на первом этапе удаляют состоящие из частиц остатки, т. е. фрагменты клеток-хозяев или лизированные фрагменты, например посредством центрифугирования или ультрафильтрации. Если антитело секретируется в среду, супернатанты в таких системах экспрессии, как правило, сначала концентрируют с использованием присутствующего на рынке фильтра для концентрирования белка, например блока ультрафильтрации Amicon или Millipore Pellicon. Ингибитор протеазы, например PMSF, может быть включен на любом из предшествующих этапов для ингибирования протеолиза, а антибиотики могут быть включены для предотвращения роста нежелательных микроорганизмов.

**[00275]** Белковая композиция, полученная из клеток, может быть очищена с использованием, например, хроматографии с гидроксипатитом, гель-электрофореза, диализа и аффинной хроматографии. В некоторых вариантах осуществления белковая композиция, полученная из клеток, может быть очищена с использованием хроматографической системы АКТА. Матрица, к которой крепится аффинный лиганд, чаще всего представляет собой агарозу, но имеются и другие матрицы. Механически стабильные матрицы, например стекло с контролируемым размером пор или поли(стиролдивинил)бензол, позволяют увеличить скорости потока и уменьшить времена обработки по сравнению с таковыми при использовании агарозы. Также, в зависимости от подлежащего извлечению антитела, доступны другие методики очистки белка, такие как фракционирование на ионообменной колонке, осаждение этанолом, обращенно-фазовая ВЭЖХ, хроматография на диоксиде кремния, хроматография на гепариновой SEPHAROSE™, хроматография на анионо- или катионообменной смоле (например, на колонке с полиаспарагиновой кислотой), хроматофокусирование, ДСН-ПААГ и осаждение сульфатом аммония. После любой (-ых) стадии (-ий) предварительной очистки смесь, содержащую представляющее интерес антитело и

загрязняющие вещества, можно подвергнуть хроматографии с гидрофобным взаимодействием при низком рН.

### 5.5. Фармацевтические композиции

- 5 [00276] В одном аспекте в настоящем описании дополнительно предложены фармацевтические композиции, содержащие по меньшей мере одно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент настоящего описания. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит терапевтически эффективное количество антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, обеспеченных в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый эксципиент.
- 10 [00277] Фармацевтические композиции, содержащие антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, готовят для хранения посредством смешивания слитного белка с требуемой степенью чистоты с необязательными физиологически приемлемыми эксципиентами (см., например, Remington, Remington's Pharmaceutical Sciences (18th ed. 1980)) в форме водных растворов или лиофилизированных или других
- 15 высушенных форм.
- [00278] Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент настоящего описания могут быть составлены в любой приемлемой форме для доставки в целевую клетку/ткань, например в виде микрокапсул или макроэмульсий (Remington, выше; Park *et al.*, 2005, *Molecules* 10:146–61; Malik *et al.*, 2007, *Curr. Drug. Deliv.* 4:141–51), в
- 20 качестве составов с замедленным высвобождением (Putney and Burke, 1998, *Nature Biotechnol.* 16:153–57) или в липосомах (Maclean *et al.*, 1997, *Int. J. Oncol.* 11:325–32; Kontermann, 2006, *Curr. Opin. Mol. Ther.* 8:39-45).
- [00279] Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, обеспеченные в настоящем документе, также могут быть захвачены в микрокапсулы, полученные,
- 25 например, с помощью методик коацервации или с помощью межфазной полимеризации, например гидроксиметилцеллюлозные или желатиновые микрокапсулы и полиметилметакрилатные микрокапсулы соответственно, в коллоидные системы доставки лекарственного средства (например, липосомы, альбуминовые микросферы, макроэмульсии, наночастицы и нанокапсулы) или в макроэмульсии. Такие методики
- 30 описаны, например, в Remington, выше.
- [00280] Различные композиции и системы доставки известны и могут использоваться с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, как описано в настоящем документе, включая, без ограничений, инкапсулирование в липосомах, микрочастицах, микрокапсулах, рекомбинантных клетках, способных экспрессировать антитело или его

антигенсвязывающий фрагмент, рецептор-опосредованный эндоцитоз (см., например, Wu and Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429–32), конструирование нуклеиновой кислоты в качестве части ретровирусного или другого вектора, и т. д. В другом варианте осуществления композиция может быть обеспечена в виде системы контролируемого высвобождения или замедленного высвобождения. В одном варианте осуществления для достижения замедленного или отсроченного высвобождения можно использовать насос (см., например, Langer выше; Sefton, 1987, Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201–40; Buchwald *et al.*, 1980, Surgery 88:507–16; и Saudek *et al.*, 1989, N. Engl. J. Med. 321:569–74). В другом варианте осуществления для достижения контролируемого или замедленного высвобождения профилактического или терапевтического агента (например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, как описано в настоящем документе) или предложенной в настоящем документе композиции можно применять полимерные материалы (см., например, Medical Applications of Controlled Release (Langer and Wise eds., 1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance (Smolen and Ball eds., 1984); Ranger and Peppas, 1983, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61–126; Levy *et al.*, 1985, Science 228:190–92; During *et al.*, 1989, Ann. Neurol. 25:351–56; Howard *et al.*, 1989, J. Neurosurg. 71:105–12; патенты США № 5,679,377; 5,916,597; 5,912,015; 5,989,463 и 5,128,326; а также публикации PCT № WO 99/15154 и WO 99/20253). К примерам полимеров, применяемых в составах для замедленного высвобождения, без ограничений, относятся поли(2-гидроксиэтилметакрилат), полиметилметакрилат, полиакриловая кислота, сополимеры полиэтилена и поливинилацетата, полиметакриловая кислота, полигликолиды (PLG), полиангидриды, поли(N-винилпирролидон), поливиниловый спирт, полиакриламид, полиэтиленгликоль, полилактиды (PLA), сополимеры полилактида и полигликолидов (PLGA) и полиортоэфир. В одном варианте осуществления полимер, применяемый в составе для замедленного высвобождения, является инертным, свободным от вымываемых примесей, стабильным при хранении, стерильным и биоразлагаемым.

**[00281]** В еще одном варианте осуществления система контролируемого или замедленного высвобождения может располагаться в непосредственной близости от конкретной целевой ткани, например носового прохода или легких, а потому потребуется лишь часть от системной дозы (см., например, Goodson, Medical Applications of Controlled Release Vol. 2, 115–38 (1984)). Системы контролируемого высвобождения обсуждаются, например, в Langer, 1990, Science 249:1527–33. Для получения составов с замедленным высвобождением, содержащих одно или несколько

антител или их антигенсвязывающих фрагментов, как описано в настоящем документе, можно применять любую методику, известную специалистам в данной области (см., например, патент США № 4,526,938, публикации PCT № WO 91/05548 и WO 96/20698, Ning *et al.*, 1996, *Radiotherapy & Oncology* 39:179–89; Song *et al.*, 1995, *PDA J. of Pharma. Sci. & Tech.* 50:372–97; Cleek *et al.*, 1997, *Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 24:853–54; и Lam *et al.*, 1997, *Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.* 24:759–60).

## 5.6 Способы использования антител

**[00282]** В одном аспекте в настоящем документе предложен способ ослабления активности IL-1 $\beta$  в клетке, включающий воздействие на клетку эффективным количеством антитела, предложенного в настоящем документе.

**[00283]** В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, ингибирует сигнальный путь IL-1 $\beta$ . В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, ингибирует биологическую активность IL-1 $\beta$ . В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, ингибирует продукцию IL-6. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, ингибирует продукцию CXCL5. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, ингибирует продукцию G-CSF. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, ингибирует продукцию IL-6, CXCL5 и G-CSF. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, ингибирует биологическую активность IL-1 $\beta$  в фибробластах человека. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, ингибирует продукцию IL-6, CXCL5 и G-CSF в фибробластах человека. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, ингибирует биологическую активность IL-1 $\beta$  в фибробластах человека. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, ингибирует биологическую активность IL-1 $\beta$  в образцах человеческих мононуклеарных клеток периферической крови (PBMС). В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, ингибирует биологическую активность IL-1 $\beta$  в образцах человеческой цельной крови.

**[00284]** В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, имеет перекрестную реактивность с IL-1 $\beta$  яванского макака. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, ингибирует биологическую активность IL-1 $\beta$  в фибробластах яванского макака.

**[00285]** В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, ослабляет активность  $\text{IL-1}\beta$  на по меньшей мере около 10%. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, ослабляет активность  $\text{IL-1}\beta$  на по меньшей мере около 20%. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, ослабляет активность  $\text{IL-1}\beta$  на по меньшей мере около 30%. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, ослабляет активность  $\text{IL-1}\beta$  на по меньшей мере около 40%. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, ослабляет активность  $\text{IL-1}\beta$  на по меньшей мере около 50%. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, ослабляет активность  $\text{IL-1}\beta$  на по меньшей мере около 60%. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, ослабляет активность  $\text{IL-1}\beta$  на по меньшей мере около 70%. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, ослабляет активность  $\text{IL-1}\beta$  на по меньшей мере около 80%. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, ослабляет активность  $\text{IL-1}\beta$  на по меньшей мере около 90%. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, ослабляет активность  $\text{IL-1}\beta$  на по меньшей мере около 95%. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, ослабляет активность  $\text{IL-1}\beta$  на по меньшей мере около 98%. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, ослабляет активность  $\text{IL-1}\beta$  на около 100%. В определенных вариантах осуществления антитело, описанное в настоящем документе, может ослаблять (например, частично ослаблять) активность  $\text{IL-1}\beta$  на по меньшей мере от около 15% до около 65%. В определенных вариантах осуществления антитело, описанное в настоящем документе, может ослаблять (например, частично ослаблять) активность  $\text{IL-1}\beta$  на по меньшей мере от около 20% до около 65%. В определенных вариантах осуществления антитело, описанное в настоящем документе, может ослаблять (например, частично ослаблять) активность  $\text{IL-1}\beta$  на по меньшей мере от около 30% до около 65%.

**[00286]** Не имеющим ограничительного характера примером активности  $\text{IL-1}\beta$  является  $\text{IL-1}\beta$ -опосредованная сигнализация. Таким образом, в определенных вариантах осуществления в настоящем документе предложен способ ослабления (например, частичного ослабления)  $\text{IL-1}\beta$ -опосредованной сигнализации в клетке,

включающий воздействие на клетку эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, предложенного в настоящем документе.

**[00287]** В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, ослабляет IL-1 $\beta$ -опосредованную сигнализацию на по меньшей мере около 5 10%. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, ослабляет IL-1 $\beta$ -опосредованную сигнализацию на по меньшей мере около 20%. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, ослабляет IL-1 $\beta$ -опосредованную сигнализацию на по меньшей мере около 30%. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем 10 документе, ослабляет IL-1 $\beta$ -опосредованную сигнализацию на по меньшей мере около 40%. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, ослабляет IL-1 $\beta$ -опосредованную сигнализацию на по меньшей мере около 50%. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, ослабляет IL-1 $\beta$ -опосредованную сигнализацию на по меньшей мере около 15 60%. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, ослабляет IL-1 $\beta$ -опосредованную сигнализацию на по меньшей мере около 70%. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, ослабляет IL-1 $\beta$ -опосредованную сигнализацию на по меньшей мере около 20 80%. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, ослабляет IL-1 $\beta$ -опосредованную сигнализацию на по меньшей мере около 90%. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, ослабляет IL-1 $\beta$ -опосредованную сигнализацию на по меньшей мере около 25 98%. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, ослабляет IL-1 $\beta$ -опосредованную сигнализацию на по меньшей мере около 100%. В определенных вариантах осуществления антитело, описанное в настоящем документе, может ослаблять (например, частично ослаблять) IL-1 $\beta$ -опосредованную сигнализацию на по меньшей мере от около 15% до около 65%. В определенных 30 вариантах осуществления антитело, описанное в настоящем документе, может ослаблять (например, частично ослаблять) IL-1 $\beta$ -опосредованную сигнализацию на по меньшей мере от около 20% до около 65%. В определенных вариантах осуществления антитело, описанное в настоящем документе, может ослаблять (например, частично







(например, частично ослаблять) IL-1 $\beta$ -индуцированную продукцию G-CSF на по меньшей мере от около 30% до около 65%.

**[00291]** В некоторых вариантах осуществления антитела, предложенные в настоящем документе, ослабляют связывание IL-1 $\beta$  с по меньшей мере одним из его рецепторов.

5 **[00292]** Другим не имеющим ограничительного характера примером активности IL-1 $\beta$  является связывание с IL-1R1. Таким образом, в определенных вариантах осуществления в настоящем документе предложен способ ослабления (например, частичного ослабления) связывания IL-1 $\beta$  с IL-1R1, включающий воздействие на клетку эффективным количеством антитела или его антигенсвязывающего фрагмента,  
10 предложенного в настоящем документе.

**[00293]** В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, ослабляет связывание IL-1 $\beta$  с IL-1R1 на по меньшей мере около 10%. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, ослабляет связывание IL-1 $\beta$  с IL-1R1 на по меньшей мере около 20%. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, ослабляет связывание IL-1 $\beta$  с IL-1R1 на по меньшей мере около 30%. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, ослабляет связывание IL-1 $\beta$  с IL-1R1 на по меньшей мере около 40%. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, ослабляет связывание IL-1 $\beta$  с IL-1R1 на по меньшей мере около 50%. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, ослабляет связывание IL-1 $\beta$  с IL-1R1 на по меньшей мере около 60%. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, ослабляет связывание IL-1 $\beta$  с IL-1R1 на по меньшей мере около 70%. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, ослабляет связывание IL-1 $\beta$  с IL-1R1 на по меньшей мере около 80%. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, ослабляет связывание IL-1 $\beta$  с IL-1R1 на по меньшей мере около 90%. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, ослабляет связывание IL-1 $\beta$  с IL-1R1 на по меньшей мере около 95%. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, ослабляет связывание IL-1 $\beta$  с IL-1R1 на по меньшей мере около 98%. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, ослабляет связывание IL-1 $\beta$  с IL-1R1 на около 100%. В определенных вариантах осуществления антитело, описанное в настоящем

документе, может ослаблять (например, частично ослаблять) связывание IL-1 $\beta$  с IL-1R1 на по меньшей мере от около 15% до около 65%. В определенных вариантах осуществления антитело, описанное в настоящем документе, может ослаблять (например, частично ослаблять) связывание IL-1 $\beta$  с IL-1R1 на по меньшей мере от около 20% до около 65%. В определенных вариантах осуществления антитело, описанное в настоящем документе, может ослаблять (например, частично ослаблять) связывание IL-1 $\beta$  с IL-1R1 на по меньшей мере от около 30% до около 65%.

**[00294]** Еще одним не имеющим ограничительного характера примером активности IL-1 $\beta$  является сигнализация, опосредованная IL-1R1. Таким образом, в определенных вариантах осуществления в настоящем документе предложен способ ослабления (например, частичного ослабления) IL-1R1-опосредованной сигнализации в клетке, включающий воздействие на клетку эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, предложенного в настоящем документе.

**[00295]** В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, ослабляет IL-1R1-опосредованную сигнализацию на по меньшей мере около 10%. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, ослабляет IL-1R1-опосредованную сигнализацию на по меньшей мере около 20%. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, ослабляет IL-1R1-опосредованную сигнализацию на по меньшей мере около 30%. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, ослабляет IL-1R1-опосредованную сигнализацию на по меньшей мере около 40%. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, ослабляет IL-1R1-опосредованную сигнализацию на по меньшей мере около 50%. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, ослабляет IL-1R1-опосредованную сигнализацию на по меньшей мере около 60%. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, ослабляет IL-1R1-опосредованную сигнализацию на по меньшей мере около 70%. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, ослабляет IL-1R1-опосредованную сигнализацию на по меньшей мере около 80%. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, ослабляет IL-1R1-опосредованную сигнализацию на по меньшей мере около 90%. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, ослабляет IL-1R1-опосредованную сигнализацию на по меньшей мере около 95%. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем



запуск и протекание сигнала по пути IL-1 на по меньшей мере около 98%. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, ингибирует запуск и протекание сигнала по пути IL-1 на около 100%. В определенных вариантах осуществления антитело, описанное в настоящем документе, может ослаблять

5 (например, частично ослаблять) запуск и протекание сигнала по пути IL-1 на по меньшей мере от около 15% до около 65%. В определенных вариантах осуществления антитело, описанное в настоящем документе, может ослаблять (например, частично ослаблять) запуск и протекание сигнала по пути IL-1 на по меньшей мере от около 20% до около 65%. В определенных вариантах осуществления антитело, описанное в  
10 настоящем документе, может ослаблять (например, частично ослаблять) запуск и протекание сигнала по пути IL-1 на по меньшей мере от около 30% до около 65%.

**[00297]** В другом аспекте в настоящем документе предложен способ лечения заболевания или расстройства у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента,  
15 обеспеченного в настоящем документе. В одном варианте осуществления заболевание или расстройство представляет собой IL-1 $\beta$ -опосредованное заболевание или расстройство. В одном варианте осуществления заболевание или расстройство представляет собой IL-1R1-опосредованное заболевание или расстройство. Также в настоящем документе предложен способ лечения заболевания или расстройства,  
20 включающий введение субъекту одного или нескольких терапевтических агентов в комбинации с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, предложенным в настоящем документе.

**[00298]** Описание также относится к способам использования антител, предложенных в настоящем документе, для ингибирования, т. е. антагонизации,  
25 функции IL-1 $\beta$  с целью ингибирования активации сигнального пути IL-1 и, следовательно, регулирования воспаления, что приводит к лечению патологического расстройства, такого как рак. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак легкого. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой почечноклеточный рак.

30 **[00299]** В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложен способ лечения IL-1 $\beta$ -опосредованного заболевания или расстройства у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества выделенного антитела к IL-1 $\beta$  или его антигенсвязывающего фрагмента, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе

предложен способ лечения воспалительного заболевания или расстройства у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества выделенного антитела к IL-1 $\beta$  или его антигенсвязывающего фрагмента, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления IL-1 $\beta$ -опосредованное заболевание или расстройство представляет собой рак, такой как рак легкого или рак почки.

**[00300]** В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложен способ лечения рака легкого у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества выделенного антитела к IL-1 $\beta$  или его антигенсвязывающего фрагмента, как описано в настоящем документе. Введение может включать в себя, например, системную или местную доставку.

**[00301]** В некоторых вариантах осуществления у субъекта диагностирован рак легкого (например, немелкоклеточный рак легкого). В некоторых вариантах осуществления у субъекта диагностирован немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ) стадии 0. В некоторых вариантах осуществления у субъекта диагностирован НМРЛ стадии 1. В некоторых вариантах осуществления у субъекта диагностирован НМРЛ стадии 2. В некоторых вариантах осуществления у субъекта диагностирован НМРЛ стадии 2 и ему была проведена операция. В некоторых вариантах осуществления у субъекта диагностирован НМРЛ стадии 3. В некоторых вариантах осуществления у субъекта диагностирован НМРЛ стадии 3 и ему была проведена операция. В некоторых вариантах осуществления у субъекта диагностирован НМРЛ стадии 4.

**[00302]** В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложен способ лечения рака почки у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества выделенного антитела к IL-1 $\beta$  или его антигенсвязывающего фрагмента, как описано в настоящем документе.

**[00303]** В некоторых вариантах осуществления у субъекта диагностирован рак почки, например почечноклеточная карцинома (ПКК). В некоторых вариантах осуществления у субъекта диагностирована стадия 1. В некоторых вариантах осуществления у субъекта диагностирована ПКК стадии 2. В некоторых вариантах осуществления у субъекта диагностирована ПКК стадии 3.

**[00304]** В некоторых вариантах осуществления антитела, предложенные в настоящем документе, используют для прерывания рака легкого. В некоторых вариантах осуществления у субъекта была идентифицирована предрасположенность к риску развития рака легкого. В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе

предложен способ снижения риска развития рака легкого у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества выделенного антитела к IL-1 $\beta$  или его антигенсвязывающего фрагмента, как описано в настоящем документе.

**[00305]** Субъект с риском развития рака легкого может быть идентифицирован различными факторами, известными в данной области. В некоторых вариантах осуществления было определено, что субъект имеет один или более узлов в легком, таких как предраковые легочные узлы (например, как определено с помощью компьютерной томографической визуализации). В некоторых вариантах осуществления один или более легочных узлов являются предраковыми. В некоторых вариантах осуществления субъект находится в возрасте от около 50 лет до около 80 лет и/или субъект имеет в анамнезе курение, например курение 20 пачек в год. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет повышенный уровень С-реактивного белка (СРБ).

**[00306]** Согласно дополнительному варианту осуществления субъекта, подверженного риску развития рака легкого, идентифицируют в соответствии со способами, описанными в публикации WO2021/146516 (SYSTEM AND METHOD FOR PREDICTING THE RISK OF FUTURE LUNG CANCER), которая включена в настоящий документ путем ссылки, и субъекту, подверженному риску, вводят эффективное количество выделенного антитела к IL-1 $\beta$  или его антигенсвязывающего фрагмента, как описано в настоящем документе. Например, способ может включать идентификацию пациента с риском развития рака легкого посредством получения одного или более изображений для пациента (например, компьютерной томографии); извлечение признаков из одного или более полученных изображений (например, к извлеченным признакам относятся по меньшей мере неспецифические для узла признаки, причем неспецифические для узла признаки включают в себя один или оба из признаков легочной паренхимы и признаков состава тела); прогнозирование одного или более будущих рисков рака легкого для субъекта путем применения одной или более обученных прогнозных моделей рисков для анализа извлеченных признаков из одного или более полученных изображений; и, если пациент идентифицируется как подверженный риску развития рака легкого (например, риску развития рака легкого в течение 1 года, 3 лет, 5 лет или 10 лет), введение пациенту эффективного количества выделенного антитела к IL-1 $\beta$  или его антигенсвязывающего фрагмента, как описано в настоящем документе.

[00307] В некоторых вариантах осуществления антитела, предложенные в настоящем документе, применяют для профилактики рака легкого. Профилактика может быть

5 полной, например полное отсутствие состояния или расстройства, связанного с IL-1 $\beta$ . Профилактика также может быть частичной, так что вероятность возникновения связанного с IL-1 $\beta$  состояния или метаболического расстройства у субъекта менее вероятна, чем в случае, если бы субъект не получал антитело по настоящему описанию.

[00308] Способы введения и дозировка более подробно описаны в разделе 5.7 ниже.

10 [00309] В другом аспекте в настоящем документе предложено использование антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, обеспеченного в настоящем документе, при изготовлении лекарственного средства для лечения заболевания или расстройства у субъекта.

15 [00310] В другом аспекте в настоящем документе предложено использование фармацевтической композиции, предложенной в настоящем документе, при изготовлении лекарственного средства для лечения заболевания или расстройства у субъекта.

20 [00311] В другом аспекте в настоящем документе предложено использование антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, предложенного в настоящем документе, при изготовлении лекарственного средства, причем лекарственное средство предназначено для применения в способе обнаружения присутствия IL-1 $\beta$  в биологическом образце, при этом способ включает приведение биологического образца в контакт с антителом в условиях, допускающих связывание антитела с белком IL-1 $\beta$ , и обнаружение того, образуется ли комплекс между антителом и белком IL-1 $\beta$ .

25 [00312] В других аспектах антитела и их фрагменты по настоящему описанию можно использовать для обнаружения присутствия IL-1 $\beta$  в биологическом образце. В настоящем документе термин «обнаружение» охватывает количественное или качественное обнаружение. В некоторых вариантах осуществления биологический образец включает в себя биологическую жидкость, клетку или ткань. Диагностические анализы и способы более подробно описаны в разделе 5.9 ниже.

