



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 39/3955 (2006.01); A61K 45/06 (2006.01); C07K 16/248 (2006.01); C07K 2317/76 (2006.01); C07K 2317/72 (2006.01); C07K 2317/21 (2006.01); A61K 2039/505 (2006.01); C07K 2317/56 (2006.01); C07K 2317/622 (2006.01); C07K 2317/92 (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2015150249, 29.01.2010

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
29.01.2010

Дата регистрации:
17.04.2018

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
29.01.2009 US 61/148,106;
04.06.2009 US 61/184,182

Номер и дата приоритета первоначальной заявки,
из которой данная заявка выделена:
2011135422 29.01.2010

(45) Опубликовано: 17.04.2018 Бюл. № 11

Адрес для переписки:
105082, Москва, Спартаковский пер., 2, стр. 1,
секция 1, этаж 3, ЕВРОМАРКПАТ

(72) Автор(ы):

БОУЭН Майкл (US),
ВУ Херрен (US),
ДАЛЛЬ'АКВА Вильям (US),
КИНЕР Питер (US),
ДЖАЛЛАЛ Бахия (US),
КОЙЛ Антони (US)

(73) Патентообладатель(и):

МЕДИММУН, ЛЛК (US)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: US 20080188401 A (Simon Charles
Cruwys), 07.08.2008. RU 2318829 C2
(СЕНТОКОР, ИНК. (US)), 10.03.2008. RU
2195960 C2 (ТУГАИ СЕЙЯКУ
КАБУСИКИ КАЙСЯ), 10.01.2003.

(54) ЧЕЛОВЕЧЕСКИЕ АНТИ-IL-6 АНТИТЕЛА С ПРОЛОНГИРОВАННЫМ ПЕРИОДОМ ВЫВЕДЕНИЯ IN VIVO И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ, АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ И ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

(57) Реферат:

Изобретение относится к биохимии. Описано антитело, которое специфично связывается с IL-6, где это антитело включает аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10. Кроме того, данное изобретение относится к фармацевтическим композициям, терапевтическим композициям и способам применения терапевтических антител, которые связывают IL-6 и которые имеют пролонгированный период полувыведения in vivo

для лечения и профилактики IL-6 опосредованных заболеваний и расстройств, таких как, но не ограничиваясь приведенными, воспалительные заболевания и расстройства, аутоиммунные заболевания и расстройства и опухоли. Изобретение представляет человеческие анти-IL-6 антитела с пролонгированным периодом полувыведения in vivo. 7 н. и 10 з.п. ф-лы, 18 ил., 3 табл., 3 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

A61K 39/3955 (2006.01); *A61K 45/06* (2006.01); *C07K 16/248* (2006.01); *C07K 2317/76* (2006.01); *C07K 2317/72* (2006.01); *C07K 2317/21* (2006.01); *A61K 2039/505* (2006.01); *C07K 2317/56* (2006.01); *C07K 2317/622* (2006.01); *C07K 2317/92* (2006.01)

(21)(22) Application: **2015150249, 29.01.2010**

(24) Effective date for property rights:
29.01.2010

Registration date:
17.04.2018

Priority:

(30) Convention priority:
29.01.2009 US 61/148,106;
04.06.2009 US 61/184,182

Number and date of priority of the initial application,
from which the given application is allocated:
2011135422 29.01.2010

(45) Date of publication: **17.04.2018 Bull. № 11**

Mail address:
105082, Moskva, Spartakovskij per., 2, str. 1, sektsiya
1, etazh 3, EVROMARKPAT

(72) Inventor(s):

BOUEN Majkl (US),
VU Kherren (US),
DALL'AKVA Vilyam (US),
KINER Piter (US),
DZHALLAL Bakhiya (US),
KOJL Antoni (US)

(73) Proprietor(s):

MEDIMMUNE, LLK (US)

(54) HUMAN ANTI-IL-6 ANTIBODIES WITH A PROLONGED PERIOD OF INDUCTION IN VIVO AND THEIR USE FOR TREATMENT OF ONCOLOGICAL, AUTOIMMUNE AND INFLAMMATORY DISEASES

(57) Abstract:

FIELD: biochemistry.

SUBSTANCE: invention relates to biochemistry. Described is an antibody that specifically binds IL-6, an antibody that includes amino acid sequences SEQ ID NO: 9 and SEQ ID NO: 10. In addition, the present invention relates to pharmaceutical compositions, therapeutic compositions and methods of using therapeutic antibodies, which bind IL-6 and which have

a prolonged in vivo half-life for treatment and prevention of IL-6 mediated diseases and disorders such as inflammatory diseases and disorders, autoimmune diseases and disorders, tumors, etc.

EFFECT: invention provides human anti-IL-6 antibodies with a prolonged in vivo half-life.

17 cl, 18 dwg, 3 tbl, 3 ex

Заявление о приоритете

[0001] В данной заявке заявлен приоритет заявки США, серийный номер 61/148,106, поданной 29 января 2009 г., и заявки США, серийный номер 61/184,182, поданной 4 июня 2009 г., обе из которых включены в данную заявку полностью путем ссылок для

Область техники

[0002] Данное изобретение относится к молекулам анти-IL-6 антител, ингибирующих биологические эффекты IL-6 и имеющих пролонгированный период полувыведения *in vivo*. Анти-IL-6 антитела являются полезными для лечения расстройств, связанных с IL-6, включая воспалительные расстройства, аутоиммунные расстройства, опухоли и депрессию.

Уровень техники

[0003] Интерлейкин 6 (IL-6) является 26 kDa плеiotропным про-воспалительным цитокином, который вырабатывают многие клеточные типы, включая стимулированные фибробласты, моноциты и эндотелиальные клетки, образующие основной источник IL-6 *in vivo*. Клетки, такие, как Т клетки, В клетки, макрофаги, кератиноциты, остеобласты и несколько других типов, могут продуцировать IL-6 при стимуляции. IL-6 также экспрессируется из опухолевых клеточных линий и опухолевых клеток, например, клеток саркомы легких, рака простаты, миеломы, гипернефромы и сердечной миксомы (Kishimoto, T., (1989) Blood 74:1-10; Smith P.C. et al. (2001) Cytokine and Growth factor Reviews 12:33-40). В невоспалительных условиях IL-6 выделяется из адипозных тканей (Wallenius et al., (2002) Nat. Med. 8:75).

[0004] Для начала клеточных сигналов, IL-6 связывается с трансмембранным рецептором с низкой аффинностью, IL-6 рецептор альфа (который также имеет название IL-6R α , IL-6Ra, IL-6R, gp80 или CD126) с образованием комплекса "IL-6:IL-6Ra". Данный комплекс связывается с рецептором сигналов gp130; IL-6R α и gp130, которые вместе образуют сайт связывания IL-6 высокой аффинности, и приводят к образованию гексамера, составленного из двух копий каждого из IL-6, IL-6Ra и gp130 (Somers, W., et al. (1997) 1,9 EMBO J. 16:989-997). Трансмембранные и цитоплазматические домены IL-6Ra не нужны для передачи сигналов, поскольку IL-6Ra также существует в виде растворимой выделенной формы (sIL-6R или sIL-6Ra). Растворимый рецептор вырабатывается либо путем дифференциального сплайсинга IL-6Ra сигнала, либо путем протеолитического расщипывания. sIL-6R способен к формированию комплекса лиганд-рецепторов с IL-6, "IL-6: sIL-6Ra". Данный комплекс может связывать gp130 на клетках и, таким образом, начинать клеточную сигнализацию в gp130 позитивных клетках, даже если такие клетки не экспрессируют IL-6Ra. Таким образом, sIL-6R имеет потенциал к расширению спектра клеточного ответа на IL-6, и, как полагают, играет важную роль в IL-6-опосредованном воспалении (Jones, S. A et al. (2001) FASEB J. 15:43-58).