### **5.7 Способы введения и дозировка**

30 [00313] В конкретном варианте осуществления в настоящем документе предложена композиция для применения в профилактике и/или лечении заболевания или состояния, включающая в себя антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, представленный в настоящем документе. В одном варианте осуществления в настоящем документе предложена композиция для применения в профилактике заболевания или состояния,

включающая в себя антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в настоящем документе. В одном варианте осуществления в настоящем документе предложена композиция для применения в лечении заболевания или состояния, включающая в себя антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенные в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние представляет собой IL-1 $\beta$ -опосредованное заболевание. В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние представляет собой IL-1R1-опосредованное заболевание. В некоторых вариантах осуществления заболевание или расстройство связано с IL-1 $\beta$ . В некоторых вариантах осуществления заболевание или расстройство связано с IL-1 $\beta$ . В некоторых вариантах осуществления заболевание или расстройство представляет собой воспалительное заболевание или расстройство. В некоторых вариантах осуществления заболевание или расстройство представляет собой рак. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак легкого. В некоторых вариантах осуществления рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого. В некоторых вариантах осуществления рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого стадии 0. В некоторых вариантах осуществления рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого стадии 1. В некоторых вариантах осуществления рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого стадии 2. В некоторых вариантах осуществления рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого стадии 3. В некоторых вариантах осуществления рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого стадии 4. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак почки. В некоторых вариантах осуществления рак почки представляет собой почечноклеточный рак. В некоторых вариантах осуществления рак почки представляет собой почечноклеточный рак стадии 1. В некоторых вариантах осуществления рак почки представляет собой почечноклеточный рак стадии 2. В некоторых вариантах осуществления рак почки представляет собой почечноклеточный рак стадии 3. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой нуждающегося в лечении субъекта. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет заболевание или состояние. В других вариантах осуществления субъект подвержен риску наличия заболевания или состояния. В некоторых вариантах осуществления введение приводит к профилактике, контролю, лечению или облегчению симптомов заболевания или состояния.

**[00314]** В одном варианте осуществления в настоящем документе предложена композиция для применения в профилактике и/или лечении симптома заболевания или состояния, включающая в себя антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, представленные в настоящем документе. В одном варианте осуществления в настоящем документе предложена композиция для применения в профилактике симптома заболевания или состояния, включающая в себя антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, представленные в настоящем документе. В одном варианте осуществления в настоящем документе предложена композиция для применения в лечении симптома заболевания или состояния, включающая в себя антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, представленные в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние представляет собой ИЛ-1 $\beta$ -опосредованное заболевание. В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние представляет собой ИЛ-1R1-опосредованное заболевание. В некоторых вариантах осуществления заболевание или расстройство связано с ИЛ-1 $\beta$ . В некоторых вариантах осуществления заболевание или расстройство связано с ИЛ-1 $\beta$ . В некоторых вариантах осуществления заболевание или расстройство представляет собой воспалительное заболевание или расстройство. В некоторых вариантах осуществления заболевание или расстройство представляет собой рак. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак легкого. В некоторых вариантах осуществления рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого. В некоторых вариантах осуществления рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого стадии 0. В некоторых вариантах осуществления рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого стадии 1. В некоторых вариантах осуществления рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого стадии 2. В некоторых вариантах осуществления рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого стадии 3. В некоторых вариантах осуществления рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого стадии 4. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак почки. В некоторых вариантах осуществления рак почки представляет собой почечноклеточный рак. В некоторых вариантах осуществления рак почки представляет собой почечноклеточный рак стадии 1. В некоторых вариантах осуществления рак почки представляет собой почечноклеточный рак стадии 2. В некоторых вариантах осуществления рак почки представляет собой почечноклеточный рак стадии 3. В определенных вариантах осуществления субъект представляет собой нуждающегося в лечении субъекта. В некоторых вариантах осуществления субъект

имеет заболевание или состояние. В других вариантах осуществления субъект подвержен риску наличия заболевания или состояния. В некоторых вариантах осуществления введение приводит к профилактике или лечению симптома заболевания или состояния.

5 **[00315]** В другом варианте осуществления в настоящем документе предложен способ профилактики и/или лечения заболевания или состояния у субъекта, включающий введение эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, обеспеченного в настоящем документе. В одном варианте осуществления в настоящем документе предложен способ профилактики заболевания или состояния у субъекта,  
10 включающий введение эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, обеспеченного в настоящем документе. В одном варианте осуществления в настоящем документе предложен способ лечения заболевания или состояния у субъекта, включающий введение эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, обеспеченного в  
15 настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние представляет собой IL-1 $\beta$ -опосредованное заболевание. В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние представляет собой IL-1R1-опосредованное заболевание. В некоторых вариантах осуществления заболевание или расстройство связано с IL-1 $\beta$ . В некоторых вариантах осуществления заболевание или расстройство связано с IL-1 $\beta$ . В некоторых вариантах осуществления заболевание или расстройство представляет собой воспалительное заболевание или расстройство. В некоторых вариантах осуществления заболевание или расстройство представляет собой рак. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак легкого. В некоторых вариантах осуществления рак легкого представляет собой  
20 немелкоклеточный рак легкого. В некоторых вариантах осуществления рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого стадии 0. В некоторых вариантах осуществления рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого стадии 1. В некоторых вариантах осуществления рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого стадии 2. В некоторых вариантах осуществления рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого стадии 3. В некоторых вариантах осуществления рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого стадии 4. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак почки. В некоторых вариантах осуществления рак почки представляет собой  
25 почечноклеточный рак. В некоторых вариантах осуществления рак почки представляет

собой почечноклеточный рак стадии 1. В некоторых вариантах осуществления рак почки представляет собой почечноклеточный рак стадии 2. В некоторых вариантах осуществления рак почки представляет собой почечноклеточный рак стадии 3. В определенных вариантах осуществления субъект представляет собой нуждающегося в лечении субъекта. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет заболевание или состояние. В других вариантах осуществления субъект подвержен риску наличия заболевания или состояния. В некоторых вариантах осуществления введение приводит к профилактике или лечению заболевания или состояния.

**[00316]** В другом варианте осуществления предложен способ профилактики и/или лечения симптома заболевания или состояния у субъекта, включающий введение эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, обеспеченного в настоящем документе. В одном варианте осуществления предложен способ предотвращения симптома заболевания или состояния у субъекта, включающий введение эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, обеспеченного в настоящем документе. В одном варианте осуществления предложен способ лечения симптома заболевания или состояния у субъекта, включающий введение эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, обеспеченного в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние представляет собой IL-1 $\beta$ -опосредованное заболевание. В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние представляет собой IL-1R1-опосредованное заболевание. В некоторых вариантах осуществления заболевание или расстройство связано с IL-1 $\beta$ . В некоторых вариантах осуществления заболевание или расстройство связано с IL-1 $\beta$ . В некоторых вариантах осуществления заболевание или расстройство представляет собой воспалительное заболевание или расстройство. В некоторых вариантах осуществления заболевание или расстройство представляет собой рак. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак легкого. В некоторых вариантах осуществления рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого. В некоторых вариантах осуществления рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого стадии 0. В некоторых вариантах осуществления рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого стадии 1. В некоторых вариантах осуществления рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого стадии 2. В некоторых вариантах осуществления рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого стадии 3. В некоторых вариантах осуществления рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак

легкого стадии 4. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак почки. В некоторых вариантах осуществления рак почки представляет собой почечноклеточный рак. В некоторых вариантах осуществления рак почки представляет собой почечноклеточный рак стадии 1. В некоторых вариантах осуществления рак почки представляет собой почечноклеточный рак стадии 2. В некоторых вариантах осуществления рак почки представляет собой почечноклеточный рак стадии 3. В определенных вариантах осуществления субъект представляет собой нуждающегося в лечении субъекта. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет заболевание или состояние. В других вариантах осуществления субъект подвержен риску наличия заболевания или состояния. В некоторых вариантах осуществления введение приводит к профилактике или лечению симптома заболевания или состояния.

**[00317]** В данном документе также предложены способы профилактики и/или лечения заболевания или состояния путем введения субъекту эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, обеспеченного в настоящем документе, или фармацевтической композиции, содержащей антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, обеспеченные в настоящем документе. В одном аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является по существу очищенным (т. е. по существу не содержит веществ, которые ограничивают его действие или создают нежелательные побочные эффекты). Субъект, которому проводят терапию, может представлять собой млекопитающее, такое как не примат (например, коровы, свиньи, лошади, кошки, собаки, крысы и т. д.) или примат (например, обезьяна, такая как яванский макак, или человек). В одном варианте осуществления субъект представляет собой человека. В другом варианте осуществления субъект представляет собой человека с заболеванием или состоянием.

**[00318]** Известны различные системы доставки, которые могут использоваться для введения профилактического или терапевтического агента (например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, предложенного в настоящем документе). Способы введения профилактического или терапевтического агента (например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, обеспеченного в настоящем документе) или фармацевтической композиции включают в себя, без ограничений, парентеральное введение (например, внутрикожное, внутримышечное, внутрибрюшинное, внутривенное и подкожное), эпидуральное и слизистое (например, интраназальный и пероральный пути). В конкретном варианте осуществления профилактическое или терапевтическое средство (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент,

предложенное в настоящем документе) или фармацевтическую композицию вводят интраназально, внутримышечно, внутривенно или подкожно.

**[00319]** В конкретном варианте осуществления может быть желательным введение профилактического или терапевтического агента или фармацевтической композиции, предложенной в настоящем документе, в область, нуждающуюся в лечении. Это может быть достигнуто, например, но без ограничений, локальной инфузией, местным введением (например, с помощью интраназального спрея), посредством инъекции или с помощью имплантата.

**[00320]** В конкретном варианте осуществления композиция, обеспеченная в настоящем документе, содержит один, два или более антител или их антигенсвязывающих фрагментов, предложенных в настоящем документе. В другом варианте осуществления композиция, обеспеченная в настоящем документе, содержит один, два или более антител или их антигенсвязывающих фрагментов, предложенных в настоящем документе, и профилактическое или терапевтическое средство, отличное от антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, обеспеченного в настоящем документе. В одном варианте осуществления, известно, что агенты пригодны для использования или были использованы в настоящее время для профилактики, ведения, лечения и/или облегчения заболевания или состояния. Помимо профилактических или терапевтических агентов композиции, предложенные в настоящем документе, также могут содержать один или более эксципиентов.

**[00321]** Композиции, предложенные в настоящем документе, содержат нерасфасованные лекарственные композиции, пригодные для производства фармацевтических композиций (например, композиции, подходящие для введения субъекту или пациенту), которые можно использовать при изготовлении единичных дозированных форм. В одном варианте осуществления композиция, обеспеченная в настоящем документе, представляет собой фармацевтическую композицию. Такие композиции содержат профилактически или терапевтически эффективное количество одного или более профилактических или терапевтических агентов (например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, предложенного в настоящем документе, или другого профилактического или терапевтического агента) и одного или более фармацевтически приемлемых эксципиентов. Фармацевтические композиции могут быть составлены таким образом, чтобы они подходили для способа введения субъекту.

**[00322]** В конкретном варианте осуществления термин «эксципиент» может также относиться к разбавителю, адьюванту (например, адьювант Фрейнда (полный или

неполный)) или к несущей среде. Фармацевтические эксципиенты могут представлять собой стерильные жидкости, такие как вода и масла, в том числе нефтяного, животного, растительного или синтетического происхождения. Вода является примером эксципиента при введении фармацевтической композиции внутривенно.

5 Физиологические растворы, водный раствор декстрозы и растворы глицерина также можно использовать в качестве жидких эксципиентов, в частности в растворах для инъекций. Если требуется, композиция может также содержать небольшие количества смачивающих веществ, или эмульгаторов, или буферных веществ для поддержания pH. Эти композиции могут иметь форму растворов, суспензий, эмульсий, таблеток, пилюль, 10 капсул, порошков, лекарственных форм с замедленным высвобождением и т. п. Не имеющие ограничительного характера примеры приемлемых фармацевтических эксципиентов описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., г. Истон, штат Пенсильвания, США. Такие композиции будут содержать профилактически или терапевтически эффективное количество антитела или его 15 антигенсвязывающего фрагмента, предложенного в настоящем документе, например в очищенной форме, наряду с приемлемым количеством эксципиента (-ов), чтобы получить форму для надлежащего введения пациенту. Состав должен соответствовать способу введения.

**[00323]** В одном из вариантов осуществления композиция составлена в соответствии с процедурами в качестве фармацевтической композиции, адаптированной для 20 внутривенного введения людям.

**[00324]** Как правило, ингредиенты композиций, предложенных в настоящем документе, выпускают либо отдельно, либо смешанными в виде единицы дозировки, например в виде сухого лиофилизированного порошка или концентрата без воды в 25 герметично закрытой упаковке, такой как ампула или саше, с указанием количества действующего вещества. Если композиция предназначена для введения путем инфузии, ее можно выпускать в виде флакона для инфузии, содержащего стерильную воду фармацевтической степени чистоты или физиологический раствор. Если композиция предназначена для введения путем инъекции, можно обеспечить ампулу стерильной 30 воды для инъекции или физиологического раствора, чтобы ингредиенты могли смешиваться до введения.

**[00325]** Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, обеспеченные в настоящем документе, могут быть упакованы в герметично закрытый контейнер, такой как ампула или саше, на которых указано количество антитела. В одном варианте

осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент поставляют в виде сухого стерилизованного лиофилизированного порошка или содержащего воду концентрата в герметично закрытом контейнере; они могут быть восстановлены, например, водой или физиологическим раствором, до соответствующей концентрации для введения субъекту.

**[00326]** Композиции, обеспеченные в настоящем документе, могут быть составлены в виде нейтральных или солевых форм. Фармацевтически приемлемые соли включают в себя соли, образованные анионами, и соли, образованные катионами.

**[00327]** Количество профилактического или терапевтического агента (например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, обеспеченного в настоящем документе) или композиции, предложенной в настоящем документе, которое будет эффективным для предупреждения и/или лечения заболевания или состояния, можно определять с помощью клинических методик, известных в данной области. Точная доза, используемая в составе, также зависит от способа введения и серьезности заболевания или состояния и должна быть определена на основании решения медицинского работника и обстоятельств каждого пациента.

**[00328]** В определенных вариантах осуществления способ введения дозы антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, обеспеченного в настоящем документе, пациенту представляет собой интраназальный, внутримышечный, внутривенный, подкожный или их комбинацию, но другие способы, описанные в настоящем документе, также являются приемлемыми. Каждую дозу можно необязательно вводить одним и тем же способом введения. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, обеспеченный в настоящем документе, можно вводить множеством способов введения одновременно или последовательно по отношению к другим дозам того же или другого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, обеспеченного в настоящем документе.

**[00329]** В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, обеспеченные в настоящем документе, вводят субъекту профилактически или терапевтически. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, обеспеченные в настоящем документе, могут быть профилактически или терапевтически введены субъекту для предотвращения, уменьшения или ослабления заболевания или его симптома.

## 5.8 Генная терапия

**[00330]** В конкретном варианте осуществления нуклеиновые кислоты, содержащие последовательности, кодирующие антитела или их функциональные производные, вводят субъекту для применения в способе, предложенном в настоящем документе, например для предотвращения, ведения, лечения и/или облегчения IL-1 $\beta$ -опосредованного заболевания, расстройства или состояния посредством генной терапии. Такая терапия охватывает то, что проводится путем введения субъекту экспрессированной или экспрессирующей нуклеиновой кислоты. В одном варианте осуществления нуклеиновые кислоты продуцируют свое кодированное антитело, а антитело опосредует профилактический или терапевтический эффект.

**[00331]** Можно использовать любой из способов рекомбинантного экспрессии гена (или генной терапии), доступных в данной области.

**[00332]** Для общего обзора способов генной терапии см. Goldspiel *et al.*, 1993, *Clinical Pharmacy* 12:488–505; Wu and Wu, 1991, *Biotherapy* 3:87–95; Tolstoshev, 1993, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:573–596; Mulligan, 1993, *Science* 260:926–932; и Morgan and Anderson, 1993, *Ann. Rev. Biochem.* 62:191–217; May, 1993, *TIBTECH* 11(5):155–215. Способы, широко известные в области технологии рекомбинантной ДНК, которые можно использовать, описаны в Ausubel *et al.* (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); и Krieglner, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990).

**[00333]** В конкретном варианте осуществления композиция содержит нуклеиновые кислоты, кодирующие антитело, предложенное в настоящем документе, причем нуклеиновые кислоты являются частью вектора экспрессии, который экспрессирует антитело или химерные белки или тяжелые или легкие цепи в подходящем хозяине. В частности, такие нуклеиновые кислоты имеют промоторы, такие как гетерологичные промоторы, функционально связанные с кодирующей областью антитела, причем промотор является индуцибельным или конститутивным, и, необязательно, тканеспецифическим. В другом конкретном варианте осуществления используют молекулы нуклеиновой кислоты, в которых кодирующие последовательности антитела и любые другие желаемые последовательности фланкированы областями, которые способствуют гомологичной рекомбинации в желаемом сайте в геноме, что обеспечивает интросомную экспрессию антитела, кодирующего нуклеиновые кислоты (Koller and Smithies, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:8932–8935; Zijlstra *et al.*, 1989, *Nature* 342:435–438).

**[00334]** Доставка нуклеиновых кислот субъекту может быть либо прямой, и в этом случае субъект непосредственно подвергается воздействию нуклеиновых кислот или векторов, несущих нуклеиновую кислоту, либо непрямой, и в этом случае клетки сначала трансформируют нуклеиновыми кислотами *in vitro*, затем трансплантируют субъекту. Эти два подхода известны соответственно как генная терапия *in vivo* или *ex vivo*.

**[00335]** В конкретном варианте осуществления нуклеотидные последовательности (например, ДНК или мРНК) непосредственно вводят *in vivo*, где последовательности экспрессируются с получением закодированного продукта. Этого можно достичь с помощью любого из множества способов, известных в данной области, например посредством конструирования их в составе соответствующего вектора экспрессии нуклеиновых кислот и введения вектора таким образом, чтобы последовательности становились внутриклеточными, например посредством инфицирования с использованием дефектных или ослабленных ретровирусных или других вирусных векторов (см. патент США № 4,980,286), или посредством прямой инъекции невооруженным ДНК или мРНК, или посредством бомбардировки микрочастицами (например, генная пушка; Biolistic, Dupont) или покрытие с липидами или рецепторами клеточной поверхности или трансфекционными агентами, инкапсуляция в липосомах, микрочастицах или микрокапсулах, или посредством введения их в связке с пептидом, который, как известно, попадает в ядро, введение в связке с лигандом, подверженным рецептор-опосредованному эндоцитозу (см., например, Wu and Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429–4432) (который можно использовать для нацеливания на типы клеток-мишеней, специфически экспрессирующих рецепторы) и т. д. В другом варианте осуществления могут быть образованы комплексы нуклеиновых кислот-лигандов, в которых лиганд содержит фузогенный вирусный пептид для разрушения эндосомов, что позволяет нуклеиновой кислоте избежать лизосомального разложения. В еще одном варианте осуществления нуклеиновая кислота может быть нацелена *in vivo* на специфическое для клеток поглощение и экспрессию посредством нацеливания на конкретный рецептор (см., например, патентные публикации PCT WO 92/06180; WO 92/22635; WO 92/20316; W093/14188, WO 93/20221). Альтернативно нуклеиновая кислота может быть введена внутриклеточно и встроена в ДНК клетки-хозяина для экспрессии с помощью гомологичной рекомбинации (Koller and Smithies, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932–8935; и Zijlstra *et al.*, 1989, Nature 342:435–438).

- [00336]** В конкретном варианте осуществления используются вирусные векторы, содержащие нуклеотидные последовательности, кодирующие антитело. Например, можно использовать ретровирусный вектор (см. Miller *et al.*, 1993, Meth. Enzymol. 217:581–599). Эти ретровирусные векторы содержат компоненты, необходимые для
- 5 правильной упаковки вирусного генома и интеграции в ДНК клетки-хозяина. Последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие антитело, которое должно быть использовано в генной терапии, можно клонировать в один или более векторов, что облегчает доставку гена субъекту. Более подробная информация о ретровирусных векторах приведена в Boesen *et al.*, 1994, Biotherapy 6:291–302, где описано
- 10 использование ретровирусного вектора для доставки гена MDR1 в гематопозитические стволовые клетки, чтобы сделать стволовые клетки более устойчивыми к химиотерапии. Другие ссылки, иллюстрирующие применение ретровирусных векторов в генной терапии: Clowes *et al.*, 1994, J. Clin. Invest. 93:644–651; Klein *et al.*, 1994, Blood 83:1467–1473; Salmons and Gunzberg, 1993, Human Gene Therapy 4:129–141; и Grossman and Wilson, 1993, Curr. Opin. in Genetics and Devel. 3:110–114.
- 15 **[00337]** Аденовирусы представляют собой другие вирусные векторы, которые можно использовать в рекомбинантном производстве антител. Аденовирусы особенно привлекательны для доставки генов в респираторный эпителий. Аденовирусы естественным образом инфицируют респираторный эпителий, где они вызывают легкое
- 20 заболевание. Другими мишенями для систем доставки на основе аденовируса являются печень, центральная нервная система, эндотелиальные клетки и мышцы. Преимущество аденовирусов заключается в том, что они способны проникать в неразделительные клетки. В Kozarsky and Wilson, 1993, Current Opinion in Genetics and Development 3:499–503 представлен обзор генной терапии на основе аденовируса. В Bout *et al.*, 1994,
- 25 Human Gene Therapy 5:3–10 продемонстрировано использование аденовирусных векторов для переноса генов в респираторный эпителий обезьян. Другие случаи применения аденовирусов в генной терапии можно найти в Rosenfeld *et al.*, 1991, Science 252:431–434; Rosenfeld *et al.*, 1992, Cell 68:143–155; Mastrangeli *et al.*, 1993, J. Clin. Invest. 91:225–234; патентной публикации PCT W094/12649; и Wang *et al.*, 1995,
- 30 Gene Therapy 2:775–783. В конкретном варианте осуществления используются аденовирусные векторы.
- [00338]** Также можно использовать аденоассоциированный вирус (AAV) (Walsh *et al.*, 1993, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 204:289–300; и патент США 5,436,146). В конкретном варианте осуществления векторы AAV используют для экспрессии антитела к IL-1 $\beta$ , как

предложено в настоящем документе. В определенных вариантах осуществления AAV содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую домен VH. В других вариантах осуществления AAV содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую домен VL. В определенных вариантах осуществления AAV содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую домен VH и домен VL. В некоторых вариантах осуществления способов, предложенных в настоящем документе, субъекту вводят AAV, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую домен VH, и AAV, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую домен VL. В других вариантах осуществления субъекту вводят AAV, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую домен VH и домен VL. В определенных вариантах осуществления домены VH и VL сверхэкспрессируются.

**[00339]** Другой подход к генной терапии включает в себя перенос гена в клетки в культуре тканей такими способами, как электропорация, липофекция, опосредованная фосфатом кальция трансфекция или вирусная инфекция. Как правило, способ переноса включает перенос селективного маркера в клетки. Затем клетки помещают в селекцию для выделения клеток, которые собирают и экспрессируют перенесенный ген. Затем эти клетки доставляют субъекту.