[0005] Была установлена кристаллическая структура человеческого IL-6 лиганда (Somers, W., et al. (1997) 1,9 EMBO J. 16:989-997). Кристаллическая структура внеклеточного домена человеческого IL-6Ra (Varghese et al. (2002) PNAS USA 99:15959-15964), и гексамерная структура IL-6/IL-6R/gp130 комплекса (Boulanger et al. (2003) Science 300:2101-2104), также была решена. Данные структуры в сочетании с исследованиями мутагенности идентифицировали три сайта на поверхности IL-6, которые участвуют в функциональной активности IL-6 в комплексе с различными компонентами рецепторов. Остатки сайта 1 участвуют во взаимодействии между IL-6 и IL-6Ra. Остатки сайта 2 участвуют во взаимодействии между IL-6 и gp130 домен связывания цитокинов. Остатки сайта 3 IL-6 участвуют во взаимодействии Ig-подобного домена второго gp130

в гексамерном комплексе. Четвертый сайт IL-6 был идентифицирован таким, в котором IL-6 взаимодействует со второй молекулой IL-6 в гексамерном IL-6/IL-6R/gp130 комплексе (Menziani et al. (1997) *Proteins: Structure Function and Genetics* 29, 528).

[0006] Был выделен ряд анти-IL-6 лигандных моноклональных антител. Были выполнены исследования картирования, которые показали, что они связываются в различных сайтах, как описано выше, на поверхности человеческого IL-6 (Brakenhoff et al. (1990) *J. Immunol.* 145:561-568; Wijdenes et al. (1991) *Mol Immunol.* 28:1183-1191; Brakenhoff et al. (1994) *JBC* 269:86; Kalai et al. (1996) *Eur J Biochem* 238 714-723; Kalai et al. (1997) *Blood* 89:1319-1333).

[0007] Повышенное IL-6 было задействовано в качестве основного цитокина для многих симптомов заболеваний. Уровни IL-6 в крови были показаны как повышенные в таких заболеваниях, как ревматоидный артрит, болезнь Кастлемана, ювенильный идиопатический артрит и болезнь Хрона (Nishimoto N, and Kishimoto T. (2004) *Curr Op in Pharmacology* 4:386-391). Из-за этого IL-6 было задействовано в стимулировании патологии таких воспалительных показаний. Дополнительно, множество типов опухолей, как было показано, стимулируются IL-6, включая меланому, почечно-клеточный рак, саркому Капоши, карциному яичников, лимфому, лейкемию, множественную миелому и карциному простаты (Keller E.T. et al. (1996) *Front Biosci.* 1: 340-57). Про повышенные уровни в крови IL-6 сообщали для нескольких видов рака. При некоторых признаках рака повышенные уровни IL-6 использовали в качестве прогностических индикаторов заболевания.

[0008] Ввиду особой роли IL-6 при заболевании, было разработано множество мышиных, химерных, гуманизированных и человеческих античеловеческих IL-6 моноклональных антител в качестве потенциальных терапий (например, US 5856135, WO 2004/020633, US 20060257407 A1, US 7291721). Химерное человеческо-мышиное анти-IL-6 антитело cCLB8 (известное, как CNTO 328) использовали для лечения пациентов с множественной миеломой (van Zaanen et al. (1998) *Brit. Journal. Haematology* 102:783), где стабилизация заболевания наблюдалась у большинства пациентов.

[0009] Положительное влияние ингибирования IL-6 сигналов при раковых и воспалительных заболеваниях было дополнительно описано путем применения гуманизированного анти-IL-6Ra антитела Тоцилизумаб (также известного как hПМ-1, MRA и Актемра). Это гуманизированная версия мышиного анти-IL6Ra антитела ПМ-1. Лечение пациентов данным антителом доказало эффективность для ряда заболеваний, включая ревматоидный артрит, ювенильный идиопатический артрит, болезнь Хрона, миелопролиферативное расстройство, болезнь Кастлемана и системную красную волчанку (СКВ) (Mihara et al. (2005) *Expert Opinion on Biological Therapy.* 5:683-90).

[0010] Критическим вопросом при лечении, основанном на антителах, является персистенция иммуноглобулинов в кровообращении. Скорость иммуноглобулинового клиренса непосредственно влияет на количество и частоту дозировки иммуноглобулина. Повышенная дозировка и частота дозировок могут приводить к неблагоприятным эффектам для пациентов и также повышать медицинские затраты. Ввиду фармацевтической важности терапий, основанных на анти-IL-6 антителе, существует необходимость в разработке модифицированного высокоаффинного человеческого анти-IL-6 антитела, имеющего увеличенный период полувыведения *in vivo*.

Сущность изобретения

[0011] Данное изобретение относится к высокоаффинным человеческим анти-IL-6 антителам, которые специфично связывают человеческое IL-6 и имеют пролонгированный период полувыведения *in vivo*. В одном варианте исполнения, период

полувыведения *in vivo* анти-IL-6 антитела, описанного в данной заявке, составляет от 10 дней до 40 дней. В конкретном варианте исполнения, период полувыведения *in vivo* анти-IL-6 антитела, описанного в данной заявке, составляет от 25 дней до 35 дней. В одном варианте исполнения, анти-IL-6 антитело, описанное в данной заявке, содержит 5 VH и/или VL домен анти-IL-6 антитела, описанные в публикации РСТ № WO 2008/065378. В одном варианте исполнения, анти-IL-6 антитело в соответствии с данным изобретением содержит человеческий IgG константный домен, имеющий одно или более аминокислотных замещений относительно человеческого IgG константный домен дикого типа. В конкретном варианте исполнения, анти-IL-6 антитело в соответствии с 10 данным изобретением содержит человеческий IgG константный домен, содержащий M252Y, S254T и T256E аминокислотные замещения, где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с индексом ЕС, как в Kabat. В другом варианте исполнения, анти-IL-6 антитело в соответствии с данным изобретением содержит последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:9 и последовательность легкой цепи SEQ 15 ID NO:10.

[0012] Данное изобретение дополнительно относится к нуклеиновым кислотам, кодирующим человеческое анти-IL-6 антитело, имеющее пролонгированный период полувыведения, векторам, содержащим нуклеиновые кислоты, клеткам, содержащим 20 данные векторы, и способам получения человеческого анти-IL-6 антитела, имеющего пролонгированный период полувыведения.

[0013] В дополнительных аспектах данного изобретения представлена выделенная нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, кодирующая человеческое анти-IL-6 антитело, имеющее пролонгированный период полувыведения в соответствии с данным изобретением, и способы получения человеческого анти-IL-6 антитела, 25 имеющее пролонгированный период полувыведения, включающее экспрессирование указанной нуклеиновой кислоты в условиях для получения указанного человеческого анти-IL-6 антитела, и его восстановление.

[0014] В дополнительном аспекте представлена клетка-хозяина содержащая или трансформированная нуклеиновой кислотой в соответствии с данным изобретением.

[0015] Дополнительные аспекты данного изобретения обеспечивают композиции, 30 содержащие анти-IL-6 антитело в соответствии с данным изобретением, и их применение в способах связывания, ингибирования и/или нейтрализации IL-6, включая способы лечения человеческого или животного организма при помощи терапии. В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением является стерильной 35 жидкой композицией. В конкретном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит как минимум 100 мг/мл анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением. В другом варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением является лиофилизованной композицией. В дополнительном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным 40 изобретением представляет собой фармацевтическую композицию.

[0016] Антитела в соответствии с этим изобретением могут быть использованы в способе лечения или диагностики, таком, как способ лечения (что может включать профилактическое лечение) заболевания или расстройства человеческого или животного 45 организма (например, у человеческого пациента), который включает введение указанному пациенту эффективное количество связывающего агента в соответствии с этим изобретением. Состояния, которые можно вылечить в соответствии с данным изобретением включают любые состояния, в которых задействовано IL-6, как подробно описано по всей данной заявке.

[0017] Данное изобретение также включает способы нейтрализации IL-6 активности в сыворотке человеческого пациента, который нуждается в этом, включающие введение человеческому пациенту эффективное количество анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением. Данное изобретение дополнительно включает способы профилактики, контроля, лечения или облегчения воспалительного заболевания или расстройства, аутоиммунного заболевания или расстройства, пролиферативного заболевания, заболевания или расстройства, связанного с aberrантной экспрессией и/или активностью IL-6, заболевания или расстройства, связанного с aberrантной экспрессией и/или активностью IL-6 рецептора, или одним и более его симптомами, где указанные способы включают введение субъекту, который нуждается в этом, профилактически или терапевтически эффективного количества анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением.

[0018] Один аспект в соответствии с данным изобретением относится к выделенному модифицированному антителу, которое специфично связывается с IL-6, где модифицированное антитело содержит вариабельный домен и человеческий IgG константный домен, имеющий одно или более аминокислотных замещений относительно человеческого константного домена IgG дикого типа, где антитело имеет пролонгированный период полувыведения по сравнению с периодом полувыведения родительского антитела, содержащего указанный вариабельный домен и человеческий IgG константный домен дикого типа. В одном варианте исполнения данного аспекта в соответствии с данным изобретением, период полувыведения модифицированного антитела как минимум в 2 раза, как минимум 3 раза, как минимум 4 раза, как минимум 5 раз, как минимум 10 раз или как минимум 20 раз длиннее, чем период полувыведения антитела дикого типа. В другом варианте исполнения, период полувыведения модифицированного антитела в 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 10 раз или 20 раз длиннее, чем период полувыведения антитела дикого типа. В дополнительном варианте исполнения, период полувыведения модифицированного антитела от 2 раз до 3 раз, от 2 раз до 5 раз, от 2 раз до 10 раз, от 3 раз до 5 раз, или от 3 раз до 10 раз длиннее, чем период полувыведения антитела дикого типа. В еще одном варианте исполнения, период полувыведения модифицированного антитела составляет как минимум 10 дней, как минимум 15 дней, как минимум 20 дней, как минимум 25 дней, как минимум 26 дней, как минимум 27 дней, как минимум 28 дней, как минимум 29 дней, как минимум 30 дней, как минимум 35 дней, как минимум 40 дней, как минимум 45 дней или как минимум 50 дней. В еще одном дополнительном варианте исполнения, период полувыведения модифицированного антитела составляет 10 дней, 15 дней, 20 дней, 25 дней, 26 дней, 27 дней, 28 дней, 29 дней, 30 дней, 35 дней, 40 дней, 45 дней или 50 дней. В еще одном дополнительном варианте исполнения, период полувыведения модифицированного антитела составляет от 10 дней до 20 дней, от 10 дней до 30 дней, от 10 дней до 40 дней, от 10 дней до 50 дней, от 20 дней до 30 дней, от 20 дней до 40 дней, от 20 дней до 50 дней, от 25 дней до 30 дней, от 25 дней до 40 дней, от 25 дней до 50 дней, от 30 дней до 40 дней, от 30 дней до 50 дней или от 40 дней до 50 дней. В еще одном варианте исполнения, период полувыведения модифицированного антитела представляет собой период полувыведения, измеренный у млекопитающего. В другом варианте исполнения, период полувыведения модифицированного антитела представляет собой период полувыведения, измеренный у нечеловеческого примата. В дополнительном варианте исполнения, модифицированное антитело представляет собой период полувыведения, измеренный у человеческого субъекта.

[0019] Другой аспект, в соответствии с данным изобретением, относится к

выделенному модифицированному антителу, которое специфично связывается с IL-6, где модифицированное антитело содержит человеческий IgG константный домен, имеющий одно или более аминокислотных замещений относительно человеческого константного домена IgG дикого типа, где антитело имеет уменьшенную скорость клиренса по сравнению со скоростью клиренса антитела дикого типа, содержащего человеческий IgG константный домен дикого типа. В одном варианте исполнения данного аспекта в соответствии с данным изобретением, скорость клиренса модифицированного антитела в как минимум 2 раза, как минимум 3 раза, как минимум 4 раза, как минимум 5 раз, как минимум 10 раз или как минимум 20 раз ниже, чем скорость клиренса антитела дикого типа. В другом варианте исполнения, скорость клиренса модифицированного антитела в 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 10 раз или 20 раз ниже, чем скорость клиренса антитела дикого типа. В еще одном дополнительном варианте исполнения, скорость клиренса модифицированного антитела в от 2 раз до 3 раз, от 2 раз до 5 раз, от 2 раз до 10 раз, от 3 раз до 5 раз, или от 3 раз до 10 раз ниже, чем скорость клиренса антитела дикого типа. В другом варианте исполнения, скорость клиренса модифицированного антитела составляет не более чем 1 мл/кг/день, не более чем 2 мл/кг/день, не более чем 3 мл/кг/день, не более чем 4 мл/кг/день, не более чем 5 мл/кг/день, не более чем 7 мл/кг/день, не более чем 10 мл/кг/день, не более чем 15 мл/кг/день или не более чем 20 мл/кг/день. В дополнительном варианте исполнения, скорость клиренса модифицированного антитела составляет 1 мл/кг/день, 2 мл/кг/день, 3 мл/кг/день, 4 мл/кг/день, 5 мл/кг/день, 7 мл/кг/день, 10 мл/кг/день, 15 мл/кг/день или 20 мл/кг/день. В еще одном варианте исполнения, скорость клиренса модифицированного антитела составляет от 1 мл/кг/день до 2 мл/кг/день, от 1 мл/кг/день до 3 мл/кг/день, от 1 мл/кг/день до 5 мл/кг/день, от 1 мл/кг/день до 10 мл/кг/день, от 1 мл/кг/день до 15 мл/кг/день, от 2 мл/кг/день до 5 мл/кг/день, от 2 мл/кг/день до 10 мл/кг/день, от 3 мл/кг/день до 5 мл/кг/день, от 3 мл/кг/день до 10 мл/кг/день или от 5 мл/кг/день до 10 мл/кг/день. В еще одном варианте исполнения, скорость клиренса модифицированного антитела представляет собой скорость клиренса, измеренную у млекопитающего. В другом варианте исполнения, скорость клиренса модифицированного антитела представляет собой скорость клиренса, измеренную у нечеловеческого примата. В дополнительном варианте исполнения, скорость клиренса модифицированного антитела представляет собой скорость клиренса, измеренную у человеческого субъекта. В еще одном варианте исполнения, аминокислотные замещения выбирают из группы, состоящей из: M252Y, M252F, M252W, M252T, S254T, T256S, T256R, T256Q, T256E, T256D, T256T, L309P, Q311S, H433R, H433K, H433S, H433I, H433P, H433Q, N434H, N434F, N434Y и N436H, где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с индексом ЕС, как в Kabat. В другом варианте исполнения, как минимум одно из аминокислотных замещений выбирают из группы, состоящей из M252Y, S254T, T256E, H433K, N434F и N436H, где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с индексом ЕС, как в Kabat. В еще одном варианте исполнения, модифицированный IgG константный домен содержит M252Y, S254T и T256E аминокислотные замещения, где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с индексом ЕС, как в Kabat. В еще одном варианте исполнения, модифицированный IgG константный домен имеет более высокую аффинность по отношению к FcRn, чем IgG константный домен дикого типа. В дополнительном варианте исполнения, человеческий IgG константный домен является человеческим IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 константным доменом. В еще одном дополнительном варианте исполнения, IgG является IgG1.

[0020] Другой аспект в соответствии с данным изобретением относится к

модифицированным антителам, описанным выше, где вариабельный домен содержит: VH CDR1, имеющий аминокислотную последовательность, идентичную или содержащую 1, 2, или 3 замещений аминокислотных остатков относительно SEQ ID NO: 1; VH CDR2, имеющий аминокислотную последовательность, идентичную или содержащую 1, 2, или 3 замещений аминокислотных остатков относительно SEQ ID NO: 2; VH CDR3, имеющий аминокислотную последовательность, идентичную или содержащую 1, 2, или 3 замещений аминокислотных остатков относительно SEQ ID NO: 3; VL CDR1, имеющий аминокислотную последовательность, идентичную или содержащую 1, 2, или 3 замещений аминокислотных остатков относительно SEQ ID NO: 4; VL CDR2, имеющий аминокислотную последовательность, идентичную или содержащую 1, 2, или 3 замещений аминокислотных остатков относительно SEQ ID NO: 5; и VL CDR3, имеющий аминокислотную последовательность, идентичную или содержащую 1, 2, или 3 замещений аминокислотных остатков относительно SEQ ID NO: 6. В одном варианте исполнения, модифицированное антитело в соответствии с любым из пунктов формулы 1-26, где вариабельный домен содержит: VH CDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1; VH CDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2; VH CDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; VL CDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; VL CDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; и VL CDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6. В другом варианте исполнения, вариабельный домен содержит VH домен, содержащий три CDRs, и VL домен, содержащий три CDRs; где три CDRs VH домена содержат: VH CDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1; VH CDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2; и VH CDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3. В дополнительном варианте исполнения, вариабельный домен содержит VH домен, содержащий три CDRs и VL домен, содержащий три CDRs, где три CDRs VL домена содержат: VL CDR1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; VL CDR2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; и VL CDR3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6. В еще одном варианте исполнения вариабельный домен содержит VH домен, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 7 или содержащий 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, или 10 замещений аминокислотных остатков относительно SEQ ID NO: 7, и содержит VL домен, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 8 или содержащий 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, или 10 замещений аминокислотных остатков относительно SEQ ID NO: 8. В другом варианте исполнения, вариабельный домен содержит VH домен SEQ ID NO: 7 и VL домен SEQ ID NO: 8.