**[00340]** В этом варианте осуществления нуклеиновую кислоту вводят в клетку перед введением *in vivo* полученной рекомбинантной клетки. Такое введение можно осуществлять любым способом, известным в данной области, включая, без ограничений, трансфекцию, электропорацию, микроинъекцию, инфекцию вирусного или бактериофагового вектора, содержащего последовательности нуклеиновых кислот, слияние клеток, хромосомный перенос генов, опосредованный микроклетками перенос генов, слияние сферопластов и т. д. В данной области известно множество методик введения чужеродных генов в клетки (см., например, Loeffler and Behr, 1993, Meth. Enzymol. 217:599–618; Cohen *et al.*, 1993, Meth. Enzymol. 217:618–644; Clin. Pharma. Ther. 29:69–92 (1985); их можно использовать в соответствии со способами, предложенными в настоящем документе, при условии, что функции, необходимые для развития, и физиологические функции клеток-реципиентов не разрушаются. Методика должна обеспечивать стабильный перенос нуклеиновой кислоты в клетку, так чтобы нуклеиновая кислота экспрессировалась клеткой, такой как наследственная и экспрессируемая ее клеточным потомством.

**[00341]** Полученные рекомбинантные клетки могут быть доставлены субъекту различными способами, известными в данной области техники. Рекомбинантные клетки крови (например, гематопозитические стволовые клетки или клетки-

предшественники) можно вводить внутривенно. Количество клеток, предусмотренных для применения, зависит от требуемого эффекта, состояния пациента и т. д. и может быть определено специалистом в данной области техники.

5 [00342] Клетки, в которые можно вводить нуклеиновую кислоту для целей генной терапии, охватывают любые желаемые, доступные типы клеток и включают в себя, без ограничений, эпителиальные клетки, эндотелиальные клетки, кератиноциты, фибробласты, мышечные клетки, гепатоциты; клетки крови, такие как Т-лимфоциты, В-лимфоциты, моноциты, макрофаги, нейтрофилы, эозинофилы, мегакариоциты, гранулоциты; различные стволовые клетки или клетки-предшественники, в частности гематопоэтические стволовые клетки или клетки-предшественники, например

10 полученные из костного мозга, пуповины, периферической крови, печени плода и т. д.

[00343] В конкретном варианте осуществления клетка, используемая для генной терапии, является аутологичной субъекту.

15 [00344] В одном из вариантов осуществления, в котором рекомбинантные клетки используются в генной терапии, последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие антитело, вводят в клетки таким образом, что они экспрессируются клетками или их потомством, а рекомбинантные клетки затем вводят *in vivo* для терапевтического эффекта. В конкретном варианте осуществления используют стволовые клетки или клетки-предшественники. Любые стволовые клетки и/или клетки-предшественники,

20 которые могут быть выделены и поддерживаться *in vitro*, потенциально могут использоваться в соответствии с данным вариантом осуществления представленных в настоящем документе способов (см., например, патентную публикацию PCT WO 94/08598; Stemple and Anderson, 1992, Cell 71:973–985; Rheinwald, 1980, Meth. Cell Bio. 21A:229; и Pittelkow and Scott, 1986, Mayo Clinic Proc. 61:771).

25 [00345] В конкретном варианте осуществления нуклеиновая кислота, подлежащая введению в целях генной терапии, содержит индуцибельный промотор, функционально связанный с кодирующей областью, так что экспрессия нуклеиновой кислоты контролируется путем контроля наличия или отсутствия соответствующего индуктора транскрипции.

### 30 5.9. Диагностические анализы и способы

[00346] Меченые антитела и их производные и аналоги, которые иммуноспецифически связываются с антигеном IL-1 $\beta$ , можно использовать в диагностических целях для обнаружения, диагностики или мониторинга IL-1 $\beta$ -опосредованного заболевания. Таким образом, в настоящем документе предложены

способы обнаружения IL-1 $\beta$ -опосредованного заболевания, включающие: (а) анализ экспрессии антигена IL-1 $\beta$  в образце клеток или ткани субъекта с использованием одного или более антител, предложенных в настоящем документе, которые иммуноспецифически связываются с антигеном IL-1 $\beta$ ; и (b) сравнение уровня антигена IL-1 $\beta$  с контрольным уровнем, например уровнями в образцах нормальной ткани (например, от пациента, не имеющего IL-1 $\beta$ -опосредованного заболевания, или от того же пациента до начала заболевания), причем увеличение проанализированного уровня антигена IL-1 $\beta$  по сравнению с контрольным уровнем антигена IL-1 $\beta$  свидетельствует об IL-1 $\beta$ -опосредованном заболевании.

10 **[00347]** В настоящем документе также предложен диагностический анализ для диагностики IL-1 $\beta$ -опосредованного заболевания, включающий в себя: (а) анализ уровня антигена IL-1 $\beta$  в образце клеток или ткани субъекта с использованием одного или более антител, предложенных в настоящем документе, которые иммуноспецифически связываются с антигеном IL-1 $\beta$ ; и (b) сравнение уровня антигена IL-1 $\beta$  с контрольным уровнем, например уровнями в образцах нормальной ткани, причем увеличение проанализированного уровня антигена IL-1 $\beta$  по сравнению с контрольным уровнем антигена IL-1 $\beta$  свидетельствует об IL-1 $\beta$ -опосредованном заболевании. В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложен способ лечения IL-1 $\beta$ -опосредованного заболевания у субъекта, включающий: (а)

20 анализ уровня антигена IL-1 $\beta$  в образце клеток или ткани субъекта с использованием одного или более антител, предложенных в настоящем документе, которые иммуноспецифически связываются с антигеном IL-1 $\beta$ ; и (b) сравнение уровня антигена IL-1 $\beta$  с контрольным уровнем, например уровнями в образцах нормальной ткани, причем увеличение проанализированного уровня антигена IL-1 $\beta$  по сравнению с контрольным уровнем антигена IL-1 $\beta$  свидетельствует об IL-1 $\beta$ -опосредованном заболевании. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает

25 (с) введение эффективного количества антитела, предложенного в настоящем документе, субъекту с идентифицированным наличием IL-1 $\beta$ -опосредованного заболевания. Более точный диагноз IL-1 $\beta$ -опосредованного заболевания может

30 позволить медицинским работникам раньше применить профилактические меры или агрессивное лечение, таким образом предотвращая развитие или дальнейшее прогрессирование IL-1 $\beta$ -опосредованного заболевания.

**[00348]** Антитела, предложенные в настоящем документе, можно использовать для анализа уровней антигена IL-1 $\beta$  в биологическом образце с использованием

классических иммуногистологических способов, как описано в настоящем документе, или известных специалистам в данной области (например, см. Jalkanen *et al.*, 1985, J. Cell. Biol. 101:976–985; и Jalkanen *et al.*, 1987, J. Cell. Biol. 105:3087–3096). Другие способы на основе антител, пригодные для обнаружения экспрессии гена белка, включают иммуноанализы, такие как твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) и радиоиммунный анализ (РИА). Подходящие метки для анализа антител известны в данной области техники и включают в себя ферментные метки, такие как глюкозооксидаза; радиоизотопы, такие как йод ( $^{125}\text{I}$ ,  $^{121}\text{I}$ ), углерод ( $^{14}\text{C}$ ), серу ( $^{35}\text{S}$ ), тритий ( $^3\text{H}$ ), индий ( $^{121}\text{In}$ ) и технеций ( $^{99}\text{Tc}$ ); люминесцентные метки, такие как люминол; и флуоресцентные метки, такие как флуоресцеин и родамин, и биотин.

**[00349]** Один аспект, предложенный в настоящем документе, представляет собой обнаружение и диагностику  $\text{IL-1}\beta$ -опосредованного заболевания у человека. В одном варианте осуществления диагностика включает в себя: а) введение (например, парентерально, подкожно или внутривенно) субъекту эффективного количества меченого антитела, которое иммуноспецифически связывается с антигеном  $\text{IL-1}\beta$ ; б) выжидание интервала времени после введения, чтобы меченое антитело сконцентрировалось в местах тела субъекта, где экспрессируется антиген  $\text{IL-1}\beta$  (и для клиренса несвязанной меченой молекулы до фонового уровня); в) определение фонового уровня и г) обнаружение меченого антитела у субъекта, причем обнаружение меченого антитела в количестве выше фонового уровня указывает на то, что субъект имеет  $\text{IL-1}\beta$ -опосредованное заболевание. Фоновый уровень можно определять различными способами, включая сравнение количества обнаруженной меченой молекулы со стандартным значением, ранее определенным для конкретной системы.

**[00350]** В данной области техники будет понятно, что размер субъекта и используемой системы визуализации определяет количество контрастного вещества, необходимого для получения диагностических изображений. В случае радиоизотопного фрагмента для субъекта-человека количество инъецированной радиоактивности обычно находится в диапазоне от около 5 до 20 милликюри  $^{99}\text{Tc}$ . Затем меченое антитело будет накапливаться в местоположении клеток, которые содержат конкретный белок.

Визуализация опухоли *in vivo* описана в S.W. Burchiel *et al.*, “Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibodies and Their Fragments”. (Chapter 13 in Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancer, S.W. Burchiel and B.A. Rhodes, eds., Masson Publishing Inc. (1982).

**[00351]** В зависимости от нескольких переменных, включая тип используемой метки и способ введения, интервал времени после введения для обеспечения концентрации меченого антитела в сайтах субъекта и для несвязанного меченого антитела, подлежащего очистке до фонового уровня, составляет от 6 до 48 часов или от 6 до 24 часов или от 6 до 12 часов. В другом варианте осуществления интервал времени после введения составляет от 5 до 20 дней или от 5 до 10 дней.

**[00352]** В одном варианте осуществления мониторинг IL-1 $\beta$ -опосредованного заболевания осуществляют посредством повторения способа диагностики IL-1 $\beta$ -опосредованного заболевания, например через месяц после первоначальной постановки диагноза, через шесть месяцев после первоначальной постановки диагноза, через один год после первоначальной постановки диагноза и т. д.

**[00353]** Наличие меченой молекулы может быть обнаружено у субъекта с использованием способов сканирования *in vivo*, известных в данной области. Эти способы зависят от типа используемой метки. Специалисты в данной области техники смогут определить соответствующий способ обнаружения конкретной метки. Способы и устройства, которые можно использовать в диагностических способах, предложенных в настоящем документе, включают, без ограничений, компьютерную томографию (КТ), сканирование всего тела, такую как позиционно-эмиссионная томография (ПЭТ), магнитная резонансная визуализация (МР-визуализация) и ультразвуковое исследование.

**[00354]** В конкретном варианте осуществления молекула мечена радиоизотопом и детектируется у пациента с использованием чувствительного к излучению хирургического инструмента (Thurston *et al.*, патент США № 5,441,050). В другом варианте осуществления молекула мечена флуоресцентным соединением и детектируется у пациента с помощью флуоресцентного сканирующего инструмента. В другом варианте осуществления молекула мечена позитроном, испускающим металл, и детектируется у пациента с использованием позитронно-эмиссионной томографии. В еще одном варианте осуществления молекула мечена парамагнитной меткой и обнаружена у пациента с помощью магнитной резонансной визуализации (МР-визуализация).

### **5.10 Наборы**

**[00355]** В настоящем документе также предложены наборы, содержащие антитело (например, антитело к IL-1 $\beta$ ), предложенное в настоящем документе, или композицию (например, фармацевтическую композицию), упакованную в приемлемый упаковочный

материал. Набор необязательно включает в себя этикетку или вкладыш в упаковку, содержащие описание компонентов или инструкций для применения компонентов *in vitro*, *in vivo* или *ex vivo* в нем.

5 **[00356]** Термин «упаковочный материал» относится к физической структуре, содержащей компоненты набора. Упаковочный материал может удерживать компоненты стерильно и может быть изготовлен из материала, обычно используемого для таких целей (например, бумаги, гофрированного волокна, стекла, пластика, фольги, ампулы, флаконы, пробирок и т. д.).

10 **[00357]** В данном документе предложены этикетки или вставки. Этикетки или вкладыши включают в себя «печатный материал», например бумагу или картон, отдельные или прикрепленные к компоненту, набору или упаковочному материалу (например, коробке) или прикрепленные, например, к ампуле, пробирке или флакону, содержащему компонент набора. Этикетки или вкладыши могут дополнительно включать в себя машиночитаемый носитель, такой как диск (например, жесткий диск, 15 карта, диск памяти), оптический диск, такой как CD- или DVD-ROM/RAM, DVD, MP3, магнитная лента или электрическая магнитную ленту, или электрический носитель, такой как RAM и ROM или их гибриды, например магнитный/оптический носитель, флеш-носитель или карты памяти. Этикетки или вставки могут включать в себя информацию идентифицирующую информацию производителя, номера серии, 20 местоположение производителя и дату.

**[00358]** Наборы, обеспеченные в настоящем документе, могут дополнительно включать в себя другие компоненты. Каждый компонент набора может быть заключен в отдельный контейнер, а все различные контейнеры могут находиться в одной упаковке. Наборы также могут быть выполнены с возможностью охлаждения. Набор также может 25 быть выполнен с возможностью содержания антител, предложенных в настоящем документе, или клеток, содержащих нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела, обеспеченные в настоящем документе. Клетки в наборе можно поддерживать в соответствующих условиях хранения до готовности к применению.

30 **[00359]** В настоящем документе также предложены панели антител, которые иммуноспецифически связываются с антигеном IL-1 $\beta$ . В конкретных вариантах осуществления в настоящем документе предложены панели антител, отличающихся константами скорости ассоциации, константами скорости диссоциации, аффинностью к антигену IL-1 $\beta$  и/или специфичностью к антигену IL-1 $\beta$ . В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложены панели, содержащие около 10,

предпочтительно около 25, около 50, около 75, около 100, около 125, около 150, около 175, около 200, около 250, около 300, около 350, около 400, около 450, около 500, около 550, около 600, около 650, около 700, около 750, около 800, около 850, около 900, около 950 или около 1000 антител или более. Панели антител можно использовать, например

5 в 96-луночных или 384-луночных планшетах, например для таких анализов, как ELISA.

**[00360]** Все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, если не указано иное, имеют общепринятые значения, понятные любому специалисту в области техники, к которой относится данное изобретение. В настоящем документе описаны приемлемые способы и материалы, хотя для проверки или анализа

10 изобретения можно использовать способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в настоящем документе.

**[00361]** В настоящем документе числовые значения часто представлены в формате диапазона в настоящем документе. Использование формата диапазона просто предназначено для удобства и краткости и не должно толковаться как жесткое

15 ограничение объема изобретения, если контекст явно не указывает иное.

Соответственно, в настоящем документе применение диапазона явным образом включает в себя все возможные поддиапазоны, все отдельные числовые значения в пределах этого диапазона и все числовые значения или числовые диапазоны, включая целые числа в пределах таких диапазонов и дробные части значений или целых чисел в

20 пределах таких диапазонов, если из контекста явно не следует иное. Эта конструкция применяется независимо от ширины диапазона и во всех контекстах в этом патентном документе. Таким образом, например, ссылка на диапазон 90–100% включает в себя 91–99%, 92–98%, 93–95%, 91–98%, 91–97%, 91–96%, 91–95%, 91–94%, 91–93% и т. д.

Ссылка на диапазон 90–100% также включает в себя 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95%,

25 97% и т. д., а также 91,1%, 91,2%, 91,3%, 91,4%, 91,5% и т. д. 92,1%, 92,2%, 92,3%, 92,4%, 92,5% и т. д.

**[00362]** Кроме того, ссылка на диапазон 1–3, 3–5, 5–10, 10–20, 20–30, 30–40, 40–50, 50–60, 60–70, 70–80, 80–90, 90–100, 100–110, 110–120, 120–130, 130–140, 140–150, 150–160, 160–170, 170–180, 180–190, 190–200, 200–225, 225–250 включает в себя 1, 2, 3, 4, 5,

30 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 и т. д. В другом примере ссылка на диапазон 25–250, 250–500, 500–1000, 1000–2500, 2500–5000, 5000–25 000, 25 000–50 000 включает в себя любое числовое значение или диапазон в пределах или охватывающий такие значения, например 25, 26, 27, 28, 29...250, 251, 252, 253, 254...500, 501, 502, 503, 504... и т. д.

**[00363]** В данном документе также использован ряд диапазонов. Использование ряда диапазонов включает в себя комбинации верхнего и нижнего диапазонов для обеспечения другого диапазона. Эта конструкция применяется независимо от ширины диапазона и во всех контекстах в этом патентном документе. Так, например, ссылка на ряд диапазонов, такой как 5–10, 10–20, 20–30, 30–40, 40–50, 50–75, 75–100, 100–150, включает в себя диапазоны, такие как 5–20, 5–30, 5–40, 5–50, 5–75, 5–100, 5–150, и 10–30, 10–40, 10–50, 10–75, 10–100, 10–150, и 20–40, 20–50, 20–75, 20–100, 20–150, и так далее.

**[00364]** Для краткости в настоящем документе применяются определенные сокращения. Одним из примеров является однобуквенное сокращение, обозначающее аминокислотные остатки. Ниже приводятся аминокислоты и их соответствующие трехбуквенные и однобуквенные сокращения:

аланин	Ala	(A)
аргинин	Arg	(R)
аспарагин	Asn	(N)
аспарагиновая кислота	Asp	(D)
цистеин	Cys	(C)
глутаминовая кислота	Glu	(E)
глутамин	Gln	(Q)
глицин	Gly	(G)
гистидин	His	(H)
изолейцин	Ile	(I)
лейцин	Leu	(L)
лизин	Lys	(K)
метионин	Met	(M)
фенилаланин	Phe	(F)
пролин	Pro	(P)
серин	Ser	(S)
треонин	Thr	(T)
триптофан	Trp	(W)
тирозин	Tyr	(Y)

валин

Val

(V)

[00365] Изобретение по существу представлено в настоящем документе с применением утвердительных формулировок для описания множества вариантов осуществления. Изобретение также, в частности, включает в себя варианты осуществления, где полностью или частично исключается конкретный объект изобретения, например вещества или материалы, этапы и условия способы, протоколы, процедуры, анализы или способы анализа. Поэтому, несмотря на то что в изобретении по существу не представлены пояснения в отношении того, что именно не включено в изобретение, аспекты, которые в прямой форме не включены в изобретение, тем не менее, описаны в настоящем документе.

10 [00366] Был описан ряд вариантов осуществления изобретения. Тем не менее следует понимать, что возможно осуществления различных модификаций без отступления от сущности и объема изобретения. Соответственно, приведенные ниже примеры предназначены для иллюстрации, но не ограничивают объем изобретения, описанный в формуле изобретения.

## 15 6. ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

[00367] В данном изобретении предложены следующие не имеющие ограничительного характера варианты осуществления.

[00368] В одном наборе вариантов осуществления предложены:

1. Антитело, которое связывает IL-1 $\beta$ , содержащее:

20 (1) (i) VH, содержащую CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, имеющие аминокислотную последовательность CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH соответственно из VH, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; и (ii) VL, содержащую CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, имеющие аминокислотную последовательность CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL  
25 соответственно из VL, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8;

(2) (i) VH, содержащую CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, имеющие аминокислотную последовательность CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH соответственно из VH, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID  
30 NO: 9; и (ii) VL, содержащую CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, имеющие аминокислотную последовательность CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL соответственно из VL, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10; или

- (3) (i) VH, содержащую CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, имеющие аминокислотную последовательность CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH соответственно из VH, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11; и (ii) VL, содержащую CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, имеющие аминокислотную последовательность CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL соответственно из VL, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12.
- 5
2. Антитело по варианту осуществления 1, (i) причем аминокислотные последовательности CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL соответствуют системе нумерации по Кабату; (ii) при этом аминокислотные последовательности CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL соответствуют системе нумерации по Чотиа; (iii) причем аминокислотные последовательности CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL соответствуют системе нумерации по AbM; (iv) при этом аминокислотные последовательности CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL соответствуют системе нумерации по Contact и/или (v) при этом аминокислотные последовательности CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL соответствуют системе нумерации по IMGT.
- 10
- 15
- 20 3. Антитело, которое связывает IL-1 $\beta$ , содержащее:
- (1) (i) VH, содержащую CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 67 и SEQ ID NO: 85; CDR2 VH, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 68 и SEQ ID NO: 86; CDR3 VH, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 69 и SEQ ID NO: 87; и
- 25
- (ii) VL, содержащую CDR1 VL, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 70 и SEQ ID NO: 88; CDR2 VL, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 71 и SEQ ID NO: 89; CDR3 VL,
- 30

имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 72 и SEQ ID NO: 90;

- (2) (i) VH, содержащую CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 73 и SEQ ID NO: 91; CDR2 VH, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 74 и SEQ ID NO: 92; CDR3 VH, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 75 и SEQ ID NO: 93;
- и
- (ii) VL, содержащую CDR1 VL, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 76 и SEQ ID NO: 94; CDR2 VL, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 77 и SEQ ID NO: 95; CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 78 и SEQ ID NO: 96;
- или
- (3) (i) VH, содержащую CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 79 и SEQ ID NO: 97; CDR2 VH, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 80 и SEQ ID NO: 98; CDR3 VH, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 81 и SEQ ID NO: 99;
- и
- (ii) VL, содержащую CDR1 VL, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 82 и SEQ ID NO: 100; CDR2 VL, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 83 и SEQ ID NO: 101; CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 84 и SEQ ID NO: 102.

4. Антитело, которое связывает IL-1 $\beta$ , содержащее:

- 5 (1) (i) VH, содержащую CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13; CDR2 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14; CDR3 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15; и
- 10 (ii) VL, содержащую CDR1 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16; CDR2 VL, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 17; CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18;
- 15 (2) (i) VH, содержащую CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19; CDR2 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; CDR3 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21; и
- (ii) VL, содержащую CDR1 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22; CDR2 VL, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 23; CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24;
- 20 (3) (i) VH, содержащую CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25; CDR2 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26; CDR3 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27; и
- 25 (ii) VL, содержащую CDR1 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28; CDR2 VL, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 29; CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30;
- 30 (4) (i) VH, содержащую CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31; CDR2 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32; CDR3 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33; и
- (ii) VL, содержащую CDR1 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34; CDR2 VL, имеющую

аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 35;  
CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:  
36;

- 5 (5) (i) VH, содержащую CDR1 VH, имеющую аминокислотную  
последовательность SEQ ID NO: 37; CDR2 VH, имеющую  
аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38; CDR3 VH,  
имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39; и  
10 (ii) VL, содержащую CDR1 VL, имеющую аминокислотную  
последовательность SEQ ID NO: 40; CDR2 VL, имеющую  
аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 41;  
CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:  
42;
- 15 (6) (i) VH, содержащую CDR1 VH, имеющую аминокислотную  
последовательность SEQ ID NO: 43; CDR2 VH, имеющую  
аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44; CDR3 VH,  
имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45; и  
20 (ii) VL, содержащую CDR1 VL, имеющую аминокислотную  
последовательность SEQ ID NO: 46; CDR2 VL, имеющую  
аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 47;  
CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:  
48;
- 25 (7) (i) VH, содержащую CDR1 VH, имеющую аминокислотную  
последовательность SEQ ID NO: 49; CDR2 VH, имеющую  
аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50; CDR3 VH,  
имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51; и  
30 (ii) VL, содержащую CDR1 VL, имеющую аминокислотную  
последовательность SEQ ID NO: 52; CDR2 VL, имеющую  
аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 53;  
CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:  
54;
- (8) (i) VH, содержащую CDR1 VH, имеющую аминокислотную  
последовательность SEQ ID NO: 55; CDR2 VH, имеющую  
аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56; CDR3 VH,  
имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57; и

- (ii) VL, содержащую CDR1 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58; CDR2 VL, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 59; CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60;
- 5
- (9) (i) VH, содержащую CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61; CDR2 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62; CDR3 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63; и
- 10
- (ii) VL, содержащую CDR1 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64; CDR2 VL, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 65; CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66;
- 15
- (10) (i) VH, содержащую CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67; CDR2 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68; CDR3 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69; и
- 20
- (ii) VL, содержащую CDR1 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70; CDR2 VL, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 71; CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 72;
- 25
- (11) (i) VH, содержащую CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73; CDR2 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74; CDR3 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75; и
- 30
- (ii) VL, содержащую CDR1 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76; CDR2 VL, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 77; CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 78;
- (12) (i) VH, содержащую CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79; CDR2 VH, имеющую

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80; CDR3 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81; и (ii) VL, содержащую CDR1 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82; CDR2 VL, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 83; CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84;

5

(13) (i) VH, содержащую CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85; CDR2 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 86; CDR3 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 87; и (ii) VL, содержащую CDR1 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88; CDR2 VL, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 89; CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90;

10

15

(14) (i) VH, содержащую CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91; CDR2 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92; CDR3 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93; и (ii) VL, содержащую CDR1 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 94; CDR2 VL, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 95; CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 96; или

20

25

(15) (i) VH, содержащую CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 97; CDR2 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 98; CDR3 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99; и (ii) VL, содержащую CDR1 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100; CDR2 VL, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 101; CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102.

30

5. Антитело по любому из вариантов осуществления 1–4, причем антитело дополнительно содержит одну или более каркасных областей в соответствии с SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и/или SEQ ID NO: 12.
- 5 6. Антитело по любому из вариантов осуществления 1–5, причем:
- (i) антитело содержит VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8;
- (ii) антитело содержит VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10;
- 10 или
- (iii) антитело содержит VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, и VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12.
7. Антитело по любому из вариантов осуществления 1–6, которое представляет собой гуманизированное антитело.
- 15 8. Антитело по любому из вариантов осуществления 1–7, которое представляет собой антитело IgG.
9. Антитело по варианту осуществления 8, причем IgG представляет собой антитело IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.
- 20 10. Антитело по любому из вариантов осуществления 1–9, которое содержит легкую каппа-цепь.
11. Антитело по любому из вариантов осуществления 1–9, которое содержит легкую лямбда-цепь.
12. Антитело по любому из вариантов осуществления 1–11, которое содержит мутантную область Fc.
- 25 13. Антитело по варианту осуществления 12, причем мутантная область Fc содержит мутации M252Y/S254T/T256E (YTE).
14. Антитело по любому из вариантов осуществления 1–13, которое представляет собой моноклональное антитело.
- 30 15. Антитело по любому из вариантов осуществления 1–14, которое связывает антиген II-1 $\beta$ .
16. Антитело по любому из вариантов осуществления 1–14, которое связывает эпитоп II-1 $\beta$ .

17. Антитело по любому из вариантов осуществления 1–14, которое специфически связывается с IL-1 $\beta$ .
- 5 18. Антитело по любому из вариантов осуществления 1–17, в котором CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL образуют сайт связывания для антигена IL-1 $\beta$ .
19. Антитело по любому из вариантов осуществления 1–15, в котором CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL образуют сайт связывания для эпитопа IL-1 $\beta$ .
- 10 20. Антитело по любому из вариантов осуществления 1–19, которое является мультиспецифическим.
21. Антитело по варианту осуществления 20, которое способно связывать по меньшей мере два антигена.
22. Антитело по варианту осуществления 20, которое способно связывать по меньшей мере три антигена.
- 15 23. Антитело по варианту осуществления 20, которое способно связывать по меньшей мере четыре антигена.
24. Антитело по варианту осуществления 20, которое способно связывать по меньшей мере пять антигенов.
- 20 25. Связывающая молекула, содержащая антитело по любому из вариантов осуществления 1–24, причем антитело генетически слито или химически конъюгировано с агентом.
26. Нуклеиновая кислота, кодирующая антитело по любому из вариантов осуществления 1–24.
27. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по варианту осуществления 26.
- 25 28. Клетка-хозяин, содержащая вектор по варианту осуществления 27.
29. Набор, содержащий вектор по варианту осуществления 27 и упаковку для него.
30. Набор, содержащий антитело по любому из вариантов осуществления 1–24 и упаковку для него.
- 30 31. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из вариантов осуществления 1–24 и один или более фармацевтически приемлемых эксципиентов.
32. Способ получения фармацевтической композиции по варианту осуществления 31, включающий объединение антитела с одним или более фармацевтически приемлемыми эксципиентами для получения фармацевтической композиции.

33. Способ ингибирования IL-1 $\beta$  или IL-1 $\beta$ -опосредованной сигнализации в клетке, включающий приведение клетки в контакт с антителом по любому из вариантов осуществления 1–24.
- 5 34. Способ ингибирования IL-1 $\beta$ -индуцированной продукции IL-6, ENA-78 (CXCL5) и/или G-CSF в клетке, включающий приведение клетки в контакт с антителом по любому из вариантов осуществления 1–24.
35. Способ снижения продукции IL-6, ENA-78 (CXCL5) и/или G-CSF в клетке, включающий приведение клетки в контакт с антителом по любому из вариантов осуществления 1–24.
- 10 36. Способ ингибирования роста или пролиферации экспрессирующих IL-1 $\beta$  клеток, включающий приведение клеток в контакт с антителом по любому из вариантов осуществления 1–24.
37. Способ по любому из вариантов осуществления 33–36, в котором клетка или клетки находятся в организме субъекта, имеющего заболевание или
- 15 расстройство.
38. Способ ингибирования IL-1 $\beta$  у субъекта, включающий введение субъекту антитела по любому из вариантов осуществления 1–24.
39. Способ лечения заболевания или расстройства у субъекта, включающий введение субъекту антитела по любому из вариантов осуществления 1–24.
- 20 40. Способ по варианту осуществления 37 или 39, в котором заболевание или расстройство представляет собой IL-1 $\beta$ -ассоциированное заболевание или расстройство.
41. Способ по варианту осуществления 40, в котором IL-1 $\beta$ -ассоциированное заболевание или расстройство представляет собой воспалительное заболевание
- 25 или расстройство.
42. Способ по варианту осуществления 40, в котором IL-1 $\beta$ -ассоциированное заболевание или расстройство представляет собой рак.
43. Способ по варианту осуществления 42, в котором рак представляет собой рак легкого.
- 30 44. Способ по варианту осуществления 43, в котором рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого, причем необязательно немелкоклеточный рак легкого достиг стадии 0, стадии 1, стадии 2, стадии 3 или стадии 4.
45. Способ по варианту осуществления 42, в котором рак представляет собой рак почки.

46. Способ по варианту осуществления 45, в котором рак почки представляет собой почечноклеточный рак.
47. Способ по варианту осуществления 46, в котором почечноклеточный рак достиг стадии 1, стадии 2 или стадии 3.
- 5 48. Выделенный белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает hIL-1 $\beta$ , причем указанный антигенсвязывающий домен связывается с эпитопом на hIL-1 $\beta$ , имеющем последовательность, выбранную из эпитопов, идентифицированных на Фиг. 1.
49. Выделенный белок по варианту осуществления 48, который связывается с тем (-и) же эпитопом (-ами), что и 05H21A.
- 10 50. Выделенный белок по варианту осуществления 48, который связывается с тем (-и) же эпитопом (-ами), что и 15N14A.
51. Выделенный белок по варианту осуществления 48, который связывается с тем (-и) же эпитопом (-ами), что и 08F17A.

15 **[00369]** В настоящем документе описаны конкретные варианты осуществления данного изобретения. После прочтения вышеприведенного описания лицам, работающим в данной области, станет очевидно существование вариаций описанных вариантов осуществления, и ожидается, что специалисты в данной области могут использовать такие вариации в зависимости от обстоятельств. Соответственно, 20 предполагается, что изобретение может быть реализовано на практике образом, отличным от конкретно описанного в настоящем документе, и что изобретение включает в себя все модификации и эквиваленты объекта изобретения, указанные в прилагаемой формуле изобретения, в соответствии с действующим законодательством. Более того, данное изобретение охватывает любую комбинацию вышеописанных 25 элементов во всех возможных вариациях, если в настоящем документе не указано иное или если это явно не противоречит контексту. Был описан ряд вариантов осуществления изобретения. Тем не менее следует понимать, что возможно осуществления различных модификаций без отступления от сущности и объема изобретения. Соответственно, описания, представленные в разделе примеров, предназначены для иллюстрации, но не 30 для ограничения объема изобретения, описанного в формуле изобретения.

## 7. ПРИМЕРЫ

**[00370]** Ниже приводится описание различных способов и материалов, применяемых в исследовании, и они приводятся для обеспечения специалиста в данной области полным изложением и описанием того, как выполнять и применять настоящее

описание, и не призваны ограничивать объем того, что авторы изобретения считают своим изобретением, и не предназначены для представления того, что приведенные ниже эксперименты представляют собой все или только выполненные эксперименты. Следует понимать, что необязательно реализовались те описания примеры, которых  
 5 приведены в настоящем времени, а напротив, описанные примеры можно выполнять для получения данных и т. п., связанных с идеями настоящего описания. Были приложены усилия для обеспечения точности использованных чисел (например, количеств, процентов и т. п.), но следует учитывать некоторые погрешности и отклонения в экспериментах.

### 10 7.1. Пример 1. Конструирование, последовательность и структура молекулы мАт к IL-1 $\beta$

**[00371]** Были получены высокоаффинные и эффективные молекулы антител к IL-1 $\beta$ , которые способны нейтрализовать сигнальный путь IL-1 $\beta$ . Мероприятие по иммунизации посредством ДНК, кодирующей вариант человеческого IL-1 $\beta$  со  
 15 сниженной биоактивностью (D145K), проводили на трансгенной мышинной платформе Alivamab. Три лучших варианта антител (клоны: 05H21A, 15N14A и 08F17A), описанные в настоящем документе, были подвергнуты модификации области Fc таким образом, чтобы она включала мутацию YTE (M252Y/S254T/T256E) для увеличения периода полужизни антитела.

20 **[00372]** Аминокислотные последовательности HC и LC лучших кандидатов показаны ниже в **таблице 3**. Аминокислотные последовательности VL и VH лучших кандидатов показаны в **таблице 4**. 3 определяющие комплементарность области (CDR) каждой цепи лучших кандидатов показаны в **таблицах 5–9**.

**Таблица 3.** Аминокислотные последовательности HC и LC лучших мАт к IL-1 $\beta$

Название	HC, аминокисл. послед.	LC, аминокисл. послед.
05H21A Изотип тяжелой цепи: IgG1-YTE Изотип легкой цепи: Лямбда	QVTLRESGPALVKPTQTLTLCTFSGF SLSTSGMWVSWIRQPPGKALEWALI DWGDDKYTTSLKTRLTISKDTSKNQ VVLMTNMDPVDATYYCARMREG SRAFDIWGQGT VVT VSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTL <b>YITREPEV</b> TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGGSFFLYSKLTV	QSVLTQPPSVSEAPRQRVTISCSGSSS NIGDNAVNWYQQLPGKAPKLLIYND DLLSSGVSDRFGSGKSGTSASLAISGL QSEDEADYYCAA WDDSLNGPVFGGG TKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQA NKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSS PVKAGVETTTPSKQSNK YAASSYLS LTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKT VAPTECS(SEQ ID NO: 2)

Название	HC, аминокисл. послед.	LC, аминокисл. послед.
	DKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYT QKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 1)	
15N14A  Изотип тяжелой цепи: IgG1-ΥTE  Изотип легкой цепи: Лямбда	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSG GSISSYYWTWIRQPAGKGLEWIGRIDSSGSSKYNPTLKSRTMSVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGDSGYDWAFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL <b>YITRE</b> PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 3)	QAVLTQPSSLSASPGASASLTCTLRSG INVGTYRIYWYQQKPGSPPQYLLSYKSDSDKQQGSGVPSRFSKGDASANVGIILLISGLQSEDEADYYCMIWHSSAWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKYYASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID NO: 4)
08F17A  Изотип тяжелой цепи: IgG1-ΥTE  Изотип легкой цепи: Каппа	EVQLVESGGGLVTPGGSLRLSCAASGFTFSGYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSGYIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREYWGSGFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL <b>YITRE</b> PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 5)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASG GISYYLAWYQQKPGKVPKLLISAEFTLQSGVPSRFSGSGSTDFTLTISSLQPE DVATYYCQKYNTPRFTGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNRFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSITLTSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 6)

**Таблица 4.** Аминокислотные последовательности VH и VL лучших мАт к IL-1β

Название	VH, аминокисл. послед.	VL, аминокисл. послед.
05H21A	QVTLRESGPALVKPTQLTLCTFSGFS LSTSGMWVSWIRQPPGKALEWLALID WGDDKYYTTSKTRLTISKDTSKNQV VLTMTNMDPVDATYYCARMREGSR AFDIWGQGTVTVSS (SEQ ID NO: 7)	QSVLTQPPSVSEAPRQRTISCSGSSS NIGDNAVNWYQQKPGKAPKLLIYND DLLSSGVSDRFSKSGTSASLAIISGL QSEDEADYYCAAWDDSLNGPVFGGG TKLTVL (SEQ ID NO: 8)
15N14A	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGG SISSYYWTWIRQPAGKGLEWIGRIDSSG SSKYNPTLKSRTMSVDTSKNQFSLKLSV TAADTAVYYCARGDSGYDWAFD YWQGLVTVSS (SEQ ID NO: 9)	QAVLTQPSSLSASPGASASLTCTLRSG INVGTYRIYWYQQKPGSPPQYLLSYK SDSDKQQGSGVPSRFSKGDASANVGIILLISGLQSEDEADYYCMIWHSSAWVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 10)

Название	VH, аминокисл. послед.	VL, аминокисл. послед.
08F17A	EVQLVESGGGLVTPGGSLRLSCAASGFTFSGYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSGYIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREYWGSGFDYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 11)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISYYLAWYQQKPGKVPKLLISAEFTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQKYNTAPRTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 12)

**Таблица 5.** Аминокислотные последовательности CDR по Кабату лучших мАт к IL-1 $\beta$

Название	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
05H21A	TSGMWVS (SEQ ID NO: 13)	LIDWGDD KYTTSLK T (SEQ ID NO: 14)	MREGSRAFDI (SEQ ID NO: 15)	SGSSSNIGDNAVN (SEQ ID NO: 16)	NDDLSS (SEQ ID NO: 17)	AAWDDSLNGPV (SEQ ID NO: 18)
15N14A	SYWWT (SEQ ID NO: 19)	RIDSSGSSKYNPTLKS (SEQ ID NO: 20)	GDSGYDWAFDY (SEQ ID NO: 21)	TLRSGINVTYRIY (SEQ ID NO: 22)	YKSDSDKQGS (SEQ ID NO: 23)	MIWHSSAWV (SEQ ID NO: 24)
08F17A	GYSMN (SEQ ID NO: 25)	SISSSGYIYYADSVKG (SEQ ID NO: 26)	EYWGSGFDY (SEQ ID NO: 27)	RASQGISYLA (SEQ ID NO: 28)	AEFTLQS (SEQ ID NO: 29)	QKYNTAPRT (SEQ ID NO: 30)

**Таблица 6.** Аминокислотные последовательности CDR по Чотиа лучших мАт к IL-1 $\beta$

Название	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
05H21A	GFSLSTSGM (SEQ ID NO: 31)	DWGDD (SEQ ID NO: 32)	MREGSRAFDI (SEQ ID NO: 33)	SGSSSNIGDNAVN (SEQ ID NO: 34)	NDDLSS (SEQ ID NO: 35)	AAWDDSLNGPV (SEQ ID NO: 36)
15N14A	GGSISSY (SEQ ID NO: 37)	DSSGS (SEQ ID NO: 38)	GDSGYDWAFDY (SEQ ID NO: 39)	TLRSGINVTYRIY (SEQ ID NO: 40)	YKSDSDKQGS (SEQ ID NO: 41)	MIWHSSAWV (SEQ ID NO: 42)
08F17A	GFTFSGY (SEQ ID NO: 43)	SSSGY (SEQ ID NO: 44)	EYWGSGFDY (SEQ ID NO: 45)	RASQGISYLA (SEQ ID NO: 46)	AEFTLQS (SEQ ID NO: 47)	QKYNTAPRT (SEQ ID NO: 48)

5

**Таблица 7.** Аминокислотные последовательности CDR по АбМ лучших мАт к IL-1 $\beta$

Название	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
05H21A	GFSLSTSGMWVS (SEQ ID NO: 49)	LIDWGDDKY (SEQ ID NO: 50)	MREGSRAFDI (SEQ ID NO: 51)	SGSSSNIGDNAVN (SEQ ID NO: 52)	NDDLSS (SEQ ID NO: 53)	AAWDDSLNGPV (SEQ ID NO: 54)
15N14A	GGSISSYYWT (SEQ ID NO: 55)	RIDSSGSSK (SEQ ID NO: 56)	GDSGYDWAFDY (SEQ ID NO: 57)	TLRSGINVTYRIY (SEQ ID NO: 58)	YKSDSDKQGS (SEQ ID NO: 59)	MIWHSSAWV (SEQ ID NO: 60)
08F17A	GFTFSGYSMN (SEQ ID NO: 61)	SISSSGYIY (SEQ ID NO: 62)	EYWGSGFDY (SEQ ID NO: 63)	RASQGISYLA (SEQ ID NO: 64)	AEFTLQS (SEQ ID NO: 65)	QKYNTAPRT (SEQ ID NO: 66)

**Таблица 8.** Аминокислотные последовательности CDR по Contact лучших мАт к IL-1 $\beta$ 

Название	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
05H21A	STSGMWV S (SEQ ID NO: 67)	WLALIDW GDDKY (SEQ ID NO: 68)	ARMREGS RAFD (SEQ ID NO: 69)	IGDNAVN WY (SEQ ID NO: 70)	LLIYNDDL LS (SEQ ID NO: 71)	AAWDDSL NGP (SEQ ID NO: 72)
15N14A	SSYYWT (SEQ ID NO: 73)	WIGRIDSS GSSK (SEQ ID NO: 74)	ARGDSGY DWAFD (SEQ ID NO: 75)	NVGTYRIY WY (SEQ ID NO: 76)	YLLSYKSD SDKQQG (SEQ ID NO: 77)	MIWHSSA W (SEQ ID NO: 78)
08F17A	SGYSMN (SEQ ID NO: 79)	WVSSISSS GYIY (SEQ ID NO: 80)	AREYWGS GFD (SEQ ID NO: 81)	SYYLAWY (SEQ ID NO: 82)	LLISAEFTL Q (SEQ ID NO: 83)	QKYNTAP R (SEQ ID NO: 84)

**Таблица 9.** Аминокислотные последовательности CDR по IMGT лучших мАт к IL-1 $\beta$ 

Название	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
05H21A	GFSLSTSG MW (SEQ ID NO: 85)	IDWGDDK (SEQ ID NO: 86)	ARMREGS RAFDI (SEQ ID NO: 87)	SSNIGDNA (SEQ ID NO: 88)	NDD (SEQ ID NO: 89)	AAWDDSL NGPV (SEQ ID NO: 90)
15N14A	GGSISSYY (SEQ ID NO: 91)	IDSSGSS (SEQ ID NO: 92)	ARGDSGY DWAFDY (SEQ ID NO: 93)	SGINVGTY R (SEQ ID NO: 94)	YKSDSDK (SEQ ID NO: 95)	MIWHSSA WV (SEQ ID NO: 96)
08F17A	GFTFSGYS (SEQ ID NO: 97)	ISSSSGYI (SEQ ID NO: 98)	AREYWGS GFDY (SEQ ID NO: 99)	QGISYY (SEQ ID NO: 100)	AEF (SEQ ID NO: 101)	QKYNTAP RT (SEQ ID NO: 102)

### 7.1.1 Конструирование молекул 05H21A, 15N14A и 08F17A

5 **[00373]** 05H21A, 15N14A и 08F17A представляют собой моноклональные антитела (мАт) — иммуноглобулины G1 (IgG1), которые связываются с человеческим IL-1 $\beta$ . Антитело характеризуется мутациями M252Y, S254T и T256E (YTE, нумерация EC) в константной области для усиления взаимодействия с неонатальными Fc-рецепторами (FcRn) при pH ~ 6, таким образом усиливая FcRn-опосредованную эндосомальную

10 рециркуляцию, что приводит к более длительной экспозиции в сыворотке (Dall'Acqua et al., J Biol Chem, 2006. 281(33): 23514–241; Dall'Acqua et al., J Immunol, 2002. 169(9): 5171–80). Эти мАт были разработаны для нацеливания на человеческий IL-1 $\beta$ , блокирования его связывания с IL-1R1 и ингибирования сигнализации IL-1 $\beta$ , которая представляет собой воспалительный путь, связанный с раком (Ridker, PM et al., Lancet,

15 2017. 390(10105): 1833–1842).

### 7.1.2 Источник кодирующей последовательности

**[00374]** 05H21A, 15N14A и 08F17A получали посредством иммунизации трансгенных мышей, обладающих репертуаром человеческих антител (Ablexis®),

рекомбинантной ДНК, кодирующей hIL-1 $\beta$  D145K. Эти три лучших антитела субклонировали в константную область человеческого IgG1-YTE и рекомбинантно экспрессировали.

### 7.1.3 Последовательность и структура

#### 5 7.1.3.1 Аминокислотная последовательность 05H21A, 15N14A и 08F17A

[00375] Аминокислотная последовательность HC и LC для 05H21A, 15N14A и 08F17A, выведенная из последовательности кДНК и подтвержденная с помощью пептидного картирования и масс-спектрометрии, приведена в **таблице 3. 3**

10 определяющие комплементарность области (CDR) каждой цепи показаны в **таблицах 5–9**. Аминокислотные последовательности VL и VH для 05H21A, 15N14A и 08F17A приведены в **таблице 4**. Остаток глутамина (Q) в положении 1 в HC и остаток глутамина (Q) в положении 1 в LC представляют собой N-концы зрелых цепей 05H21A и 15N14A. Остаток глутаминовой кислоты (E) в положении 1 в HC и аспарагиновой кислоты (D) в положении 1 в LC представляют собой N-концы зрелых цепей 08F17A. Мутации YTE в константных доменах тяжелой цепи 05H21A, 15N14A и 08F17A выделены жирным шрифтом и подчеркнуты в **таблице 1**.

#### 7.1.3.2 Оценка риска иммуногенности *in silico* с помощью EpiVax EpiMatrix для переменных доменов 05H21A, 15N14A и 08F17A

20 [00376] Последовательности переменных областей mAт были проанализированы на предмет потенциальной иммуногенности с использованием скорректированных показателей Т-регуляторных клеток (T<sub>reg</sub>) из программы прогнозирования иммуногенности EpiVax EpiMatrix *in silico* (De Groot et al., Clin Immunol, 2009. 131(2): 189–201). Программа EpiVax EpiMatrix рассчитывает потенциал связывания с наиболее распространенными молекулами HLA в каждом из «супертипов» или группировок. В отчете представлены результаты, репрезентативные для > 90% человеческой популяции по всему миру, без необходимости тестирования каждого гаплотипа в отдельности. Оценка EpiVax рассчитывается путем суммирования оценок EpiMatrix всех предсказанных Т-клеточных эпитопов, содержащихся в данной последовательности белка, с поправкой на ожидаемое содержание Т-клеточных эпитопов и длину белка. Оценка EpiVax и интерпретация EpiVax показаны ниже в **таблице 10**.