[0021] Другой аспект в соответствии с данным изобретением относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей аминокислотную последовательность, кодирующую указанные выше антитела. В одном варианте исполнения, нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-14.

[0022] Другой аспект в соответствии с данным изобретением относится к вектору, содержащему указанные выше нуклеиновые кислоты

[0023] Другой аспект в соответствии с данным изобретением относится к выделенной клетке, содержащей указанные выше векторы.

[0024] Другой аспект в соответствии с данным изобретением относится к выделенной

клетке, экспрессирующей указанные выше модифицированные антитела.

[0025] Другой аспект в соответствии с данным изобретением относится к способу получения модифицированного антитела, включающему культивирование указанной выше выделенной клетки в условиях, достаточных для выработки антитела и

5 восстановления антитела из культуры.

[0026] Другой аспект в соответствии с данным изобретением относится к фармацевтической композиции, содержащей указанные выше модифицированные антитела.

[0027] Другой аспект в соответствии с данным изобретением, относится к способу

10 нейтрализации как минимум 90% свободного IL-6 в сыворотке человека, который нуждается в этом, включающему введение эффективного количества указанного выше модифицированного антитела.

[0028] Другой аспект в соответствии с данным изобретением относится к способу ингибирования как минимум 90% IL-6 опосредованной сигнализации в сыворотке

15 человека, который нуждается в этом, включающему введение человеку эффективного количества указанного выше модифицированного антитела.

[0029] Другой аспект в соответствии с данным изобретением относится к способу нейтрализации как минимум 90% свободного IL-6 в синовиальной жидкости человека, который нуждается в этом, включающему введение человеку эффективного количества

20 модифицированного антитела.

[0030] Другой аспект в соответствии с данным изобретением относится к способу ингибирования как минимум 90% IL-6 опосредованной сигнализации в синовиальной жидкости человека, который нуждается в этом, включающему введение человеку

25 [0031] Другой аспект в соответствии с данным изобретением относится к способу уменьшения роста синовиальных клеток у человека, включающему введение человеку, который нуждается в этом, терапевтически эффективного количества указанного выше антитела.

[0032] Другой аспект в соответствии с данным изобретением относится к способу

30 уменьшения синовиального воспаления у человека, включающему введение человеку, который нуждается в этом, терапевтически эффективного количества указанного выше антитела.

[0033] Другой аспект в соответствии с данным изобретением относится к способу лечения аутоиммунного заболевания или расстройства у человека, включающему

35 введение человеку, который нуждается в этом, терапевтически эффективного количества указанного выше антитела.

[0034] Другой аспект в соответствии с данным изобретением относится к способу лечения злокачественности у человека, включающему введение человеку, который

40 [0035] Другой аспект в соответствии с данным изобретением относится к способу лечения воспалительного заболевания или расстройства у человека, включающему введение человеку, который нуждается в этом, терапевтически эффективного количества указанного выше антитела.

[0036] Другой аспект в соответствии с данным изобретением относится к способу

45 лечения системной красной волчанки, ревматоидного артрита или воспалительного заболевания кишечника у человека, включающему введение человеку, который нуждается в этом, терапевтически эффективного количества указанного выше антитела.

В одном варианте исполнения, согласно способу по любому из пунктов формулы 40-

49, терапевтически эффективное количество содержит разовую или фракционированную дозу приблизительно 0,1-5 мг/кг, приблизительно 0,1-2 мг/кг, приблизительно 0,1-1 мг/кг, приблизительно 0,3-2 мг/кг, приблизительно 0,3-1 мг/кг, приблизительно 0,5-2 мг/кг, или приблизительно 0,5-1 мг/кг модифицированного антитела. В другом варианте исполнения, терапевтически эффективное количество содержит разовую или фракционированную дозу приблизительно 20-500 мг, приблизительно 20-200 мг, приблизительно 20-100 мг, приблизительно 50-500 мг, приблизительно 50-200 мг, или приблизительно 50-100 мг модифицированного антитела. В еще одном варианте исполнения, терапевтически эффективное количество модифицированного антитела вводят один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в три недели, один раз в четыре недели, один раз в восемь недель или один раз в двенадцать недель. В еще одном дополнительном варианте исполнения, терапевтически эффективное количество модифицированного антитела вводят внутривенно или подкожно. В другом варианте исполнения, пациенту вводят разовую дозу нагрузки модифицированного антитела перед введением как минимум одной поддерживающей дозы модифицированного антитела. В еще одном дополнительном варианте исполнения доза нагрузки содержит разовую или фракционированную дозу приблизительно 0,1-5 мг/кг, приблизительно 0,1-2 мг/кг, приблизительно 0,1-1 мг/кг, приблизительно 0,3-2 мг/кг, приблизительно 0,3-1 мг/кг, приблизительно 0,5-2 мг/кг, или приблизительно 0,5-1 мг/кг модифицированного антитела. В еще одном дополнительном варианте исполнения доза нагрузки содержит разовую или фракционированную дозу приблизительно 20-500 мг, приблизительно 20-200 мг, приблизительно 20-100 мг, приблизительно 50-500 мг, приблизительно 50-200 мг, или приблизительно 50-100 мг модифицированного антитела. В еще одном варианте исполнения, поддерживающая доза содержит разовую или фракционированную дозу приблизительно 0,1-5 мг/кг, приблизительно 0,1-2 мг/кг, приблизительно 0,1-1 мг/кг, приблизительно 0,3-2 мг/кг, приблизительно 0,3-1 мг/кг, приблизительно 0,5-2 мг/кг, или приблизительно 0,5-1 мг/кг модифицированного антитела. В еще одном варианте исполнения, поддерживающая доза содержит разовую или фракционированную дозу приблизительно 20-500 мг, приблизительно 20-200 мг, приблизительно 20-100 мг, приблизительно 50-500 мг, приблизительно 50-200 мг, или приблизительно 50-100 мг модифицированного антитела. В другом варианте исполнения, поддерживающую дозу вводят через одну неделю, две недели, три недели, четыре недели, 8 недель, или двенадцать недель после введения дозы нагрузки. В еще одном варианте исполнения, пациенту вводят как минимум две поддерживающие дозы, и поддерживающие дозы вводят один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в три недели, один раз в четыре недели, один раз в восемь недель или один раз в двенадцать недель. В еще одном варианте исполнения, дозу нагрузки модифицированного антитела вводят внутривенно или подкожно. В другом варианте исполнения поддерживающую дозу вводят внутривенно или подкожно. В дополнительном варианте исполнения, терапевтически эффективное количество модифицированного антитела вводят в сочетании со вторым терапевтическим агентом.