25

30

**Таблица 10.** Оценка иммуногенности для 05H21A (антитела к человеческому IL-1 $\beta$ )

Название Ат	Информация о цепи	Оценка EpiVax
05H21A	Легкая цепь, VL	-61,54
	Тяжелая цепь, VH	-35,07
15N14A	Легкая цепь, VL	3,31
	Тяжелая цепь, VH	14,84
08F17A	Легкая цепь, VL	-42,83
	Тяжелая цепь, VH	-37,91

## 7.2. Пример 2. Создание экспрессионного конструктора 05H21A, 15N14A и 08F17A

**[00377]** кДНК, кодирующую антитела 05H21A, 15N14A и 08F17A, синтезировали и субклонировали в каркас экспрессионного вектора Leap-In Transposase<sup>®</sup>

- 5 глутаминсинтетазы в ATUM (штат Калифорния, США). Затем плазмиды с двойной экспрессией генов передавали в компанию Manufacturing Plasmid Generation Group of JRD (штат Пенсильвания, США), и их последовательность подтверждали в компании NeoGenomics Laboratories (штат Калифорния, США).

**[00378]** Нуклеотидная последовательность первичного транскрипта для генов

- 10 тяжелой цепи и легкой цепи приведена в **таблице 11**.

**Таблица 11.** Нуклеотидные последовательности HC и LC антител 05H21A, 15N14A и 08F17A

Название	Нуклеотидная посл. LC	Нуклеотидная посл. HC
05H21A	CAGTCTGTGCTGACCCAGCCTCCATCT GTGTCTGAGGCCCTAGACAGAGAGT GACCATCTCCTGCTCCGGCTCCTCCTC ТААСАТСГГСГАТААСГССГТГААСТ GGTATCAGCAGCTGCCTGGCAAGGCC CCTAAACTGCTGATCTACAACGACGA CCTGCTGTCTCTGGCGTGTCCGACAG ATTCTCCGGCTСТААГТСТGGCACCTC CGCCAGCCTGGCTATCTCTGGATTGC AGTCTGAGGACGAGGCCGACTACTAC TGTGCCGCCTGGGACGATTCTCTGAA CGGCCCTGTTTTGGCGGAGGCACCA AGCTGACAGTCTGGGTСAGCCCAAG GCTGCACCCAGTGTCACTCTGTTCCCG CCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAA CAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAA GTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACA	CAAGTGACCCTGAGAGAGTCTGGAC CCGCTCTGGTCAAGCCCACACAGAC CCTGACACTGACCTGCACCTTCTCC GGCTTCTCCCTGTCCACCTCTGGAAT GTGGGTGTCTGGATCAGACAGCCT CCTGGCAAGGCACTGGAATGGCTGG CTCTGATCGATTGGGGCGACGACAA GТАCTACACCACCAGCCTGAAAACC CGGCTGACCATCTCCAAGGACACCT CCAAGAACCAGGTGGTGTCTGACCAT GACCAACATGGACCCTGTGGACACC GCCACCTACTACTGCGCCAGAATGA GAGAGGGATCCAGAGCCTTCGATAT CTGGGGCCAGGGAACCGTGGTCACC GTTTCTTCTGCCTCCACCAAGGGCC CATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCC TCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAG

Название	Нуклеотидная посл. LC	Нуклеотидная посл. HC
	GTGGCCTGGAAGGCCGATAGCAGCCC CGTCAAGGCGGGAGTTCGAAACCACCA CACCCTCCAAACAAAGCAACAACAAG TACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCT GACGCCTGAGCAGTGGAAGTCCCACA GAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCAT GAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAG TGGCCCCTACAGAATGTTCA (SEQ ID NO: 103)	CGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGA CТАCTTCCCCGAACCGGTGACGGTG TCGTGGAАCTCAGGCGCCCTGACCA GCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGT CCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCC CTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCT CCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTA CATCTGCAACGTGAATCACAAGCCC AGCAACACCAAGGTGGACAAGAAA GTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAA CTCACACATGCCCACCGTGCCAGC ACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCA GTCTTCCTCTTCCCCCAAAAACCCA AGGACACCCTTACATCACCCGGGA GCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTG GACGTGAGCCACGAAGACCCTGAG GTCАAGTTCAACTGGTACGTGGACG GCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAC AAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAA CAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTC CTCACCGTCTGCACCAGGACTGGC TGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCA AGGTGTCCAACAAAAGCCCTCCCAGC CCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCA CAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCC GGGAGGAGATGACCAAGAACCAGG TCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGG CTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTG GAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCG GAGAACAАCTACAAGACCACGCCTC CCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTT CTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTG GACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGG AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGC ATGAGGCTCTGCACAACCACTACAC GCAGAAGTCTCTCTCCCTGTCTCCG GGAAAA (SEQ ID NO: 104)
15N14A	CAGGCTGTTCTGACCCAGCCTAGCTCT CTGTCTGCTTCTCCTGGCGCTTCCGCC TCTCTGACCTGCACACTGAGATCCGG CATCAACGTGGGCACCTACCGGATCT ACTGGTATCAGCAGAAGCCTGGCAGC CCTCCTCAGTACCTGCTGTCTTACAAG TCCGACTCCGACAAGCAGCAAGGCTC TGGCGTGCCCTCTAGATTCTCCGGCTC TAAGGACGCCTCCGCCAATGTGGGCA TCTGCTGATCTCTGGCCTGCAGTCTG AGGACGAGGCCGACTACTACTGCATG ATCTGGCACTCCTCCGCCTGGGTTTTC GGAGGCGGAACAAAGCTGACAGTCTT GGGTCAGCCCAAGGCTGCACCCAGTG TCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGG AGTTCAAGCCAACAAGGCCACACTG GTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCG GGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGC CGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAG TCGAAACCACCACACCCTCCAAACAA	CAGGTTСAGCTGCAAGAGTCTGGAC CCGGCCTGGTCAAGCCTTCCGAGAC ACTGTCTCTGACCTGCACCGTGTCT GGCGGCTCCATCTCCTCTTACTATTG GACCTGGATCAGACAGCCTGCCGGC AAAGGCCTGGAATGGATCGGCAGA ATCGACTCCTCCGGCTCCTCCAAGT ACAACCCACACTGAAGTCCAGAGT GACCATGTCCGTGGACACCTCCAAG AACCAGTTCTCCCTGAAGCTGTCTC CCGTGACCGCTGCTGATAACCGCCGT GTACTACTGTGCCAGAGGGCAGTCT GGATACGACTGGGCCTTTGACTATT GGGGCCAGGGCACACTGGTCACCGT TTCTTCTGCCTCCACCAAGGGCCCA TCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCTC CAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGC GGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGAC TACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGT CGTGGAАCTCAGGCGCCCTGACCAG

Название	Нуклеотидная посл. LC	Нуклеотидная посл. HC
	AGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCA GCTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCAG TGGAAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTG CCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCG TGGAGAAGACAGTGGCCCCCTACAGAA TGTTC (SEQ ID NO: 105)	CGGCGTGCACACCTTCCCCGGCTGTC CTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCC TCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTC CAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTAC ATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCA GCAACACCAAGGTGGACAAGAAAG TTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAAC TCACACATGCCCACCGTGCCAGCA CCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAG TCTTCCTCTTCCCCCAAACCCAA GGACACCCTCTACATCACCCGGGAG CCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGG ACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGT CAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGC GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACA AAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAAC AGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCC TCACCGTCTGCACCAGGACTGGCT GAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAA GGTGTCCAACAAAGCCCTCCAGCC CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAG CCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAC AGGTGTACACCCTGCCCCATCCCG GGAGGAGATGACCAAGAACCAGGT CAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGC TTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGG AGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGG AGAACAATAACAAGACCACGCCTCC CGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTC TTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGG ACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGGA ACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAT GAGGCTCTGCACAACCACTACACGC AGAAGTCTCTCTCCCTGTCTCCGGG AAAA (SEQ ID NO: 106)
08F17A	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATC CTCTCTGTCCGCTTCTGTGGGCGACAG AGTGACCATCACCTGTAGAGCCTCTC AGGGCATCTCCTACTACCTGGCCTGG TATCAGCAGAAAACCCGGCAAGGTGCC CAAGCTGCTGATCTCTGCTGAGTTCAC CCTGCAGTCTGGCGTGCCCTCTAGATT CTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCGACTT TACCCTGACAATCTCCAGCCTGCAGC CTGAGGATGTGGCCACCTACTACTGC CAGAAGTACAACACCGCTCCTCGGAC CTTTGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAA TCAAGCGTACTGTGGCTGCACCATCT GTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAG CAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTT GTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCC AGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGG TGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAAC TCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGA CAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCA GCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCA GACTACGAGAAACACAAAGTCTACGC CTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGA GCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAAC	GAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGCG GAGGACTGGTTACCCCTGGCGGATC TCTGAGACTGTCTTGTGCCGCTCTG GCTTCACCTTCTCCGGCTACTCTATG AACTGGGTCCGACAGGCTCCTGGCA AAGGCTGGAATGGGTGTCCTCCAT CTCCTCCAGCAGCGGCTACATCTAC TACGCCGACTCCGTGAAGGGCAGAT TCACCATCTCCAGAGACAACGCCAA GAACTCCCTGTACCTGCAGATGAAC AGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCC GTGTACTACTGTGCCAGAGAGATT GGGGCTCCGGCTTCGATTATTGGGG CCAAGGAACACTGGTCACCGTGTCC TCTGCCTCCACCAAGGGCCCATCGG TCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAG AGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCC TGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTT CCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTTG AACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCG TGCACACCTTCCCGGCTGTCTTACA GTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGC AGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCA GCTTGGGCACCCAGACCTACATCTG

Название	Нуклеотидная посл. LC	Нуклеотидная посл. HC
	AGGGGAGAGTGT (SEQ ID NO: 107)	CAACGTGAATCACAAGCCCAGCAAC ACCAAGGTGGACAAGAAAAGTTGAG CCCAAATCTTGTGACAAAACTCACA CATGCCACCCGTGCCAGCACCTGA ACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTC CTCTCCCCCAAACCAAGGACA CCCTTACATCACCCGGGAGCCTGA GGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTG AGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGT TCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCC GCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAC GTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACC GTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATG GCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGT CCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCAT CGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAA AGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGT GTACACCCTGCCCCATCCCAGGGAG GAGATGACCAAGAACCAGGTACAGC CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCT ATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG GGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAA CAACTACAAGACCACGCCTCCCGTG CTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCT CTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAG AGCAGATGGCAGCAGGGGAACGTC TTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGG CTCTGCACAACCACTACACGCAGAA GTCTCTCTCCCTGTCTCCGGGAAAA (SEQ ID NO: 108)

**[00379]** Зрелые аминокислотные последовательности для 05H21A, 15N14A и 08F17A, выведенные из последовательности кДНК и подтвержденные с помощью пептидного картирования и масс-спектрометрии, приведены выше в **таблице 3**.

### 7.3. Пример 3. Биофизическая оценка 05H21A, 15N14A и 08F17A

#### 5 7.3.1 Аффинность связывания 05H21A, 15N14A и 08F17A с IL-β, измеренная методом SPR

**[00380]** Оценку аффинности 05H21A, 15N14A и 08F17A к человеческому IL-1β проводили методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с использованием системы Biacore 8k. Перекрестную реактивность той же панели антител также  
10 оценивали относительно IL-1β яванского макака, мыши, крысы и свиньи.

**[00381]** SPR представляет собой методику изучения силы взаимодействия между двумя партнерами по связыванию без использования меток путем измерения изменения массы при формировании и диссоциации комплекса. Вкратце, антитела были  
15 иммобилизованы на сенсорном чипе, который был связан с козым антителом к человеческому Fc (сенсорный чип GAN-Fc C1). Растворимый IL-1β пропускали над иммобилизованным антителом и контролировали реакции ассоциации/диссоциации.

Кинетическую информацию (константы скорости ассоциации и диссоциации) экстрагировали путем подбора сенсограмм к модели связывания Ленгмюра в соотношении 1:1. Аффинность связывания ( $K_D$ ) регистрировалась как отношение констант скорости ( $k_{\text{диссоциации}}/k_{\text{ассоциации}}$ ). Результаты оценки связывания показаны в **таблице 12**.

5 **[00382]** 05H21A, 15N14A и 08F17A связывают человеческий IL-1 $\beta$  с высокими аффинностями  $\sim 20$  пМ,  $\sim 64$  пМ и  $\sim 180$  пМ соответственно. 05H21A, 15N14A и 08F17A также имеют перекрестную реактивность с IL-1 $\beta$  яванского макака с аффинностями  $\sim 22$  пМ,  $\sim 70$  пМ и  $\sim 1,7$  нМ. Все три антитела показали отсутствующую или слабую перекрестную реактивность с IL-1 $\beta$  мыши, крысы и свиньи.

**Таблица 12.** Оценка связывания 05H21A, 15N14A и 08F17A

Характеризация мАт	05H21A	15N14A	08F17A
Аффинность связывания с человеческим IL- $\beta$	$KD (M) = 1,97E-11$ $ka (1/Mc) = 2,14E+07$ $kd (1/c) = 4,22E-04$	$KD (M) = 6,4E-11$ $ka (1/Mc) = 2,20E+06$ $kd (1/c) = 1,41E-04$	$KD (M) = 1,8E-10$ $ka (1/Mc) = 8,55E-05$ $kd (1/c) = 1,82E-10$
Аффинность связывания с IL- $\beta$ яванского макака	$KD (M) = 2,20E-11$ M $ka (1/Mc) = 1,58E+07$ $kd (1/c) = 3,48E-04$	$KD = 7,0E-11$ $ka (1/Mc) = 3,01E+06$ $kd (1/c) = 2,09E-04$	$KD (M) = 1,71E-09$ $ka (1/Mc) = 1,72E+05$ $kd (1/c) = 2,95E-04$
Аффинность связывания с мышинным IL- $\beta$	слабое связывание $KD > 100$ нМ	Нет связывания	Нет связывания
Аффинность связывания с крысиным IL- $\beta$	слабое связывание, $KD > 100$ нМ	$KD = 7,45E-08$ $ka (1/Mc) = 7,71E+05$ $kd (1/c) = 5,74E-02$	Нет связывания
Аффинность связывания со свиным IL- $\beta$	Нет связывания	Нет связывания	Нет связывания

### 7.3.2 Идентификация эпитопа для 05H21A, 15N14A и

#### 08F17A методом HDX

**[00383]** Эпитоп на IL-1 $\beta$  определяли методом масс-спектрометрии с водородно-дейтериевым обменом (HDX-МС). Картирование эпитопа выбранных антител на IL-1 $\beta$  с использованием ЖХ-МС на основе водородно-дейтериевого обмена показано на **ФИГ. 1**.

**[00384]** *Эксперимент с реакцией ионного обмена для HDX-МС.* Реакцию ионного обмена инициировали посредством смешивания 10 мкл 10 мкМ IL-1 $\beta$  (R&D Systems), который представлял собой остатки 117–269 hIL-1 $\beta$  (Uniprot ID P01584; **SEQ ID NO: 109**), с 1,2-молярным избытком лиганда или без него, и 30 мкл H<sub>2</sub>O или дейтерированного буфера (20 мМ MES, pH 6,4, 150 мМ NaCl в 95% D<sub>2</sub>O или 20 мМ Tris, pH 8,4, 150 мМ NaCl в 95% D<sub>2</sub>O). Реакционную смесь инкубировали в течение 15, 50, 150, 500 или 1500 с при 1,2 °С. Ионообменный раствор гасили путем добавления 40 мкл охлажденного 1,6 М гуанидина гидрохлорида, 0,8% муравьиной кислоты и сразу анализировали.

#### **IL-1 $\beta$** (Uniprot ID P01584) (**SEQ ID NO: 109**):

MAEVP ELASEMMAY YSGNEDDLFFEADGPKQMKCSFQDL DLCPLDGGIQLRI  
SDHHYSKGFRQAASVVVAMDKLRKMLVPCPQTFQENDLSTFFPFIFEEPIFFDTWDN  
EAYVHDAPVRS LNCTLRDSQQKSLVMSGPYELKALHLQGQDMEQQVVFSMSFVQGE  
ESNDKIPVALGLKEKNLYLSCVLKDDKPTLQLESVDPKNYPKKKMEKRFVFNKIEINN  
KLEFESAQFPNWIYSTSQAENMPVFLGGTKGGQDITDFTMQFVSS

**[00385]** Общая процедура сбора данных HDX-МС. Подготовку образцов HDX-МС проводили с помощью автоматизированной системы HDx (LEAP Technologies, г. Морристилл, штат Северная Каролина, США). Колонки и насосы: протеаза, протеаза типа XIII (протеаза из *Aspergillus saitoi*, тип XIII) / пепсин (масс./масс., 1 : 1; 2,1 x 30 мм) (NovaBioAssays Inc., г. Вобурн, штат Массачусетс, США); обращенно-фазовая предколонка ACQUITY UPLC BEH C18 VanGuard (2,1 мм x 5 мм) (Waters, г. Милфорд, штат Массачусетс, США), аналитическая колонка Accucore C18 (2,1 мм x 100 мм) (Thermo Fisher Scientific, г. Уолтем, штат Массачусетс, США); и LC насос, VH-P10-A (Thermo Fisher Scientific). Параметры загрузочного насоса (из колонки с протеазой в предколонку) были установлены следующим образом: скорость потока 600 мкл/мин с 0,1% водного раствора муравьиной кислоты. Настройки градиентного насоса (от

предколонки к аналитической колонке): от 9% до 33% ацетонитрила в 0,1% водной муравьиной кислоте в течение 20 мин при 100 мкл/мин.

**[00386]** *Сбор данных МС.* Масс-спектрометрический анализ проводили с использованием масс-спектрометра LTQ™ Orbitrap Fusion Lumos (Thermo Fisher Scientific) с температурой капилляра 275 °С, разрешением 120 000 и диапазоном масс (масса/заряд) 300–1500.

**[00387]** *Извлечение данных HDX-МС.* Перед проведением экспериментов HDX использовали программное обеспечение BioPharma Finder 2.0 (Thermo Fisher Scientific) для идентификации пептидов недейттерированных образцов. Для экстракции значений центроидов из МС-файлов необработанных данных для проведения экспериментов HDX использовали программу HDExaminer версии 2.5 (Sierra Analytics, г. Модесто, штат Калифорния, США).

**[00388]** *Анализ данных HDX-МС.* Извлеченные данные HDX-МС дополнительно анализировали в Excel. Все временные точки обмена (при pH 6,4 или pH 8,4 при 23 °С) преобразовывали в эквивалентные временные точки при pH 7,4 и 23 °С (например, 15 с при pH 6,4 и 23 °С эквивалентны 1,5 с при pH 7,4 и 23 °С (**таблица 13**)).

**Таблица 13.** Условия реакции HDX и продолжительность обмена в зависимости от временных точек обмена с поправкой на pH 7,4 и 23 °С.

Время откорректировано для pH 7,4, 23 °С (с)	pH 6,4 23 °С (с)	pH 8,4 23 °С (с)
0,15	-----	-----
0,5	-----	-----
1,5	15	-----
5	50	-----
15	150	-----
50	500	-----
150	1500	15
500	-----	50
1500	-----	150
5000	-----	500
15 000	-----	1500

**[00389]** *Результаты.* Сильные эпитопы IL-1β ( $\Delta\Delta G$  при связывании  $\leq -2$  ккал/моль) для 05H21A представляли собой остатки 119 (V), 161–162 (SF) и 164–169 (QGEESN). Слабые эпитопы ( $-2 < \Delta\Delta G$  при связывании  $\leq -1$  ккал/моль) представляли собой остатки 120–123 (RSLN) и 157–160 (VFSM).

[00390] Сильные эпитопы IL-1 $\beta$  для 08F17A представляли собой остатки 147–156 (LQGQDMEQQV) и 264–267 (MQFV).

[00391] Сильные эпитопы IL-1 $\beta$  для 15N14A представляли собой остатки 164–169 (QGEESN). Слабые эпитопы представляли собой остатки 158–162 (FSMSF).

### 5 7.3.3 Конформационная стабильность 05H21A, 15N14A и 08F17A по данным ДСК

[00392] Конформационную стабильность 05H21A, 15N14A и 08F17A определяли методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК). Эксперимент с дифференциальной сканирующей калориметрией проводили при 1 мг/мл в 10 мМ ацетате натрия с pH 5,5 с использованием прибора Microcal VP-DSC Malvern (Northampton, штат Массачусетс, США). Термическое сканирование проводили от 25 °C до 95 °C с использованием скорости сканирования 60 °C/ч с 15-минутным термостатированием перед сканированием. Каждое антитело измеряли в двух повторностях с прогоном буфера/холостого буферного раствора между прогонами всех образцов. Анализ данных проводили с использованием программного обеспечения MicroCal Origin версии 7, и температуры перехода (Tms) указаны в **таблице 14**. Термограмма 05H21A показала 3 температуры перехода при 62,2 °C (Tm1), 77,9 °C (Tm2) и 84,0 °C (Tm3). Термограмма 15N14A показала 4 температуры перехода при 64,7 °C (Tm1), 68,0 °C (Tm2), 76,9 °C (Tm3) и 83,3 °C (Tm4). Термограмма 08F17A показала 3 температуры перехода при 62,8 °C (Tm1), 75,5 °C (Tm2) и 83,3 °C (Tm3)

**Таблица 14.** Температуры перехода для 05H21A, 15N14A и 08F17A

Характеризация мАг	05H21A	15N14A	08F17A	Примечания
Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК)	Tm <sub>1</sub> = 62,2 °C Tm <sub>2</sub> = 77,9 °C Tm <sub>3</sub> = 84,0 °C	Tm <sub>1</sub> = 63,2 °C Tm <sub>2</sub> = 68,0 °C Tm <sub>3</sub> = 76,9 °C Tm <sub>4</sub> = 83,3 °C	Tm <sub>1</sub> = 62,8 °C Tm <sub>2</sub> = 75,5 °C Tm <sub>3</sub> = 83,3 °C	Измерено в 10 мМ ацетате натрия, pH 5,5

### 7.3.4 Гидрофобность 05H21A, 15N14A и 08F17A по данным аНІС

[00393] Относительную гидрофобность 05H21A, 15N14A и 08F17A оценивали с помощью хроматографии гидрофобного взаимодействия (НІС). Вкратце, образцы были разбавлены 1 : 5 в буфере с высоким содержанием соли (100 мМ фосфата натрия, 1,5М (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 6,5), и приблизительно 10 мкг образца наносили на колонку TOSOH TSKgel Butyl-NPR на приборе Agilent HPLC. НІС проводили в линейном градиенте аммоний-SO<sub>4</sub> от 1,1 М до 0 М в течение 8 минут. Регистрировали сигналы УФ280 и

флуоресценции (возбуждение при 280 нм и эмиссия при 340 нм). Относительную гидрофобность оценивали как время удерживания (rt) относительно внутреннего гидрофобного стандарта (CNTO607) и регистрировали как индекс гидрофобности ( $HI = rtAb/rtCNTO607$ ). Время удерживания и индекс гидрофобности антител к IL-1 $\beta$  показаны в **таблице 15**.

**[00394]** Относительная гидрофобность была низкой для 05H21A и 15N14A ( $HI$  0,37 и 0,49 соответственно), но умеренной для 08F17A ( $HI$  0,80).

**Таблица 15.** Относительная гидрофобность по данным HIC

Характеризация мАг	05H21A	15N14A	08F17A	CNTO607
Относительная гидрофобность (аHIC)	Низкая поверхностная гидрофобность: $HI = 0,37$ $Rt = 1,74$ мин	Низкая поверхностная гидрофобность: $HI = 0,49$ $Rt = 2,32$ мин	Умеренная поверхностная гидрофобность: $HI = 0,80$ $Rt = 3,77$	Высокая поверхностная гидрофобность: $HI = 1$ $rt = 4,72$ мин

#### 10 7.4. Пример 4. Продукция и очистка белка

##### 7.4.1 Получение 05H21A, 15N14A и 08F17A

**[00395]** 05H21A, 15N14A и 08F17A экспрессировали в стабильно трансфицированных клетках CHO и очищали с помощью колоночной хроматографии.

##### 7.4.2 Экспрессия белка и культура клеток

15 **[00396]** 05H21A, 15N14A и 08F17A экспрессировали в стабильно трансфицированном неклональном пуле клеток Horizon CHO, который получали посредством электропорации с очищенной плазмидной ДНК, кодирующей 05H21A, 15N14A или 08F17A (тяжелая цепь и легкая цепь), и мРНК транспозазы Leap-In (ATUM, кат. № LPN-1R) с использованием электропоратора MaxCyte STx. После  
20 электропорации использовали стандартные протоколы экспрессии для получения подпитываемой культуры. Каждую подпитываемую культуру собирали и осветляли центрифугированием с последующей фильтрацией.

##### 7.4.3 Очистка белка

25 **[00397]** Отфильтрованные супернатанты клеточной культуры очищали с использованием стандартных протоколов очистки. Вкратце, каждый супернатант загружали в предварительно уравновешенную колонку с белком А (GE Healthcare) с использованием хроматографической системы АКТА. После загрузки колонку промывали 7 объемами колонки 1  $\times$  DPBS, pH 7,2. Белок элюировали 2,5 объема колонки 0,1 М ацетата натрия, pH 3,5. Фракции белка немедленно нейтрализовали

добавлением 2,5 М трис-НСl, рН 7,5 до 8% (об./об.) от объема фракции элюирования и пиковые фракции объединяли.

**[00398]** Пул элюатов после ProA дополнительно очищали катионообменной хроматографией (СЕХ) с использованием смолы Capto S Impact (GE Healthcare). Белок элюировали из колонки повышающимся градиентом NaCl в 20 мМ MES, рН 6,5. Объединяли только пиковые фракции, содержащие мономерный белок. Пул элюатов после СЕХ диализировали в 10 мМ ацетата натрия с рН 5,5 с использованием кассеты для диализа Pierce (ThermoFisher), а затем фильтровали (0,2 мкм).

#### 7.4.4 Контроль качества

**[00399]** Концентрацию очищенного белка определяли по поглощению при 280 нм на спектрофотометре Dropsense с применением расчетного коэффициента экстинкции (**таблица 16**). Качество очищенных белков оценивали методами ДСН-ПААГ и аналитической эксклюзионной ВЭЖХ (система ВЭЖХ Agilent). Концентрации эндотоксина измеряли с помощью турбидиметрического LAL-теста (Pyrotell®-T, Associates of Cape Cod; г. Фалмут, штат Массачусетс, США). Сводные данные контроля качества представлены в **таблице 16**.

**Таблица 16.** Сводные данные по полученному белку

Идентификатор партии GDB №	Описание белка	Концентрация (мг/мл)	Объем (мл)	Общий выход (мг)	% мономеров (эксклюзионная ВЭЖХ)	Эндотоксин (ЭЕ/мг)	Измеренная масса G0F/G0F [Да]	Погрешность [ч/млн]	Буфер
05H21A	мАт 05H21A (κ IL-1β) [IgG1: YTE]	19,33	109	2107	> 99	< 1	147216,4	51,8	10 мМ ацетат натрия, рН 5,5
15N14A	мАт 15N14A (κ IL-1β) [IgG1: YTE]	15,06	79,0	1190	97,1	< 1	147842,9	39,0	10 мМ ацетат, рН 5,5
08F17A	мАт 08F17A (κ IL-1β) [IgG1: YTE]	18,12	58,9	1067	97,3	< 1	147368,5	26,3	10 мМ ацетат, рН 5,5

## 7.5. Пример 5. Функциональные анализы антител к IL-1 $\beta$

### 7.5.1 Экспериментальные методы

#### 7.5.1.1 Ингибирование сигнализации IL-1 $\beta$ в репортерной линии HEK-Blue IL-1 $\beta$

5 [00400] Клетки IL-1 $\beta$  HEK-Blue (культивированные в DMEM с 10% термоинактивированной фетальной бычьей сывороткой (FBS), 1% пенициллин/стрептомицин и 100 $\mu$ г/мл нормоцина) собирали и дважды промывали в PBS. Клетки ресуспендировали в среде до концентрации 330 000 клеток/мл и высевали 150 $\mu$ л на лунку в соответствии с компоновкой планшета. Окончательное количество  
10 клеток составляет 50 000 на лунку.

[00401] Тестируемые антитела разбавляли до начальной концентрации 40 нМ (конечная концентрация 5 нМ) и тестировали в последовательных трехкратных разведениях в среде. Рекомбинантный человеческий IL-1 $\beta$  (rhIL-1 $\beta$ ) разводили до 0,8 нг/мл (итоговая концентрация 0,1 нг/мл или брМ) в среде. 100 $\mu$ л рекомбинантного  
15 человеческого IL-1 $\beta$  (rhIL-1 $\beta$ ) и лучших антител к IL-1 $\beta$  совместно инкубировали в течение 30 мин при 37 °С в 5% CO<sub>2</sub>. Затем 50 $\mu$ л комплекса rhIL-1 $\beta$ /антитело добавляли к клеткам и делали биологические повторы. Затем комплекс инкубировали с клетками в течение 18–20 часов при 37 °С с 5% CO<sub>2</sub>. После инкубации готовили раствор QuantiBlue и добавляли по 180 $\mu$ л в 96-луночный несвязывающий планшет. По 20 $\mu$ л из каждой  
20 лунки с клетками добавляли к раствору QuantiBlue и инкубировали в течение 30 минут при 37 °С с 5% CO<sub>2</sub>. Затем планшеты считывали при оптической плотности 655 нм, и полумаксимальные ингибирующие концентрации (IC<sub>50</sub>) антитела к IL-1 $\beta$  рассчитывали с использованием зависимости log (ингибитор) / ответ (переменная наклона) в GraphPad.

#### 25 7.5.1.2 Ингибирование IL-1 $\beta$ -индуцированной продукции IL-6 в клетках MRC5

[00402] Продукцию IL-6 в фибробластах легкого MRC5 оценивали так, как описано ранее (Goh AX *et al*, MAbs. 2014;6(3):765–773). Клетки-фибробласты MRC5 [ATCC #CCL-171] (культивированные в EMEM с 10% инактивированной нагреванием  
30 фетальной бычьей сыворотки (FBS) и 1% пенициллина/стрептомицина) трипсинизировали и подсчитывали. Клетки ресуспендировали в среде до концентрации 30 000 клеток/мл и высевали по 3000 клеток на лунку в 96-луночный планшет. Клеткам давали восстановиться в течение 16 часов в течение ночи при 37 °С/5% CO<sub>2</sub>. Испытуемые антитела разбавляли до начальной концентрации 10 нМ и

последовательно разбавляли в двух повторностях (в полной среде) в 96-луночном планшете с использованием трехкратных разведений. 100 мкл каждого разведения антител переносили в свежий 96-луночный планшет. Рекомбинантный белок IL-1 $\beta$  разбавляли до 110 пг/мл в среде и добавляли по 11 мкл в каждую лунку антитела (конечная концентрация IL-1 $\beta$  11 пг/мл; эту концентрацию предварительно определяли как EC50 для 3000 клеток за 4 часа с использованием высвобождения IL-6 в качестве показателя). rhIL-1 $\beta$  и последовательные разведения антитела к IL-1 $\beta$  совместно инкубировали в течение 30 мин при 37 °C с 5% CO<sub>2</sub>. Затем к клеткам добавляли по 100 мкл совместно инкубированного комплекса в соответствии с компоновкой планшета. Клетки инкубировали в течение 4 часов при 37 °C с 5% CO<sub>2</sub>. 80 мкл среды затем извлекали и переносили в свежий 96-луночный планшет и замораживали при -80 °C.

**[00403]** Образцы среды размораживали на льду и оценивали ELISA. Планшеты для ELISA с высоким связыванием получали путем добавления захватывающего антитела в каждую лунку и инкубирования в течение ночи в соответствии с протоколом продукта (набор для ELISA R&D IL-6 DuoSet; кат. № DY206-05). 50 мкл собранной клеточной среды оценивали с использованием этого набора, на всех этапах соблюдая протокол производителя. В набор входил рекомбинантный hIL-6 в качестве положительного контроля. Результат ELISA проявляли с использованием SureBlue TMB (KPL; № 52-00-03) в течение 5 минут при комнатной температуре. Реакцию останавливали (стоп-раствор TMB) и измеряли поглощение при 450 нм и 540 нм. Анализ данных проводили в GraphPad Prism. Для каждой лунки результат OD540 вычитали из OD450 для нормализации оптических дефектов каждой лунки. Нижний ряд каждого планшета (только разбавитель) усредняли и вычитали из каждого образца для учета фона планшета. Стандартную кривую IL-6 использовали для расчета концентрации IL-6 в каждом образце. IC50 для каждого антитела определяли с использованием четырехпараметрического анализа с переменным наклоном (зависимость логарифм(агониста) от ответа) в GraphPad.

### **7.5.1.3 Ингибирование IL-1 $\beta$ -индуцированной продукции IL-6, ENA-78 (CXCL5) и G-CSF в NHDF**

**[00404]** Донорские фибробласты кожи человека (Lonza, кат. № CC-2509; доноры 29073 и 29114) разбавляли до 5000 клеток/мл (конечная концентрация 1000 клеток/лунка в среде FGM-2) и добавляли в объеме 200 мкл в каждую лунку 96-луночных планшетов с плоским дном и инкубировали в течение ночи при 37 °C, 5%

CO<sub>2</sub>. Тестируемые антитела готовили с 3-кратным разведением дозы 4X антител с конечными концентрациями от 10 нМ до 0,001 нМ в FGM-2.

**[00405]** Получали 4X rhIL-1 $\beta$  (конечная концентрация в анализе 10 пМ rhIL-1 $\beta$ ) путем добавления 41,4 мкл разведения rhIL-1 $\beta$  1 : 1000 + 49,959 мл FGM-2. По 200 мкл 4-кратного титра антитела и 200 мкл 4-кратного rhIL-1 $\beta$  объединяли и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч. Посеянные фибробласты промывали 200 мкл среды FBM. Избыток FBM удаляли переворотом планшетов и добавляли по 100 мкл среды FGM-2 на лунку. Затем добавляли по 100 мкл 2X смеси антитело/rhIL-1 $\beta$  и планшеты инкубировали при 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> в течение 18–20 часов. Всего 125 мкл супернатанта извлекали и переносили в новый 96-луночный круглодонный планшет и хранили при -20 °C для последующего считывания MSD.

**[00406]** MSD U-Plex (Lonza, кат. № K15067L-4) использовали для количественного определения IL-6, ENA-78 (CXCL5) и G-CSF в тестируемых супернатантах.

Количественное определение проводили в соответствии с альтернативным протоколом производителя, при котором детектирующие антитела добавляют непосредственно к образцу без промывки между ними. Стандартную кривую получали в Workbench с использованием аппроксимации 4P кривой линейной регрессии с  $1/(SD)^2$  взвешиванием, и процент ингибирования (IC<sub>50</sub>) рассчитывали в GraphPad PRISM с использованием аппроксимации 4P кривой линейной регрессии без взвешивания [Процент ингибирования =  $100 * (\text{Полож. контр.} - \text{Отриц. контр.}) - (\text{Образец} - \text{Отриц. контр.}) / (\text{Полож. контр.} - \text{Отриц. контр.})$ ]. Для любой точки данных ниже LLOD (нижнего предела обнаружения) в качестве замены использовали значение LLOD для анализа, рассчитанное по стандартной кривой. Для любой точки данных выше верхнего предела обнаружения (ULOD) значение исключалось.

#### **7.5.1.4 Ингибирование IL-1 $\beta$ -индуцированной продукции IL-6, ENA-78 (CXCL5) и G-CSF в NHLF**

**[00407]** Донорские фибробласты легких человека (Lonza, кат. № CC-2512; доноры 34325 и 35234) разбавляли до 10 000 клеток/мл (конечная концентрация 2000 клеток/лунка в среде FGM-2) и добавляли в объеме 200 мкл в каждую лунку 96-луночных планшетов с плоским дном и инкубировали в течение ночи при 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. Тестируемые антитела готовили с 3-кратным разведением дозы 4X антител с конечными концентрациями от 10 нМ до 0,001 нМ в FGM-2 (ID исследуемого антитела и концентрации партий перечислены в таблице ниже).

- [00408]** Получали 4X rhIL-1 $\beta$  (конечная концентрация в анализе 10 пМ rhIL-1 $\beta$ ) посредством добавления 24,8 мкл разведения rhIL-1 $\beta$  1 : 1000 + 29,975 мл FGM-2. 350 мкл разведения 4X антитела и 350 мкл 4X rhIL-1 $\beta$  объединяли и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч. Посеянные фибробласты промывали 200 мкл среды FBM. Избыток FBM удаляли переверотом планшетов и добавляли по 100 мкл среды FGM-2 на лунку. Затем добавляли по 100 мкл 2X смеси антитело/rhIL-1 $\beta$  и планшеты инкубировали при 37 °С, 5% CO<sub>2</sub> в течение 18–20 ч. Всего 125 мкл супернатанта извлекали и переносили в новый 96-луночный круглодонный планшет и хранили при -20 °С для последующего считывания MSD.
- [00409]** MSD U-Plex (Lonza, кат. № K15067L-4) использовали для количественного определения IL-6, ENA-78 (CXCL5) и G-CSF в соответствии с альтернативным протоколом производителя, при котором детекторные антитела добавляют непосредственно к образцу без промывки между ними. Стандартную кривую получали в Workbench с использованием аппроксимации 4P кривой линейной регрессии с  $1/(SD)^2$  взвешиванием, и процент ингибирования (IC<sub>50</sub>) рассчитывали в GraphPad PRISM с использованием аппроксимации 4P кривой линейной регрессии без взвешивания [Процент ингибирования = 100 \* (Полож. контр. – Отриц. контр.) – (Образец – Отриц. контр)) / (Полож. контр. – Отриц. контр.)]. Для любой точки данных ниже LLOD (нижнего предела обнаружения) в качестве замены использовали значение LLOD для аналита, рассчитанное по стандартной кривой. Для любой точки данных выше верхнего предела обнаружения (ULOD) значение исключалось.

#### 7.5.1.5 Определение кривой индукции IL-1 $\beta$ в человеческих PBMC

- [00410]** Обработка PBMC (моноклеарных клеток периферической крови) rhIL-1 $\beta$  индуцирует высвобождение IL-6 в супернатант. Титрование IL-1 $\beta$  против человеческих PBMC тестировали для определения и установки значений EC<sub>50</sub> и EC<sub>90</sub> с целью последующей оценки тестируемых антител.
- Была получена кровь от здоровых доноров, PBMC были выделены с помощью Ficoll-Нураque с использованием стандартных методов и заморожены до использования. PBMC размораживали в предварительно нагретом RPMI (RPMI, содержащем 10% термоинактивированной (HI) FTS, 1% пенициллина, 1% стрептомицина и 1% глутамина) и дважды промывали. Клетки подсчитывали и ресуспендировали в концентрации 1 миллион на мл. По 100 мкл клеток добавляли в планшет с плоским дном, обработанный TC. rhIL-1 $\beta$  (201-LB/CF, R&D Systems) последовательно разбавляли, начиная с концентрации, в 3 раза превышающей требуемую начальную

концентрацию, и делали последовательные разведения. По 50 мкл разведения добавляли в двух или трех повторностях к клеткам, и планшеты инкубировали 18–20 часов при 37 °С с 5% CO<sub>2</sub>.

- 5 **[00411]** IL-6 измеряли в супернатанте с использованием набора для ELISA на человеческий IL-6 (DY206, R&D Systems, адаптированный к планшетам для ELISA с половинной площадью, Corning 3690). Тестировали по 50 мкл супернатанта из каждого биологического повтора на лунку и ELISA проводили в соответствии с инструкциями производителя. По данным строили график и анализировали с использованием Graphpad Prism и/или смоделированные значения определял специалист по биостатистике.
- 10

**Таблица 17.** Смоделированные значения EC50 и EC90 для индукции IL-1 $\beta$  у протестированных доноров

Донор	EC50	EC90
AC5684	4,419 (3,231, 6,042)	12,445 (8,443, 18,344)
TS078.5	18,673 (13,656, 25,532)	71,474 (48,49, 105,351)
TS083	17,935 (13,117, 24,524)	69,250 (46,982, 102,073)
TS235	8,335 (6,096, 11,397)	29,074 (19,725, 42,855)
TS274	9,418 (6,888, 12,877)	22,148 (15,026, 32,645)
TS294	11,762 (8,602, 16,082)	43,364 (29,42, 63,918)
TS301	7,347 (5,373, 10,046)	25,794 (17,5, 38,02)
TS319	6,056 (4,429, 8,281)	26,520 (17,992, 39,09)
TS320	8,472 (6,196, 11,584)	34,077 (23,119, 50,229)
Модель	9,289 (6,794, 12,702)	32,468 (22,028, 47,857)
Медиана	8,472	29,074
Среднее	10,268	37,127
Диапазон для доноров	[4,419, 18,673]	[12,445, 71,474]

#### 7.5.1.6 Ингибирование IL-1 $\beta$ -индуцированной продукции IL-6 в человеческих PBMC

- 15 **[00412]** Тестируемые антитела тестировали на концентрации rhIL-1 $\beta$  10 пМ или 30 пМ (как определено в разделе 7.5.1.5), и продукцию IL-6 количественно определяли ELISA в человеческих PBMC.

- 20 Тестируемые антитела получали в 3X концентрации (5 нМ), последовательно разводили в 3 раза и смешивали с равным объемом rhIL-1 $\beta$  при заданных концентрациях 10 пМ (~ EC50) и 30 пМ (~ EC90). После 60-минутной инкубации при 37 °С с 5% CO<sub>2</sub> добавляли по 100 мкл каждой смеси на плоскодонный планшет, обработанный ТС. Контроли для определения фонового ответа включали в себя только среды,  $\beta$ rhIL-1 (для измерения максимального ответа) и только антитела для проверки отсутствия индукции IL-6

одними антителами. В течение этого инкубационного периода человеческие PBMC готовили, как указано выше, и доводили до концентрации 2 миллиона на мл, и в каждую лунку добавляли по 50 мкл. Клетки инкубировали в течение 18–20 часов при 37 °С, 5% CO<sub>2</sub>. IL-6 (кат. № DY206, R&D Systems, набор, адаптированный к планшетам для ELISA с половинной площадью, Corning3690) измеряли с использованием 50μл супернатанта на лунку. По данным строили график и анализировали с использованием GraphPad Prism для определения IC<sub>50</sub>.

#### 7.5.1.7 Ингибирование IL-1β-индуцированной продукции IL-6, ENA-78 (CXCL5) и G-CSF в анализе человеческой цельной крови

10 [00413] Человеческую цельную донорскую кровь собирали в пробирки с ACD и доставляли в исследовательский центр для немедленного использования. Тестируемые антитела к IL-1β последовательно разбавляли до 10-кратной концентрации в 96-луночных планшетах с U-образным дном в PBS, содержащем 1% BSA, с максимальной конечной концентрацией 10 нМ и контролем «без антитела», включенным в серию разведений. rhIL-1β (R&D Systems) готовили в концентрации 1000 пМ в PBS, 15 содержащем 1% BSA, и использовали конечную концентрацию для анализа 100 пМ. 10-кратные разведения антител и 10-кратное разведение rhIL-1β объединяли в соотношении 1 : 1 и инкубировали при комнатной температуре в течение 60 мин. Образцы человеческой донорской крови осторожно перемешивали и сеяли по 80 мкл 20 цельной крови на лунку в 96-луночные планшеты с U-образным дном для культивирования тканей. Добавляли по 20 мкл смеси антитело + rhIL-1β на лунку, а в контрольные лунки без rhIL-1β и/или антитела добавляли 1% PBS/BSA. Также готовили серию разведений rhIL-1β для подтверждения зависимости доза IL-1β/ответ в образцах пациентов. Затем обработанные клетки инкубировали в течение 22 ± 2 часов при 37 °С. 25 После инкубации в течение ночи во все лунки добавляли по 100 мкл PBS, перемешивали и центрифугировали в 96-луночных аналитических планшетах при 300 × G в течение 10 минут при комнатной температуре. По 100 мкл супернатанта переносили в новый 96-луночный планшет, и 25 мкл анализируемого супернатанта использовали непосредственно в анализе MSD, а анализ на IL-6, G-CSF и CXCL5 (ENA-78) 30 проводили в соответствии с инструкциями производителя со следующими исключениями: (i) удваивали концентрацию калибратора № 1 (IL-6) путем разведения 2 флаконов по 125 мкл каждый и объединения их вместе и (ii) строили стандартную кривую из 11 точек (4-кратное разведение в соответствии с инструкциями) + холостой раствор, в общей сложности 12 точек. Неизвестные значения рассчитывали в

программном обеспечении MSD Workbench и использовали GraphPad Prism для расчета значений EC (стимуляция rhIL-1 $\beta$ ) и значений IC (ингибирование антителом) с использованием 4P линейной регрессионной кривой.

#### 7.5.1.8 Установление релевантности для биологических видов:

##### 5 ингибирование IL-1 $\beta$ -индуцированной продукции IL-6 и G-CSF в фибробластах легких и кожи яванского макака

[00414] Кожные и легочные фибробласты яванского макака разбавляли до концентрации 15 000 клеток/мл (конечная 3000 клеток/лунка) в среде CFM (Complete Fibroblast Media, Cell Biologics, кат. № M32267) и добавляли по 200 мкл в отдельные  
10 лунки 96-луночных планшетов с плоским дном. Планшет инкубировали при 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> в течение ночи. Готовили 3-кратные разведения 4X раствора тестируемого антитела с конечными концентрациями от 10 нМ до 0,001 нМ, за исключением 08F17A, диапазон доз для которого составлял от 100 нМ до 0,01 нМ в CFM. Получали 4X  
15 раствор гсупо-IL-1 $\beta$  (конечная концентрация 5 пМ и 15 пМ гсупо-IL-1 $\beta$  для фибробластов кожи яванского макака и фибробластов легкого яванского макака соответственно) в CFM и 200 мкл 4X гсупоIL-1 $\beta$  объединяли с 200 мкл разведения 4X раствора исследуемого антитела с последующей инкубацией при комнатной температуре в течение 1 ч. Высеянные фибробласты кожи и легких промывали 200 мкл среды FBM и добавляли по 100 мкл среды CFM на лунку. Затем в соответствующую  
20 тестовую лунку добавляли по 100 мкл 2X смеси антитело/гсупоIL-1 $\beta$  и инкубировали при 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> в течение 18–20 часов. Всего 125 мкл супернатанта извлекали и переносили в новый 96-луночный круглодонный планшет и хранили при -20 °C для последующего считывания MSD.