[0037] Другой аспект в соответствии с данным изобретением относится к стерильной стабильной водной композиции, содержащей указанные выше антитела. В одном варианте исполнения данного аспекта в соответствии с данным изобретением, антитело не подвергают лиофилизации. В другом варианте исполнения, антитело подвергают лиофилизации. В другом варианте исполнения, концентрация указанного модифицированного антитела составляет как минимум приблизительно 5 мг/мл, как минимум приблизительно 10 мг/мл, как минимум приблизительно 15 мг/мл, как минимум

приблизительно 20 мг/мл, как минимум приблизительно 50 мг/мл, как минимум приблизительно 100 мг/мл, как минимум приблизительно 120 мг/мл, как минимум приблизительно 150 мг/мл, как минимум приблизительно 160 мг/мл, как минимум приблизительно 180 мг/мл, как минимум приблизительно 200 мг/мл, как минимум приблизительно 250 мг/мл, или как минимум приблизительно 300 мг/мл. В дополнительном варианте исполнения, композиция дополнительно содержит как минимум приблизительно один буферный компонент. В другом варианте исполнения, композиция дополнительно содержит как минимум один эксципиент. В еще одном варианте исполнения, буферный компонент выбирают из группы, состоящей из гистидина, цитрата, фосфата, глицина, ацетата. В еще одном варианте исполнения, буферный компонент имеет концентрацию от приблизительно 1 мМ до приблизительно 200 мМ, от приблизительно 1 мМ до приблизительно 50 мМ, или от приблизительно 5 мМ до приблизительно 20 мМ. В еще одном варианте исполнения, буферный компонент имеет концентрацию приблизительно 10 мМ, приблизительно 15 мМ, приблизительно 20 мМ или приблизительно 25 мМ. В дополнительном варианте исполнения, эксципиент является сахаридом. В еще одном варианте исполнения, сахарид является дисахаридом. В еще одном варианте исполнения, дисахаридом является треталоза или сукроза. В дополнительном варианте исполнения, дисахарид имеет концентрацию от приблизительно 1% до приблизительно 40%, от приблизительно 2% до приблизительно 20%, или от приблизительно 2% до приблизительно 10%. В еще одном дополнительном варианте исполнения, дисахарид имеет концентрацию, составляющую приблизительно 2%, приблизительно 4% или приблизительно 8%. В еще одном варианте исполнения, эксципиент является солью. В еще одном варианте исполнения, соль представляет собой хлорид натрия. В дополнительном варианте исполнения, хлорид натрия имеет концентрацию от приблизительно 50 мМ до приблизительно 200 мМ. В другом варианте исполнения, хлорид натрия имеет концентрацию, составляющую приблизительно 70 мМ, приблизительно 75 мМ, приблизительно 80 мМ, приблизительно 100 мМ, приблизительно 120 мМ, или приблизительно 150 мМ. В дополнительном варианте исполнения, эксципиент представляет собой поверхностно-активное вещество. В дополнительном варианте исполнения, поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат. В еще одном дополнительном варианте исполнения, полисорбат является полисорбатом 20 или полисорбатом 80. В еще одном варианте исполнения, поверхностно-активное вещество имеет концентрацию от приблизительно 0,001% до приблизительно 2%. В другом варианте исполнения, поверхностно-активное вещество имеет концентрацию, составляющую приблизительно 0,01%, приблизительно 0,02%, приблизительно 0,04% или приблизительно 0,08%. В еще одном дополнительном варианте исполнения, эксципиент является аминокислотой. В еще одном варианте исполнения, аминокислоту выбирают из группы, состоящей из глицина, гистидина или аргинина. В еще одном варианте исполнения аминокислота имеет концентрацию, составляющую от приблизительно 10 мМ до приблизительно 400 мМ. В еще одном варианте исполнения, аминокислота имеет концентрацию, составляющую приблизительно 25 мМ, приблизительно 50 мМ, приблизительно 100 мМ, приблизительно 150 мМ, приблизительно 200 мМ, приблизительно 250 мМ, приблизительно 300 мМ, приблизительно 350 мМ, или приблизительно 400 мМ. В еще одном варианте исполнения, композиция имеет значение pH от приблизительно 5,5 до приблизительно 6,5. В еще одном варианте исполнения, указанная композиция имеет значение pH приблизительно 6,0. В еще одном варианте исполнения композиция является изотонической. В другом варианте исполнения композиция является стабильной при

хранении при 40°C в течение как минимум приблизительно 4 недель. В еще одном варианте исполнения, композиция является стабильной при хранении при 5°C в течение как минимум приблизительно 3 месяцев. В другом варианте исполнения композиция является стабильной при хранении при 5°C в течение как минимум приблизительно 12

 5 месяцев. В еще одном варианте исполнения, антитело теряет не более чем 20% его IL-6 активности связывания во время хранения указанной композиции при 40°C в течение как минимум приблизительно 4 недель. В еще одном варианте исполнения, антитело теряет не более чем 20% его IL-6 активности связывания во время хранения указанной композиции при 5°C в течение как минимум приблизительно 3 месяцев. В еще одном

 10 варианте исполнения, антитело теряет не более чем 20% его IL-6 активности связывания во время хранения указанной композиции при 5°C в течение как минимум приблизительно 12 месяцев. В еще одном варианте исполнения, антитело теряет не более чем 10% его IL-6 активности связывания во время хранения указанной композиции при 40°C в течение как минимум приблизительно 4 недель. В другом варианте

 15 исполнения, композиция в соответствии с любым из пунктов формулы 64-93, где указанное антитело теряет не более чем 10% его IL-6 активности связывания во время хранения указанной композиции при 5°C в течение как минимум приблизительно 3 месяцев. В другом варианте исполнения, антитело теряет не более чем 10% его IL-6 активности связывания во время хранения указанной композиции при 5°C в течение

 20 как минимум приблизительно 12 месяцев. В другом варианте исполнения, антитело теряет не более чем 5% его IL-6 активности связывания во время хранения указанной композиции при 40°C в течение как минимум приблизительно 4 недель. В другом варианте исполнения, антитело теряет не более чем 5% его IL-6 активности связывания во время хранения указанной композиции при 5°C в течение как минимум

 25 приблизительно 3 месяцев. В другом варианте исполнения, антитело теряет не более чем 5% его IL-6 активности связывания во время хранения указанной композиции при 5°C в течение как минимум приблизительно 12 месяцев. В другом варианте исполнения, антитело является чувствительным к агрегации, или фрагментации. В другом варианте исполнения, менее чем приблизительно 2% указанного антитела образует агрегат при

 30 хранении при 40°C в течение как минимум приблизительно 4 недель, как определено при помощи ВЭЭХ (высокоэффективной эксклюзионной хроматографии). В другом варианте исполнения, менее чем приблизительно 2% указанного антитела образует агрегат при хранении при 5°C в течение как минимум приблизительно 3 месяцев, как определено при помощи ВЭЭХ. В другом варианте исполнения, менее чем

 35 приблизительно 2% указанного антитела образует агрегат при хранении при 5°C в течение как минимум приблизительно 12 месяцев, как определено при помощи ВЭЭХ. В другом варианте исполнения, менее чем приблизительно 5% указанного антитела фрагментируется при хранении при 40°C в течение как минимум приблизительно 4 недель, как определено при помощи ЭХ (эксклюзионной хроматографии). В другом

 40 варианте исполнения, менее чем приблизительно 5% указанного антитела фрагментируется при хранении при 5°C в течение как минимум приблизительно 3 месяцев, как определено при помощи ЭХ. В другом варианте исполнения, менее чем приблизительно 5% указанного антитела фрагментируется при хранении при 5°C в течение как минимум приблизительно 12 месяцев, как определено при помощи ЭХ. В

 45 другом варианте исполнения, композиция является инъекционной композицией. В другом варианте исполнения, композиция приемлема для внутривенного, подкожного, или внутримышечного введения. В другом варианте исполнения, композиция приемлема для аэрозольного введения.

[0038] Другой аспект в соответствии с данным изобретением относится к фармацевтической стандартной лекарственной форме, приемлемой для парентерального введения человеку, которая содержит любые композиции указанного выше антитела в приемлемом контейнере. В одном варианте исполнения, композицию антитела вводят

5 внутривенно, подкожно, или внутримышечно.

[0039] Другой аспект в соответствии с данным изобретением относится к фармацевтической стандартной лекарственной форме, приемлемой для аэрозольного введения человеку, которая содержит любые композиции указанного выше антитела. В одном варианте исполнения данного аспекта в соответствии с данным изобретением,

10 композицию антитела вводят интраназально.

[0040] Другой аспект в соответствии с данным изобретением относится к герметичному контейнеру, содержащему любые указанные выше композиции.

[0041] Другой аспект в соответствии с данным изобретением относится к предварительно наполненному шприцу, содержащему любые указанные выше

15 композиции.

[0042] Другой аспект в соответствии с данным изобретением относится к набору, содержащему любые указанные выше композиции.

[0043] Эти и другие аспекты в соответствии с данным изобретением описаны более подробно ниже.