[00415] MSD U-Plex (Lonza, кат. № K15067L-4) использовали для количественного  
25 определения IL-6 и G-CSF в соответствии с альтернативным протоколом производителя, при котором добавляют детекторные антитела непосредственно к образцу без промывки между ними. Стандартную кривую получали в Workbench с использованием аппроксимации 4P кривой линейной регрессии с  $1/(SD)^2$  взвешиванием, и процент ингибирования (IC<sub>50</sub>) рассчитывали в GraphPad PRISM с  
30 использованием аппроксимации 4P кривой линейной регрессии без взвешивания [Процент ингибирования =  $100 * (\text{Полож. контр.} - \text{Отриц. контр.}) - (\text{Образец} - \text{Отриц. контр.}) / (\text{Полож. контр.} - \text{Отриц. контр.})$ ]. Для любой точки данных ниже LLOD (нижнего предела обнаружения) в качестве замены использовали значение LLOD для

аналита, рассчитанное по стандартной кривой. Для любой точки данных выше верхнего предела обнаружения (ULOD) значение исключалось.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### 5                    7.5.2            мАт к IL-1 $\beta$ ингибируют сигнализацию IL-1 в репортерной клеточной линии

[00416]    Способность панели лучших антител к IL-1 $\beta$  ингибировать путь IL-1 оценивали в репортерной клеточной линии НЕК-Blue™ IL-1 $\beta$  (Invivogen). Эта репортерная клеточная линия была сконструирована из клеток НЕК 293 эмбриональной почки человека для обнаружения биологически активного IL-1 $\beta$  посредством активации индуцибельного NF- $\kappa$ B и AP-1 репортера — секретируемой эмбриональной щелочной фосфатазы (SEAP). Клеточная линия реагирует как на человеческий IL-1 $\beta$ , так и на IL-1 $\alpha$ , так как их сигнал проходит через один и тот же рецептор, IL-1RI. Кроме того, гены, кодирующие TNFR1, TLR3 и TLR5, сигнал которых проходит через пути NF- $\kappa$ B и AP-1, нокаутированы в этой репортерной линии, чтобы избежать помех. В этом исследовании 10 05H21A, 15N14A и 08F17A оценивали на активность по нейтрализации репортерного гена. Все мАт демонстрировали дозозависимое ингибирование (ФИГ. 2). Значения IC50 всех лучших мАт показаны на ФИГ. 2.

### 20                    7.5.3            мАт к IL-1 $\beta$ ингибируют IL-1-индуцированную $\beta$ -индуцированную продукцию IL-6 в клеточной линии фибробластов легкого

[00417]    Для дополнительной оценки активности по нейтрализации лучших мАт к IL-1 $\beta$  был разработан анализ на фибробластах легкого MRC5 на основе высвобождения IL-6. IL-6 представляет собой плеiotропный воспалительный цитокин, который в основном регулируется сигнальным путем IL-1 посредством активации NF- $\kappa$ B и AP-1. 25 Таким образом, активность IL-1 $\beta$  можно легко измерить по продукции IL-6 при воздействии rhIL-1 $\beta$  на клетки MRC5. 15N14A, 08F17A и 05H21A ингибировали высвобождение IL-6 дозозависимым образом (ФИГ. 3). Значения активности IC50 для трех протестированных мАт приведены на ФИГ. 3.

### 30                    7.5.4            мАт к IL-1 $\beta$ ингибируют биологическую активность IL-1 $\beta$ в первичных фибробластах человека

[00418]    Ингибирующую активность 05H21A, 15N14A и 08F17A оценивали в первичных человеческих фибробластах легких (доноры № 34325 и № 35234). В качестве показателя активности пути IL-1 $\beta$ , количественно определяли продукцию и секрецию цитокинов IL-6, ENA-78 (CXCL5) и G-CSF в супернатантах культуры с

использованием MSD. Использовали конечную концентрацию 10 пМ rhIL-1 $\beta$  для обеспечения полной активации пути IL-1 в этих донорских образцах. Все тестируемые мАт проявляли концентрационно-зависимую активность по нейтрализации, определяемую по измерению высвобождения IL-6 и CXCL5 (ENA-78) (ФИГ. 4, часть А и часть В соответственно). Значения активности IC50 для трех протестированных мАт приведены на ФИГ. 4. Оценка в первичных дермальных фибробластах человека (донор № 29114) показала эффективность, сходную с таковой в образцах фибробластов легких человека; смоделированные значения IC30, IC50 и IC90 приведены в **таблице 18** в сравнении со смоделированными значениями IC30, IC50 и IC90, определенными в образцах фибробластов легких человека.

**Таблица 18.** Значения ингибирования для панели лучших антител к IL-1 $\beta$  в фибробластах легких и кожи человека

Клетка	Соединение	Доноры	IC30 (95% ДИ)	IC50 (95% ДИ)	IC90 (95% ДИ)
NHLF	05H21A	34325	0,071 (0,046, 0,11)	0,167 (0,11, 0,254)	1,510 (0,893, 2,555)
		35234	0,042 (0,027, 0,065)	0,098 (0,065, 0,149)	0,890 (0,526, 1,505)
	15N14A	34325	0,128 (0,095, 0,173)	0,253 (0,189, 0,339)	1,479 (1, 2,186)
		35234	0,090 (0,067, 0,122)	0,178 (0,133, 0,239)	1,043 (0,705, 1,542)
	08F17A	34325	0,127 (0,093, 0,175)	0,293 (0,216, 0,398)	2,552 (1,613, 4,038)
		35234	0,090 (0,065, 0,123)	0,207 (0,152, 0,281)	1,803 (1,139, 2,852)
NHDF	05H21A	29114	0,039 (0,030, 0,050)	0,078 (0,065, 0,095)	0,490 (0,323, 0,743)
	15N14A		0,069 (0,049, 0,095)	0,127 (0,098, 0,165)	0,626 (0,349, 1,123)
	08F17A		0,087 (0,061, 0,124)	0,174 (0,130, 0,234)	1,073 (0,541, 2,129)

Смоделированные значения IC30, IC50 и IC90 в фибробластах кожи человека (донор NHDF № 29114) и фибробластах легких человека (доноры NHLF № 34325 и № 35234) представлены в нМ, и ДИ обозначает доверительный интервал.

### 7.5.5 мАт к IL-1 $\beta$ ингибируют биологическую активность IL-1 $\beta$ в образцах донорских человеческих РВМС

**[00419]** Эксперименты с индукцией с использованием rhIL-1 $\beta$  проводили на панели здоровых донорских человеческих РВМС. Смоделированные оценки EC50 и EC90 для индукции определяли на основе измерений rhIL-1 $\beta$ -индуцированного высвобождения цитокина IL-6, с использованием нелинейной модели со смешанными эффектами (**таблица 17**). Значения EC50 для индукции rhIL-1 $\beta$  у доноров находились в диапазоне от 4,42 до 18,67 пМ с медианным значением 8,4 пМ; а значения EC90 для rhIL-1 $\beta$  находились в диапазоне от 12,45 до 71,47 пМ с медианным значением 29,1 пМ. Из этих исследований концентрации 10 пМ и 30 пМ rhIL-1 $\beta$  были выбраны в качестве репрезентативных значений EC50 и EC90 для использования в последующих исследованиях активности в донорских анализах РВМС.

**[00420]** Далее функциональную активность мАт к IL-1 $\beta$ , 15N14A, 05H21A и 08F17A оценивали на панели из пяти доноров РВМС с использованием двух заданных индуцирующих концентраций rhIL-1 $\beta$ . Все мАт к IL-1 $\beta$  демонстрировали дозозависимое ингибирование, как показано на репрезентативном образце донорских РВМС (**ФИГ. 5**). Смоделированные средние значения IC30, IC50 и IC90 (n = 5 донорских РВМС) приведены в **таблице 19**.

**Таблица 19.** Значения ингибирования для панели лучших антител к IL-1 $\beta$  в образцах человеческих РВМС

Лечение	IC	05H21A	08F17A	15N14A
10 пМ IL1 $\beta$	30	0,043 (0,028, 0,067)	0,052 (0,034, 0,082)	0,032 (0,018, 0,059)
	50	0,070 (0,045, 0,107)	0,092 (0,060, 0,142)	0,056 (0,031, 0,099)
	90	0,244 (0,146, 0,407)	0,402 (0,212, 0,765)	0,226 (0,108, 0,474)
30 пМ IL1 $\beta$	30	0,104 (0,075, 0,144)	0,156 (0,115, 0,212)	0,075 (0,056, 0,099)
	50	0,164 (0,120, 0,223)	0,241 (0,178, 0,328)	0,120 (0,092, 0,155)
	90	0,533 (0,294, 0,969)	0,744 (0,487, 1,136)	0,409 (0,228, 0,734)

\* Смоделированные средние значения IC30, IC50 и IC90 основаны на анализе зависимости «доза — ответ» процента ингибирования в репрезентативном анализе с высвобождением IL-6, проведенном на пяти образцах донорских РВМС. Значения представлены в нМ.

### 7.5.6 мАт к IL-1 $\beta$ ингибируют биологическую активность IL-1 $\beta$ в

#### образцах человеческой цельной крови

[00421] В качестве окончательной меры эффективности активность по  
нейтрализации панели мАт к IL-1 $\beta$  оценивали на образцах человеческой донорской  
5 цельной крови. Оценка активности в образцах цельной крови обеспечивает более  
физиологически релевантные условия по сравнению с оценкой в образцах РВМС с  
учетом присутствия белков сыворотки. Активность 15N14A, 08F17A и 05H21A  
оценивали на 5 образцах доноров, и оценка основывалась на измерениях  
высвобождения цитокинов IL-6, CXCL-5 и G-CSF (ФИГ. 6). Смоделированные средние  
10 значения IC30, IC50 и IC90 для 5 образцов донорской крови были основаны на анализе  
зависимости «доза — ответ» процента ингибирования и представлены в **таблице 20**.

**Таблица 20.** Значения ингибирования для панели лучших антител к IL-1 $\beta$  в анализе  
человеческой цельной крови

Цитокин	Соединение	IC30 (95% ДИ)	IC50 (95% ДИ)	IC90 (95% ДИ)
IL-6	15N14A	0,360 (0,263, 0,493)	0,595 (0,450, 0,786)	2,183 (1,200, 3,974)
	05H21A	0,393 (0,280, 0,552)	0,631 (0,465, 0,857)	2,156 (1,064, 4,368)
	08F17A	0,872 (0,513, 1,483)	1,529 (0,853, 2,743)	6,559 (1,895, 22,703)
G-CSF	15N14A	0,299 (0,183, 0,488)	0,520 (0,329, 0,820)	2,179 (0,813, 5,840)
	05H21A	0,364 (0,221, 0,600)	0,632 (0,394, 1,016)	2,643 (1,026, 6,807)
	08F17A-	0,704 (0,398, 1,246)	1,311 (0,683, 2,516)	6,576 (1,549, 27,909)
CXCL5	15N14A	0,364 (0,244, 0,542)	0,603 (0,420, 0,867)	2,236 (0,981, 5,098)
	05H21A	0,400 (0,249, 0,642)	0,622 (0,403, 0,961)	1,953 (0,757, 5,035)
	08F17A	1,330 (0,437, 4,049)	2,859 (0,646, 12,642)	20,797 (0,860, 502,943)

\* Смоделированные средние значения IC30, IC50 и IC90 основаны на анализе зависимости «доза — ответ» процента ингибирования по данным анализа высвобождения IL-6, CXCL5 и G-CSF, проведенного на пяти образцах крови здоровых людей (доноры СС00448, М3767, М5988, М7286 и М7370). Данные представлены в нМ, а ДИ обозначает доверительный интервал.

### 7.5.7 Релевантность не являющихся человеком приматов (NHP):

#### мАт к IL-1 $\beta$ ингибируют биологическую активность IL-1 $\beta$ в фибробластах яванских макак

[00422] Для проведения токсикологических исследований на приматах проводили оценку перекрестной реактивности 15N14A, 08F17A и 05H21A на яванских макаках. На уровне аминокислот зрелая форма IL-1 $\beta$  человека и яванского макака гомологична на 95%. Определение аффинности методом ВІАсоге показало высокую аффинность к IL-1 $\beta$  яванских макак у трех лучших мАт, что свидетельствует о консервативном эпитопе у яванских макак (**таблица 12**). С другой стороны, канакинумаб не обладает перекрестной реактивностью с IL-1 $\beta$  яванского макака, так как его антигенный эпитоп включает в себя Glu64 в последовательности человека, который является ключевым для распознавания антителом, и отсутствует в последовательности IL-1 $\beta$  яванского макака (Dhimolea E. Canakinumab. *MAbs*. 2010;2(1):3–13). Фактически было показано, что мартышка является единственным не являющимся человеком приматом, несущим Glu64, что позволило провести токсикологические исследования канакинумаба на этом виде (Rondeau JM, Ramage P, Zurini M, Gram H. The molecular mode of action and species specificity of canakinumab, a human monoclonal antibody neutralizing IL-1beta. *MAbs*. 2015;7(6):1151–1160).

[00423] Учитывая высокую аффинность к IL-1 $\beta$  яванского макака и данные картирования эпитопа посредством дейтериевого обмена, мы спрогнозировали, что наша лучшая панель будет проявлять функциональную активность в анализах на основе клеток яванского макака. Для подтверждения прогноза мы разработали анализы на основе высвобождения IL-6 и G-CSF с рекомбинантным IL-1 $\beta$  яванского макака как в первичных кожных, так и в первичных легочных фибробластах яванского макака. Затем оценивали активность по нейтрализации 05H21A, 15N14A и 08F17A на обоих типах первичных фибробластов яванского макака. Все лучшие мАт к IL-1 $\beta$  проявляли дозозависимую активность по нейтрализации на фибробластах кожи и легкого яванского макака (**ФИГ. 7**). Кожные фибробласты яванского макака (CDF) и фибробласты легкого яванского макака (CLF) активировали 5 пМ и 15 пМ

рекомбинантного IL-1 $\beta$  яванского макака соответственно. В **таблице 21** приведены смоделированные оценки IC30, IC50 и IC90 в фибробластах кожи (CDF) и легких (CLF) яванского макака. Приведенные здесь результаты подтвердили функциональную активность всех трех мАт у яванского макака, таким образом установив релевантность этого вида для проведения последующих токсикологических исследований.

**Таблица 21.** Значения ингибирования для панели лучших антител IL-1 $\beta$  в первичных фибробластах яванского макака

Доза	Соединение	IC30 (95% ДИ)	IC50 (95% ДИ)	IC90 (95% ДИ)
<b><i>IL-6</i></b>				
5 пМ IL1 $\beta$ (CDF)	15N14A	0,093 (0,051, 0,171)	0,156 (0,095, 0,257)	0,594 (0,193, 1,833)
	05H21A	0,089 (0,055, 0,145)	0,175 (0,117, 0,260)	0,997 (0,396, 2,510)
	08F17A	2,722 (1,981, 3,741)	5,096 (3,766, 6,895)	25,904 (12,420, 54,030)
15 пМ IL1 $\beta$ (CLF)	15N14A	0,192 (0,095, 0,391)	0,376 (0,197, 0,718)	2,140 (0,443, 10,335)
	05H21A	0,214 (0,124, 0,367)	0,306 (0,207, 0,453)	0,779 (0,324, 1,874)
	08F17A	3,435 (1,585, 7,448)	6,969 (3,064, 15,851)	43,624 (5,649, 336,854)
<b><i>G-CSF</i></b>				
5 пМ IL1 $\beta$ (CDF)	05H21A	0,046 (0,031, 0,069)	0,059 (0,037, 0,095)	0,110 (0,041, 0,299)
	08F17A	1,923 (1,453, 2,544)	3,236 (2,555, 4,099)	12,480 (7,193, 21,651)
15 пМ IL1 $\beta$ (CLF)	15N14A	0,129 (0,063, 0,264)	0,261 (0,140, 0,487)	1,629 (0,363, 7,302)
	05H21A	0,195 (0,108, 0,353)	0,270 (0,174, 0,421)	0,630 (0,283, 1,400)
	08F17A	3,584 (1,519, 8,456)	6,106 (2,722, 13,695)	24,308 (3,671, 160,959)
Модель для 15N14A в случае 5 пМ IL1 $\beta$ (CDF) по цитокину G-CSF не сходилась.				

- 5 \* Смоделированные оценки IC30, IC50 и IC90 для высвобождения IL-6 и G-CSF, измеренного после стимуляции 5 пМ и 15 пМ реупоIL-1 $\beta$  в фибробластах кожи (CDF) и легкого (CLF) яванского макака соответственно. Данные представлены в нМ, а ДИ обозначает доверительный интервал.

## ПЕРВОНАЧАЛЬНАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело, которое связывает IL-1 $\beta$ , содержащее:
- 5 (1) (i) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую определяющую комплементарность область 1 (CDR1) VH, CDR2 VH и CDR3 VH, имеющие аминокислотную последовательность CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH соответственно из VH, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; и (ii) переменную область легкой цепи (VL), содержащую CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, имеющие аминокислотную последовательность CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL соответственно из VL, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8;
- 10 (2) (i) VH, содержащую CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, имеющие аминокислотную последовательность CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH соответственно из VH, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9; и (ii) VL, содержащую CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, имеющие аминокислотную последовательность CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL соответственно из VL, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10; или
- 15 (3) (i) VH, содержащую CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, имеющие аминокислотную последовательность CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH соответственно из VH, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11; и (ii) VL, содержащую CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, имеющие аминокислотную последовательность CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL соответственно из VL, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12.
- 20
- 25
2. Антитело по п. 1, (i) в котором аминокислотные последовательности CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL приведены в соответствии с системой нумерации по Кабату; (ii) причем аминокислотные последовательности CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL соответствуют системе нумерации по Чотиа; (iii) при этом аминокислотные последовательности CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL соответствуют системе нумерации по AbM; (iv) причем аминокислотные последовательности CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH,
- 30

CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL соответствуют системе нумерации по Contact и/или (v) при этом аминокислотные последовательности CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL соответствуют системе нумерации по IMGT.

5

3. Антитело, которое связывает IL-1 $\beta$ , содержащее:

(1) (i) VH, содержащую CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 67 и SEQ ID NO: 85; CDR2 VH, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 68 и SEQ ID NO: 86; CDR3 VH, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 69 и SEQ ID NO: 87; и

10

(ii) VL, содержащую CDR1 VL, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 70 и SEQ ID NO: 88; CDR2 VL, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 71 и SEQ ID NO: 89; CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 72 и SEQ ID NO: 90;

15

20

(2) (i) VH, содержащую CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 73 и SEQ ID NO: 91; CDR2 VH, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 74 и SEQ ID NO: 92; CDR3 VH, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 75 и SEQ ID NO: 93; и

25

30

(ii) VL, содержащую CDR1 VL, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 76 и SEQ ID NO: 94; CDR2 VL, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 77 и SEQ ID NO: 95; CDR3 VL,

имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 78 и SEQ ID NO: 96; или

- 5 (3) (i) VH, содержащую CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 79 и SEQ ID NO: 97; CDR2 VH, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 80 и SEQ ID NO: 98; CDR3 VH, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 81 и SEQ ID NO: 99; и
- 10 (ii) VL, содержащую CDR1 VL, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 82 и SEQ ID NO: 100; CDR2 VL, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 83 и SEQ ID NO: 101; CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 84 и SEQ ID NO: 102.

20 4. Антитело, которое связывает IL-1 $\beta$ , содержащее:

- 25 (1) (i) VH, содержащую CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13; CDR2 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14; CDR3 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15; и
- 30 (ii) VL, содержащую CDR1 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16; CDR2 VL, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 17; CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18;
- (2) (i) VH, содержащую CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19; CDR2 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; CDR3 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21; и

- (ii) VL, содержащую CDR1 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22; CDR2 VL, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 23; CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24;
- 5
- (3) (i) VH, содержащую CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25; CDR2 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26; CDR3 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27; и
- 10
- (ii) VL, содержащую CDR1 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28; CDR2 VL, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 29; CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30;
- 15
- (4) (i) VH, содержащую CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31; CDR2 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32; CDR3 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33; и
- 20
- (ii) VL, содержащую CDR1 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34; CDR2 VL, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 35; CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36;
- 25
- (5) (i) VH, содержащую CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37; CDR2 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38; CDR3 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39; и
- 30
- (ii) VL, содержащую CDR1 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40; CDR2 VL, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 41; CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42;
- (6) (i) VH, содержащую CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43; CDR2 VH, имеющую

- аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44; CDR3 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45; и (ii) VL, содержащую CDR1 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46; CDR2 VL, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 47; CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48;
- 5
- (7) (i) VH, содержащую CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49; CDR2 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50; CDR3 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51; и (ii) VL, содержащую CDR1 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52; CDR2 VL, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 53; CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54;
- 10
- 15
- (8) (i) VH, содержащую CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55; CDR2 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56; CDR3 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57; и (ii) VL, содержащую CDR1 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58; CDR2 VL, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 59; CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60;
- 20
- 25
- (9) (i) VH, содержащую CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61; CDR2 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62; CDR3 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63; и (ii) VL, содержащую CDR1 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64; CDR2 VL, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 65; CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66;
- 30

- 5 (10) (i) VH, содержащую CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67; CDR2 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68; CDR3 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69; и  
(ii) VL, содержащую CDR1 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70; CDR2 VL, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 71; CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 72;
- 10 (11) (i) VH, содержащую CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73; CDR2 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74; CDR3 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75; и  
(ii) VL, содержащую CDR1 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76; CDR2 VL, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 77; CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 78;
- 15 (12) (i) VH, содержащую CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79; CDR2 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80; CDR3 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81; и  
(ii) VL, содержащую CDR1 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82; CDR2 VL, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 83; CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84;
- 20 (13) (i) VH, содержащую CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85; CDR2 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 86; CDR3 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 87; и  
(ii) VL, содержащую CDR1 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88; CDR2 VL, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 89;
- 25
- 30

CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90;

5 (14) (i) VH, содержащую CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91; CDR2 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92; CDR3 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93; и  
10 (ii) VL, содержащую CDR1 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 94; CDR2 VL, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 95; CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 96; или

15 (15) (i) VH, содержащую CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 97; CDR2 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 98; CDR3 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99; и  
20 (ii) VL, содержащую CDR1 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100; CDR2 VL, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 101; CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102.

5. Антитело по любому из пп. 1–4, которое дополнительно содержит одну или более каркасных областей в соответствии с SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и/или SEQ ID NO: 12.

6. Антитело по любому из пп. 1–5, причем:

(i) антитело содержит VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8;

(ii) антитело содержит VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10; или

(iii) антитело содержит VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, и VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12.

7. Антитело по любому из пп. 1–6, которое представляет собой гуманизированное антитело.
- 5 8. Антитело по любому из пп. 1–7, которое представляет собой антитело IgG.
9. Антитело по п. 8, причем антитело IgG представляет собой антитело IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.
- 10 10. Антитело по любому из пп. 1–9, которое содержит легкую каппа-цепь.
11. Антитело по любому из пп. 1–9, которое содержит легкую лямбда-цепь.
12. Антитело по любому из пп. 1–11, причем антитело содержит мутантную область Fc.
- 15 13. Антитело по п. 12, причем мутантная область Fc содержит мутации M252Y/S254T/T256E (YTE).
- 20 14. Антитело по любому из пп. 1–13, которое представляет собой моноклональное антитело.
15. Антитело по любому из пп. 1–14, которое связывает антиген IL-1 $\beta$ .
- 25 16. Антитело по любому из пп. 1–14, которое связывает эпитоп IL-1 $\beta$ .
17. Антитело по любому из пп. 1–14, которое специфически связывается с IL-1 $\beta$ .
18. Антитело по любому из пп. 1–17, в котором CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL образуют сайт связывания для антигена IL-1 $\beta$ .
- 30 19. Антитело по любому из пп. 1–15, в котором CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL образуют сайт связывания для эпитопа IL-1 $\beta$ .