20 Терминология

[0044] В данной заявке можно подчеркнуть, что "и/или" при использовании здесь должно быть использовано в качестве конкретного описания каждого из двух указанных признаков или компонентов с другим таким признаком или компонентом или без него. Например, "А и/или В" должно быть использовано как конкретное описание каждого

25 из (i) А, (ii) В и (iii) А и В, так, как, если бы каждый из них был отдельно приведен в данной заявке.

IL-6 и IL-6 рецептор

[0045] IL-6 является интерлейкином 6. IL-6 может также иметь в данной заявке название "антиген".

30 [0046] Полноразмерная аминокислотная последовательность человеческого IL-6 представляет собой SEQ ID NO: 15. данную последовательность расщепляют *in vivo* для удаления N-концевого лидерного пептида с получением зрелого IL-6. Зрелое человеческое IL-6 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16. Зрелая последовательность представляет собой *in vivo* IL-6 в кровообращении, которое является

35 антигеном-мишенью для терапевтических и *in vivo* диагностических применений, как описано в данной заявке. Соответственно, IL-6, указанное в данной заявке, обычно является зрелым человеческим IL-6, если иное не следует из контекста.

[0047] IL-6 может быть конъюгировано с детектируемой меткой, такой, как HIS FLAG, например, для применения в анализах, описанных в данной заявке. Например,

40 может быть использован гибридный белок, содержащий IL-6, конъюгированное с последовательностью HIS FLAG.

[0048] IL-6 рецептор, IL-6Ra, представляет собой рецептор для интерлейкина 6. IL-6Ra также известен как IL-6R α , IL-6Ra, IL-6R и ЦД126. IL-6Ra существует *in vivo* в трансмембранной форме и в растворимой форме. Ссылки на IL-6Ra могут быть

45 трансмембранным IL-6Ra и/или растворимым IL-6Ra, если иное не следует из контекста.

[0049] IL-6 рецептор, указанный в данной заявке, является обычно IL-6 рецептором, если не указано иное. Аминокислотная последовательность человеческого растворимого IL-6Ra (sIL-6Ra, sIL-6R) представляет собой SEQ ID NO: 17. Аминокислотная

последовательность человеческого трансмембранного IL-6Ra представляет собой SEQ ID NO: 18.

[0050] IL-6 связывается IL-6Ra с образованием комплекса, IL-6:IL-6Ra. Комплекс может быть или растворимым (с sIL-6Ra), или мембранно-связанным (с трансмембранным IL-6Ra). Если IL-6Ra представляет собой растворимую форму, то комплекс обозначен IL-6:sIL-6Ra. Ссылки на IL-6:IL-6Ra могут включать IL-6 в комплексе с трансмембранным IL-6Ra или с растворимым IL-6Ra, если иное не следует из контекста.

gp130

[0051] gp130 представляет собой рецептор для IL-6:IL-6Ra комплекса. Клонирование и характеристика gp130 сообщены в Hibi et al., Cell 63:1149-1157 (1990).

Последовательность человеческого gp130 приведена в SEQ ID NO: 19.

Агент связывания

[0052] Он описывает один член пары молекул, которые связываются друг с другом. Компоненты пары связывания могут быть получены целиком природные или получены частично синтетически. Один член пары молекул имеет площадь поверхности, или полость, которая связывается и поэтому комплементарна конкретной пространственной и полярной организации другого члена пары молекул. Примеры типов пар связывания представляют собой антиген-антитело, биотин-авидин, гормон-гормон рецептор, рецептор-лиганд, фермент-субстрат. Данное изобретение касается реакций типа антиген-антитело.

[0053] Агент связывания обычно содержит молекулу, содержащую сайт связывания антигена. Например, агент связывания может быть молекулой антитела или белком неантитела, содержащим сайт связывания антигена.

[0054] Сайт связывания антигена может быть обеспечен при помощи компоновки CDRs на белковых каркасах не-антитела, таких, как фибронектин или цитохром В и т.д. (Haan & Maggos (2004) BioCentury, 12(5): A1-A6; Koide et al. (1998) Journal of Molecular Biology, 284: 1141-1151; Nygren et al. (1997) Curr. Op. Structural Biology, 7:463-469), или путем рандомизации или мутирования аминокислотных остатков петли внутри белкового каркаса для придания специфичности связывания для желаемой мишени. Каркасы для разработки новых сайтов связывания у белков, были рассмотрены подробно в Nygren et al. (Nygren et al. (1997) Curr. Op. Structural Biology, 7: 463-469). Белковые каркасы для мимиков антител описаны в WO/0034784, которая включена полностью в данную заявку путем ссылки, в которой изобретатели описывают белки (мимики антител), содержащие домен фибринонектина типа III, имеющий как минимум одну рандомизованную петлю. Приемлемый каркас, в который трансплантируют один или более CDRs, например, набор HCDRs, может быть обеспечен при помощи любого доменного члена иммуноглобулинового генного суперсемейства. Каркас может быть человеческим или нечеловеческим белком. Преимуществом белкового не-антительного каркаса является то, что он может обеспечивать сайт связывания антигена в молекуле каркаса, меньший и/или более легкий для производства, чем как минимум некоторые молекулы антитела. Небольшой размер агента связывания может придавать полезные физиологические свойства, например способность, проникать в клетки, глубоко проникать в ткани или достигать мишеней внутри других структур, или связывать внутри белковых полостей антиген-мишень. Применение сайтов связывания антигена в белковых не-антительных каркасах рассмотрено в Wess (Wess, L. (2004) In: BioCentury, The Bernstein Report on BioBusiness, 12(42), A1-A7). Типичными являются белки, имеющие стабильный каркас и одну или более вариабельных петель, в которых аминокислотная последовательность петли или петель специфично или рандомизировано мутировала с образованием сайта

связывания антигена, который связывает антиген-мишень. Такие белки включают IgG-связывающие домены белка A из S, ауреус, трансферрин, тетранектин, фибронектин (например, 10-ый домен фибронектина типа III), липокалины, а также гамма-кристаллические и другие аффилинTM каркасы (Scil Proteins). Примеры других подходов включают синтетические "микрободи", основанные на циклотидах - небольших белках, имеющих внутримолекулярные дисульфидные связи, микробелки (версабодиTM, амуникс) и анкирин повторные белки (DARPin, Molecular Partners).

[0055] В дополнение к последовательностям антител и/или сайту связывания антигена, агент связывания в соответствии с данным изобретением может содержать другие аминокислоты, например, образуя пептид или полипептид, такой, как складчатый домен, или придавать молекуле другую функциональную характеристику в дополнение к способности связывать антиген. Агенты связывания в соответствии с данным изобретением могут нести детектируемую метку, или могут быть конъюгированы с токсином или направленным фрагментом или ферментом (например, посредством пептидильной связи или линкера). Например, агент связывания может содержать каталитический сайт (например, в ферментном домене), а также сайт связывания антигена, где сайт связывания антигена связывается с антигеном и, таким образом, направляет каталитический сайт на антиген. Каталитический сайт может ингибировать биологическую функцию антигена, например, при помощи расщепления.

[0056] Хотя, как отмечено, CDRs могут нести каркасы не антител, структура для несения CDR или набора CDRs в соответствии с данным изобретением будет в общем последовательностью тяжелой или легкой цепи антитела или его существенной частью, где CDR или набор CDRs расположены в месте, соответствующем CDR или набору CDRs, встречающихся в природе переменных доменов VH и VL антител, кодированных реаранжированными иммуноглобулиновыми генами. Структуры и расположения иммуноглобулиновых переменных доменов могут быть определены путем ссылки на Kabat, et al. (Kabat, E.A. et al., Последовательности of Proteins of Immunological Interest. 4th Edition. US Department of Health and Human Services. (1987)), и его обновления. Для запроса в данной базе данных доступен ряд академических и коммерческих он-лайн ресурсов. Например, см. ссылку Martin, A.C.R. (Accessing the Kabat Antibody Sequence Database by Computer PROTEINS: Structure, Function and Genetics, 25 (1996), 130-133) и связанный он-лайн ресурс, который в данное время находится по интернет-адресу bioinf.org.uk/abs/simkab.html.