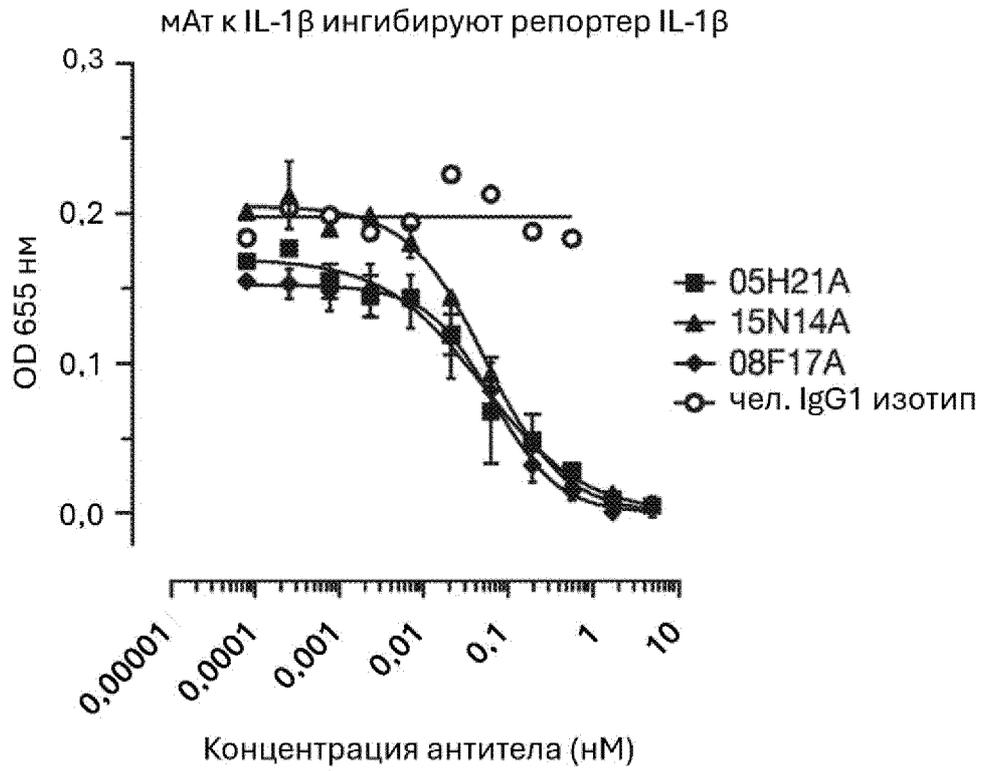
20. Антитело по любому из пп. 1–19, являющееся мультиспецифическим.
21. Антитело по п. 20, которое способно связывать по меньшей мере два антигена.
- 5 22. Антитело по п. 20, которое способно связывать по меньшей мере три антигена.
23. Антитело по п. 20, которое способно связывать по меньшей мере четыре антигена.
- 10 24. Антитело по п. 20, которое способно связывать по меньшей мере пять антигенов.
25. Связывающая молекула, содержащая антитело по любому из пп. 1–24, причем антитело генетически слито или химически конъюгировано с агентом.
- 15 26. Нуклеиновая кислота, кодирующая антитело по любому из пп. 1–24.
27. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 26.
28. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п. 27.
- 20 29. Набор, содержащий вектор по п. 27 и упаковку для него.
30. Набор, содержащий антитело по любому из пп. 1–24 и упаковку для него.
- 25 31. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из пп. 1–24 и один или более фармацевтически приемлемых эксципиентов.
32. Способ получения фармацевтической композиции по п. 31, включающий объединение антитела с одним или более фармацевтически приемлемыми эксципиентами для получения фармацевтической композиции.
- 30 33. Способ ингибирования  $\text{IL-1}\beta$  или  $\text{IL-1}\beta$ -опосредованной сигнализации в клетке, включающий приведение клетки в контакт с антителом по любому из пп. 1–24.

34. Способ ингибирования IL-1 $\beta$ -индуцированной продукции IL-6, ENA-78 (CXCL5) и/или G-CSF в клетке, включающий приведение клетки в контакт с антителом по любому из пп. 1–24.
- 5 35. Способ снижения продукции IL-6, ENA-78 (CXCL5) и/или G-CSF в клетке, включающий приведение клетки в контакт с антителом по любому из пп. 1–24.
36. Способ ингибирования роста или пролиферации экспрессирующих IL-1 $\beta$  клеток, включающий приведение клеток в контакт с антителом по любому из пп. 1–24.
- 10 37. Способ по любому из пп. 33–36, в котором клетка или клетки находятся в организме субъекта, имеющего заболевание или расстройство.
38. Способ ингибирования IL-1 $\beta$  у субъекта, включающий введение субъекту антитела по любому из пп. 1–24.
- 15 39. Способ лечения заболевания или расстройства у субъекта, включающий введение субъекту антитела по любому из пп. 1–24.
- 20 40. Способ по п. 37 или 39, в котором заболевание или расстройство представляет собой IL-1 $\beta$ -ассоциированное заболевание или расстройство.
41. Способ по п. 40, в котором IL-1 $\beta$ -ассоциированное заболевание или расстройство представляет собой воспалительное заболевание или расстройство.
- 25 42. Способ по п. 40, в котором IL-1 $\beta$ -ассоциированное заболевание или расстройство представляет собой рак.
43. Способ по п. 42, в котором рак представляет собой рак легкого.
- 30 44. Способ по п. 43, в котором рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого, причем необязательно немелкоклеточный рак легкого достиг стадии 0, стадии 1, стадии 2, стадии 3 или стадии 4.

45. Способ по п. 42, в котором рак представляет собой рак почки.
46. Способ по п. 45, в котором рак почки представляет собой почечноклеточный рак.
- 5 47. Способ по п. 46, в котором почечноклеточный рак достиг стадии 1, стадии 2 или стадии 3.

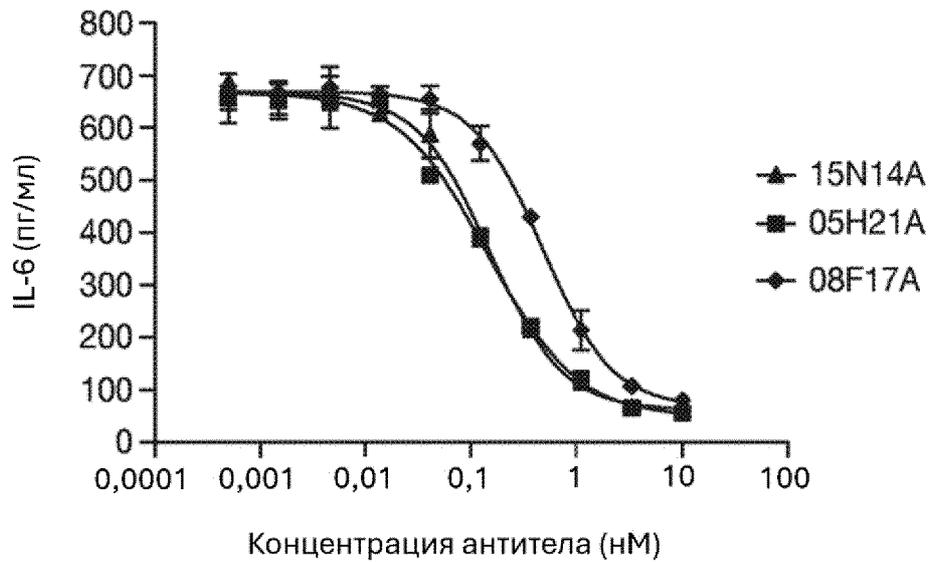
120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260	
<p> <u>APVRS</u>L<u>NCTLR</u>D<u>SQQK</u>SLVMSGPEYELKALHLQGGDMEQCVVFS<u>MSFVQ</u>GESNDKIPVALGLKEKNLYLSVCLKDDKPTLQLESVDKKNYFKKMEKRFVFNKIEINNKLEFESAQFFNWIYSTSQAEKMPVFLGGTKGGQDITDFTMQFVSS 05H21A </p> <p> APVRSLNCTLRDSQQKSLVMSGPEYELKALHLQGGDMEQCVVFS<u>MSFVQ</u>GESNDKIPVALGLKEKNLYLSVCLKDDKPTLQLESVDKKNYFKKMEKRFVFNKIEINNKLEFESAQFFNWIYSTSQAEKMPVFLGGTKGGQDITDFTMQFVSS 08F17A </p> <p> APVRSLNCTLRDSQQKSLVMSGPEYELKALHLQGGDMEQCVVFS<u>MSFVQ</u>GESNDKIPVALGLKEKNLYLSVCLKDDKPTLQLESVDKKNYFKKMEKRFVFNKIEINNKLEFESAQFFNWIYSTSQAEKMPVFLGGTKGGQDITDFTMQFVSS 15N14A </p>															
05H21A					08F17A					15N14A					
															

**ФИГ. 1**



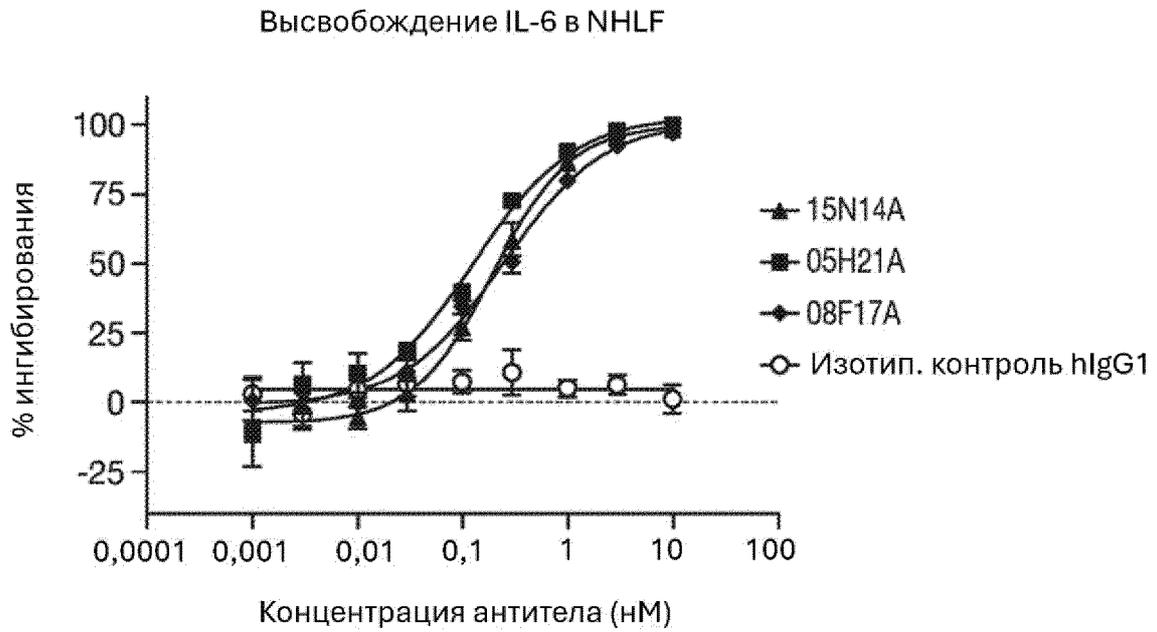
мАт к IL-1 $\beta$	IC <sub>50</sub> (нМ)
08F17A	65
05H21A	50
15N14A	53

**ФИГ. 2**

Ингибирование IL-1 $\beta$ -индуцированного  
высвобождения IL-6 в MRC5

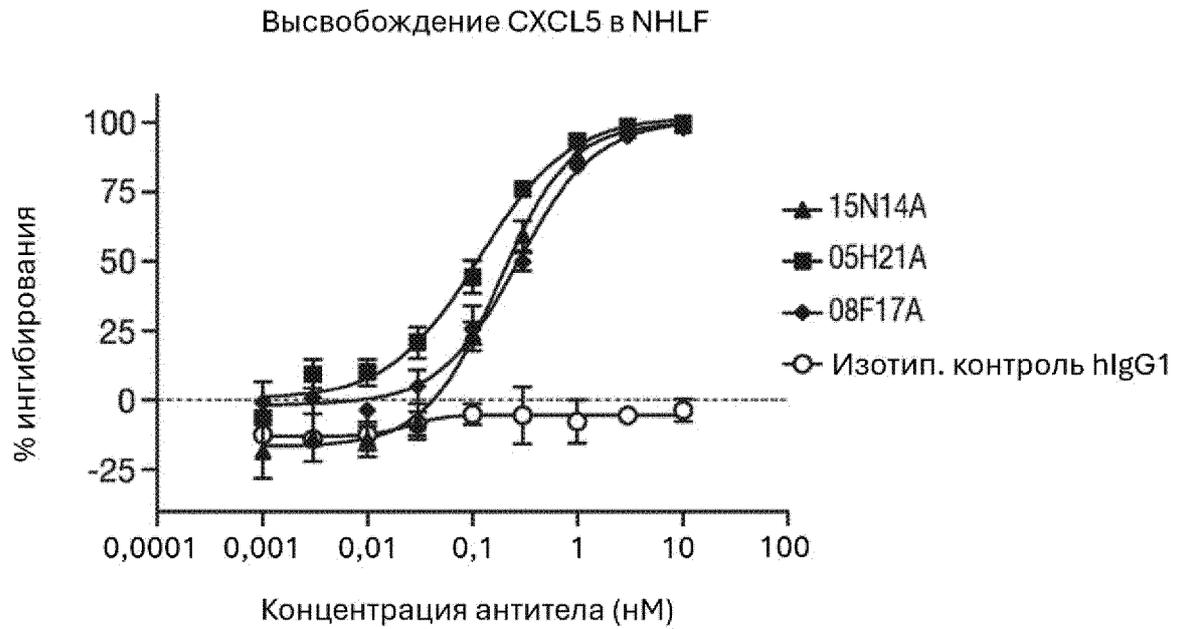
мАт к IL-1 $\beta$	IC50 (нМ)
08F17A	485
05H21A	146
15N14A	152

**ФИГ. 3**



мАт к IL-1β	IC50 (нМ)
08F17A	248
05H21A	127
15N14A	195

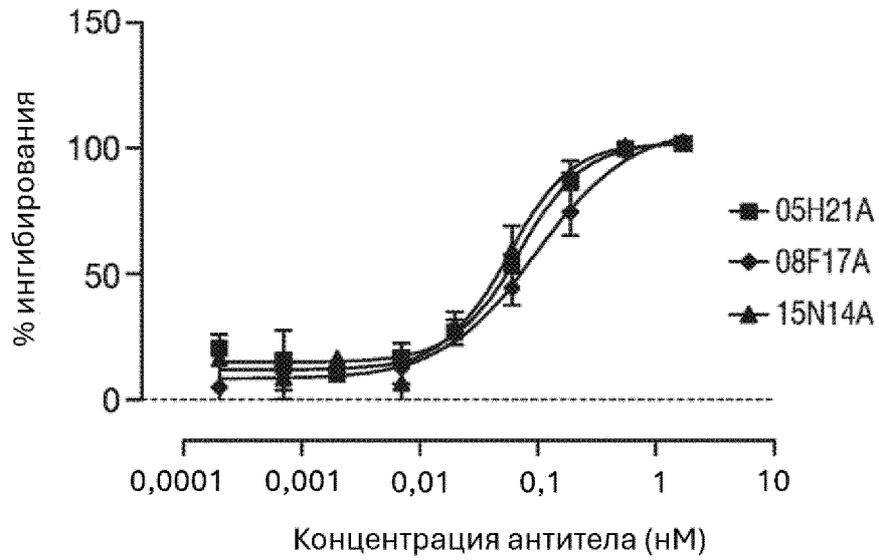
**ФИГ. 4А**



мАт к IL-1β	IC50 (нМ)
08F17A	269
05H21A	116
15N14A	175

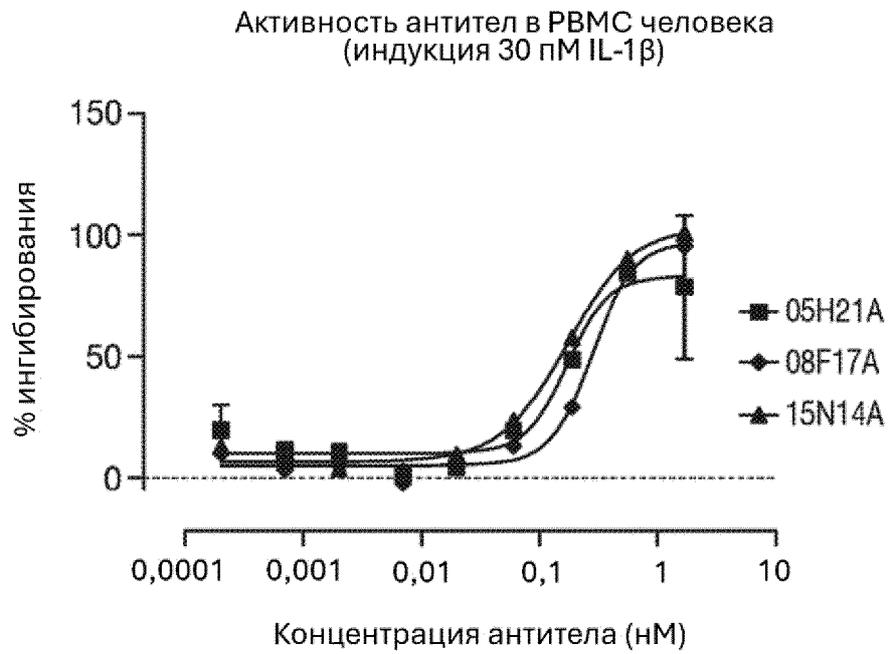
**ФИГ. 4Б**

Активность антител в РВМС человека  
(индукция 10 пМ IL-1 $\beta$ )



мАт к IL-1 $\beta$	IC50 (нМ)
08F17A	98
05H21A	70
15N14A	55

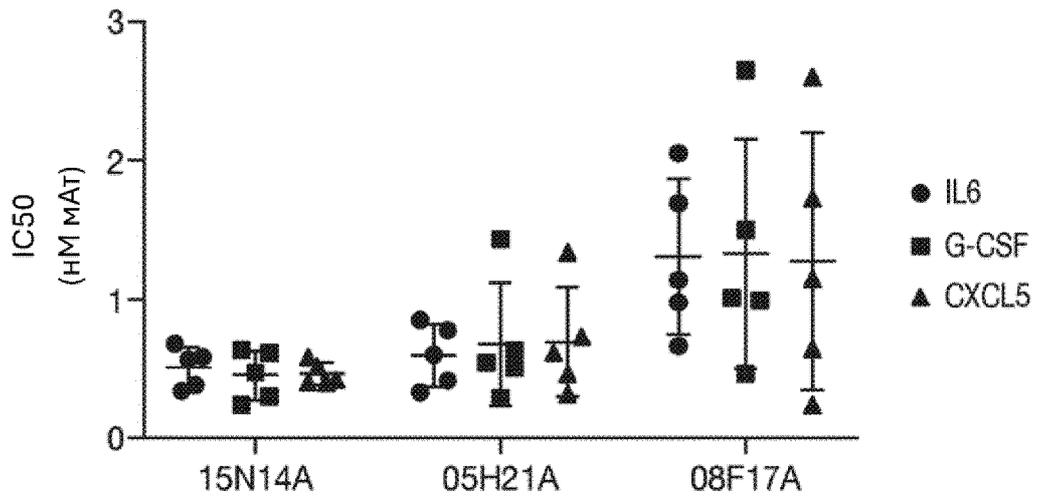
**ФИГ. 5А**



мАт к IL-1 $\beta$	IC <sub>50</sub> (нМ)
08F17A	283
05H21A	174
15N14A	173

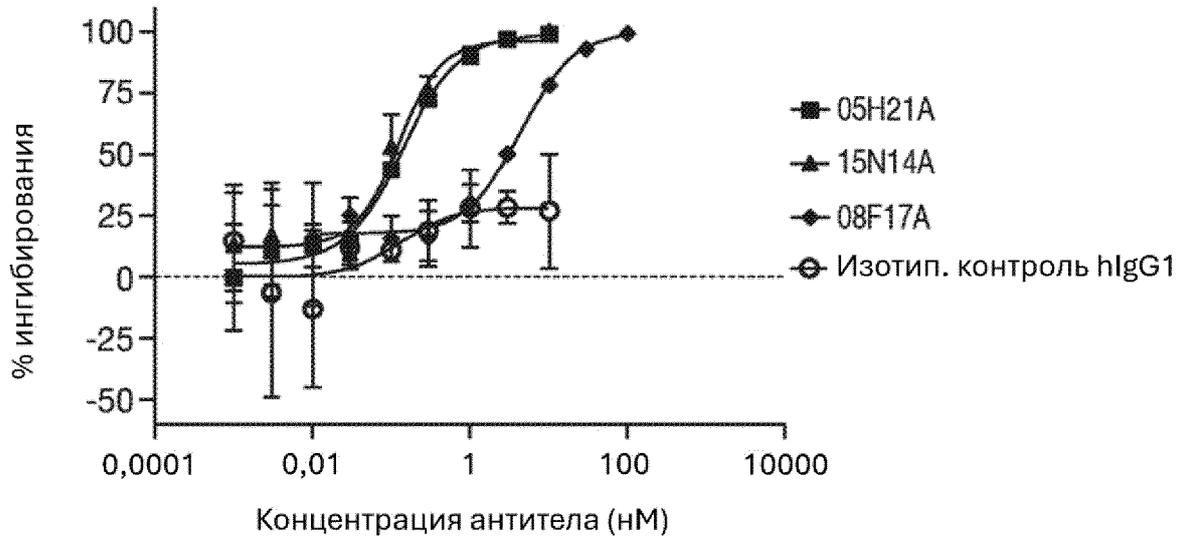
**ФИГ. 5Б**

Активность антител в анализе цельной крови человека  
(значения IC50 в 5 образцах донорской крови)



**ФИГ. 6**

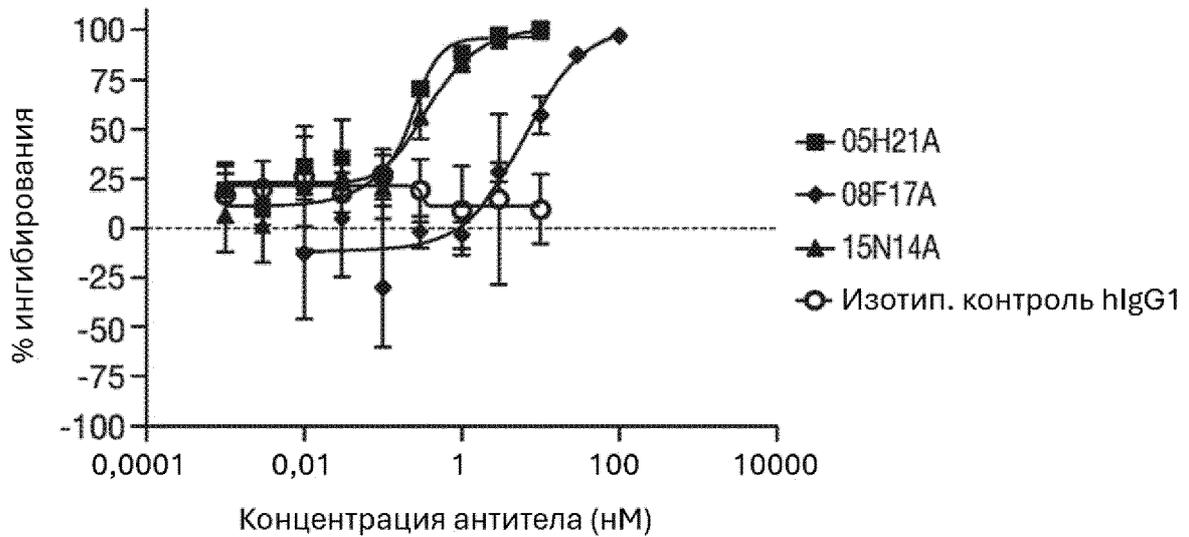
Активность антител на фибробластах  
кожи яванского макака  
(высвобождение IL-6)



мАт к IL-1 $\beta$	IC50 (нМ)
08F17A	4311
05H21A	140
15N14A	125

**ФИГ. 7А**

Активность антител на фибробластах  
легкого яванского макака  
(высвобождение IL-6)



мАт к IL-1B	IC50 (нМ)
08F17A	6090
05H21A	248
15N14A	316

**ФИГ. 7Б**