[0057] Под CDR участком, или CDR, подразумевают гипервариабельные участки тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина, как определено Kabat et al. (Kabat, E.A. et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Edition. US Department of Health and Human Services, Public Service, NIH, Washington or later editions) или Chothia and Lesk (J. Mol. Biol., 196:901-917 (1987)). Антитело типично содержит 3 CDRs тяжелой цепи и 3 CDRs легкой цепи. Термин CDR или CDRs используют в данной заявке для указания, соответственно случаю, одного из этих участков, или нескольких, или даже целиком, этих участков, содержащих большинство аминокислотных остатков, отвечающих за связывание при помощи аффинности антитела к антигену или эпитопу, который оно распознает.

[0058] Среди шести коротких CDR последовательностей, третий CDR тяжелой цепи (HCDR3) имеет больший размер вариабельности (большее различие существенно из-за механизмов расположения генов, что приводит к нему). Он может содержать не менее чем 2 аминокислоты, хотя наибольший известный размер - 26. Длина CDR может также варьироваться в соответствии с длиной, которая может быть отрегулирована при

помощи конкретного лежащего под ним каркаса. Функционально HCDR3 частично участвует в определении специфичности антитела (Segal et al., (1974) PNAS, 71:4298-4302; Amit et al., (1986) Science, 233:747-753; Chothia et al., (1987) J. Mol. Biol., 196:901-917; Chothia et al., (1989) Nature, 342:877-883; Caton et al., (1990) J. Immunol., 144:1965-1968; Sharon et al., (1990) PNAS, 87:4814-4817; Sharon et al., (1990) J. Immunol., 144:4863-4869; Kabat et al., (1991) J. Immunol., 147:1709-1719; Holliger & Hudson, Nature Biotechnology 23(9): 1126-1136 2005).

[0059] HCDR1 может иметь длину 5 аминокислот, состоящих из Kabat остатков 31-35.

[0060] HCDR2 может иметь длину 17 аминокислот, состоящих из Kabat остатков 50-65.

[0061] HCDR3 может быть иметь длину 11 или 12 аминокислот, состоящих из Kabat остатков 95-102, необязательно включая Kabat остаток 100D.

[0062] LCDR1 может быть иметь длину 11 аминокислот, состоящих из Kabat остатков 24-34.

[0063] LCDR2 может иметь длину 7 аминокислот, состоящих из Kabat остатков 50-56.

[0064] LCDR3 может иметь длину 8 или 9 аминокислот, состоящих из Kabat остатков 89-97, необязательно включая Kabat остаток 95.

Молекула антитела

[0065] Она описывает иммуноглобулин, природный или частично или полностью полученный синтетическим путем. Термин также охватывает любой полипептид или белок, содержащий антительный сайт связывания антигена. В данной заявке должно быть понятно, что данное изобретение не относится к антителу в природном виде, то есть, оно не встречается в его природном окружении, но его можно было выделить или получить путем очистки из природных источников, или также получено путем генетической рекомбинации, или химическим синтезом, и в связи с этим оно может содержать неприродные аминокислоты, как будет описано далее. Фрагменты антитела, содержащие антительный сайт связывания антигена, включают, не ограничиваясь приведенными, такие молекулы, как Fab, Fab', Fab'-SH, scFv, Fv, dAb и Fd. Были сконструированы различные другие молекулы антител, включая один или более антительные сайты связывания антигенов, включая, например, Fab2, Fab3, диабоды, триабоды, тетрабоды и минибоды. Молекулы антител и способы их конструирования и применения описаны в Holliger & Hudson (Nature Biotechnology 23(9): 1126-1136 (2005)).

[0066] Возможно, взять моноклональные и другие антитела и использовать методы рекомбинантной ДНК технологии для получения других молекул антител или химерных молекул, связывающих целевой антиген. Такие методы могут включать введение ДНК, кодирующей иммуноглобулиновый вариабельный участок, или CDRs, антитела в константные участки, или константные участки плюс каркасные участки, разных иммуноглобулинов. См., например, EP-A-184187, GB 2188638 A или EP-A-239400, и литературу о последовательностях больших тел. Гибридома или другая клетка, продуцирующая антитело, может быть подвергнута генетической мутации или другим изменениям, которые могут или не могут изменять специфичность связывания полученного антитела.

[0067] Поскольку антитела могут быть модифицированы при помощи ряда способов, термин "молекула антитела" должен быть истолкован как охватывающий любой агент связывания или вещество, содержащее антительный сайт связывания антигена с необходимой специфичностью и/или связыванием антигена. Таким образом, данный

термин охватывает фрагменты и производные антител, включая любой полипептид, содержащий антителый сайт связывания антигена, природный или полностью или частично синтетический. Поэтому включены химерные молекулы, содержащие антителый сайт связывания антигена, или эквивалент, гибридный с другим полипептидом (например, полученные из других видов или относящихся к другому классу или подклассу антитела). Клонирование и экспрессия химерного антитела описаны в EP-A-0120694 и EP-A-0125023, и в литературе о последовательностях больших тел.

[0068] Дополнительно, методы, доступные из уровня техники для конструирования антител, давали возможность выделить человеческие и гуманизированные антитела. Например, человеческие гибридомы могут быть получены так, как описано у Kontermann & Dubel (Kontermann, R & Dubel, S, Антитело Engineering, Springer-Verlag New York, LLC; 2001, ISBN: 3540413545). Фаговый дисплей и другие установленные методы генерирования агентов связывания, были подробно описаны во многих публикациях, например, Kontermann & Dubel (Kontermann, R & Dubel, S, Антитело Engineering, Springer-Verlag New York, LLC; 2001, ISBN: 3540413545) и WO 92/01047 (обсуждены дополнительно ниже), и патентах США US 5969108, US 5565332, US 5733743, US 5858657, US 5871907, US 5872215, US 5885793, US 5962255, US 6140471, US 6172197, US 6225447, US 6291650, US 6492160, US 6521404.

[0069] Трансгенные мыши, например, мыши, у которых гены мышинового антитела инактивированы и функционально замещены генами человеческого антитела при оставлении интактными других компонентов мышинной иммунной системы, могут быть применены для выделения человеческого антитела (Mendez, M. et al. (1997) Nature Genet, 15(2): 146-156). Гуманизированные антитела могут быть получены при помощи способов, известных из уровня техники, таких, как описаны, например в WO 91/09967, US 5,585,089, EP 592106, US 565,332 и WO 93/17105. Кроме того, в WO 2004/006955 описаны способы гуманизирования антитела, основанные на отборе каркасной последовательности переменного участка из генов человеческого антитела, путем сравнения канонических типов структур CDR последовательности переменного участка нечеловеческого антитела с каноническими типами структур CDR для соответствующих CDRs из библиотеки последовательностей человеческого антитела, например, генных сегментов зародышевых антител. Переменные участки человеческого антитела, имеющие канонические структурные типы CDR, аналогичные нечеловеческим CDRs, образуют подмножество членов последовательностей человеческого антитела, из которых отбирают человеческие каркасные последовательности. Члены подмножества могут быть дополнительно ранжированы путем аминокислотной схожести человеческой и нечеловеческой CDR последовательностей. В способе, описанном в WO 2004/006955, человеческие последовательности в верхней части рейтинга отбирали для обеспечения каркасных последовательностей для конструирования химерного антитела, которое функционально замещает человеческие CDR последовательности на нечеловеческие CDR-аналоги при помощи отобранных человеческих каркасов - членов подмножества, таким образом, обеспечивая гуманизированное антитело с высокой аффинностью и низкой иммуногенностью без необходимости в сравнении каркасной последовательности нечеловеческого и человеческого антитела. Также описаны химерные антитела, полученные в соответствии со способом.

[0070] Синтетические молекулы антитела могут быть созданы путем экспрессии из генов, полученных при помощи олигонуклеотидов, синтезированных и собранных в приемлемых векторах экспрессии, например как описано Knappik et al. (Knappik et al.

(2000) J. Mol. Biol. 296, 57-86) или Krebs et al. (Krebs et al. (2001) J. Immunological Methods 254 67-84).

[0071] Было показано, что фрагменты полного антитела могут выполнять функцию связывания антигенов. Примеры фрагментов связывания следующие: (i) Fab фрагмент, состоящий из VL, VH, CL и CH1 доменов; (ii) Fd фрагмент, состоящий из VH и CH1 доменов; (iii) Fv фрагмент, состоящий из VL и VH доменов одного антитела; (iv) dAb фрагмент (Ward, E.S. et al., (1989) Nature 341, 544-546; McCafferty et al. (1990) Nature, 348, 552-554; Holt et al. (2003) Trends in Biotechnology 21, 484-490), состоящий из VH или VL домена; (v) выделенные CDR участки; (vi) F(ab')₂ фрагменты, бивалентный фрагмент, содержащий два связанных Fab фрагмента (vii) одноцепочечные Fv молекулы (scFv), где VH домен и VL домен связаны пептидным линкером, что позволяет ассоциацию двух доменов с образованием сайта связывания антигена (Bird et al., (1988) Science, 242,423-426; Huston et al., (1988) PNAS USA, 85, 5879-5883); (viii) биспецифические одноцепочечные Fv димеры (PCT/US 92/09965) и (ix) "диабоды", мультивалентные или мультиспецифичные фрагменты, сконструированные при помощи генной гибридизации (WO 94/13804; Holliger, P. et al., (1993) PNAS USA 90 6444-6448). Молекулы Fv, scFv или диабоды могут быть стабилизированы путем введения дисульфидных мостиков, соединяющих VH и VL домены (Reiter, Y. et al., (1996) Nature Biotech, 14,1239-1245). Могут быть также получены минибоды, содержащие scFv, соединенный с CH3 доменом (Hu, S. et al., (1996) Cancer Res., 56, 3055-3061). Другие примеры фрагментов связывания представляют собой Fab', который отличается от Fab фрагментов путем добавления нескольких остатков на карбоксильном конце тяжелой цепи CH1 домена, включая один и более цистеинов из шарнирного участка антитела, и Fab'-SH, который представляет собой Fab' фрагмент, в котором цистеиновый остаток (остатки) константного домена имеют свободную тиольную группу.

[0072] Qui et al. (Qui et al., (2007) Nat. Biotechnol. 25:921-929) описал молекулы антитела, содержащие только два CDRs, связанные каркасным участком. CDR3 из VH или VL домена были связаны с CDR1 или CDR2 петлей другого домена. Связь проходила через C конец CDR1 или CDR2 к N концу CDR3, через FR участок. Qui et al. отобрали FR участок, имеющий наименьшее количество гидрофобных участков. Наилучшая комбинация для проанализированных антител, как было найдено, является VL CDR1, связанный посредством VH FR2 с VH CDR3 (VHCDR1-VHFR2-VLCDR3). При молекулярной массе приблизительно 3 kDa, данные молекулы антитела предлагают преимущества в терминах улучшенного проникновения через ткани по сравнению с полными иммуноглобулинами (приблизительно 150 kDa) или scFv (приблизительно 28 kDa).

[0073] Фрагменты антител в соответствии с данным изобретением могут быть получены, начиная от молекулы родительского антитела или любых молекул антител 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 14, 16, 17, 18, 19, 21, 22 и 23, такими способами, как дигестия при помощи ферментов, например, пепсина или папаина и/или путем расщепления дисульфидных мостиков путем химического восстановления. Другим способом, фрагменты антител, описанные в данном изобретении, могут быть получены методами генетической рекомбинации аналогично хорошо известным специалисту в данной области или также путем пептидного синтеза при помощи, например, автоматических пептидных синтезаторов, таких, как предоставляет компания Applied Biosystems, и т.д., или при помощи нуклеиново-кислотного синтеза или экспрессии.

[0074] Функциональные фрагменты антител в соответствии с данным изобретением включают любые функциональные фрагменты, период полувыведения которых увеличен

путем химической модификации, в особенности пегилирования, путем введения липосомы путем гибридизации в альбумин или его фрагмент.

[0075] dAb (домен антитела) является небольшим мономерным антиген-связывающим фрагментом антитела, а именно тяжелой и легкой цепью варибельного участка антитела (Holt et al. (2003) Trends in Biotechnology 21, 484-490). VH dAbs встречается в природе в кэмелбоди (например, верблюда, ламы) и может быть получено путем иммунизации верблюжьей антиген-мишени, выделением антиген-специфичной В клетки и непосредственным клонированием dAb генов из индивидуальных В клеток. dAbs также можно получать в клеточной культуре. Их малый размер, хорошая растворимость и температурная устойчивость делает их особо физиологически полезными и приемлемыми для отбора и аффинной мацурции. Верблюжьи VH dAbs разрабатывают для терапевтического применения под названием "нанободи™". Агент связывания в соответствии с данным изобретением может быть dAb, содержащим VH или VL домен в существенной степени, как приведено в данной заявке, или VH или VL домен, содержащий множество CDRs в существенной степени, как приведено в данной заявке.

[0076] Биспецифичные или бифункциональные антитела образуют второе поколение моноклональных антител, в которых два различных варибельных участка соединены в одной и той же молекуле (Holliger and Bohlen (1999) Cancer & Metastasis Rev. 18: 411-419). Их использование было продемонстрировано как в области диагностики, так и в области терапии, благодаря их способности придавать новые эффекторные функции или направлять несколько молекул на поверхность опухолевой клетки. Если биспецифичные антитела должны быть использованы, то они могут быть традиционными биспецифичными антителами, которые могут быть произведены различными способами (Holliger, P. and Winter G. (1993) Curr. Op. Biotech. 4,446-449), например, получены химически или из гибридных гибридом, или могут быть любыми фрагментами биспецифичных антител, указанных выше. Такие антитела могут быть получены химическими способами (Glennie M J et al. (1987) J. Immunol. 139,2367-2375; Repp R. et al. (1995) J. Hematother. 4: 415-21) или соматическими способами (Staerz U.D. and Bevan M.J. (1986) PNAS USA 83: 1453-7; Suresh M.R. et al. (1986) Method Enzymol. 121: 210-228), но аналогично и преимущественно, способами генетического конструирования, что позволяет усиление гетеродимеризации и, таким образом, облегчает процесс очистки рассматриваемого антитела (Merchand et al. (1998) Nature Biotech. 16:677-681). Примеры биспецифичных антител включают антитела, полученные по ViTE™ технологии, в которой связывающие домены двух антител с различной специфичностью могут быть использованы и непосредственно связаны при помощи коротких гибких пептидов. Это соединяет два антитела на короткой одинарной полипептидной цепи. Диабоды и scFv могут быть сконструированы без Fc участка, с использованием только варибельных доменов, возможно уменьшая влияния анти-идиотипичной реакции.

[0077] Биспецифичные антитела могут быть сконструированы как полные IgG, ввиду биспецифичности Fab'2, как Fab'PEG, как диабоды или также как scFv. Дополнительно, два биспецифичных антитела могут быть соединены при помощи стандартных способов, известных из уровня техники для образования тетравалентных антител.

[0078] Биспецифичные диабоды, в отличие от биспецифичных цельных антител, могут быть также в особенности полезными, поскольку они могут быть легко сконструированы и экспрессированы в E.coli. Диабоды (и многие другие полипептиды, такие, как фрагменты антител) с соответствующей специфичностью связывания, могут быть легко отобраны при помощи фагового дисплея (WO 94/13804) из библиотек. Если одно плечо диабоды должно сохраняться константным, например, со специфичностью, направленной

на IL-6, то может быть получена библиотека, в которой другое плечо переменное, и выбирают антитело с соответствующей специфичностью. Биспецифичные цельные антитела могут быть получены при помощи альтернативных способов конструирования, как описано в Ridgeway et al., (Ridgeway, J.B.B. et al. (1996) Protein Eng., 9, 616-621).

5 [0079] В данной области существуют различные способы получения антител против IL-6. Антитела могут быть моноклональными антителами, в особенности человеческого, мышиноного, химерного или гуманизированного происхождения, которые могут быть получены в соответствии со стандартными способами, которые хорошо известны специалисту в данной области.

10 [0080] В общем, для получения моноклональных антител или их функциональных фрагментов, в особенности мышиноного происхождения, возможно обратиться к методам, которые описаны в частности в руководстве "Antibodies" (Harlow and Lane, Антитела: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor N.Y., pp. 726, 1988)

15 или к методу получения гибридов, описанных **Köhler** and Milstein (

20 **Köhler** and Milstein (1975) Nature, 256:495-497).

[0081] Моноклональные антитела могут быть получены, например, из В клетки животного, иммунизированного против IL-6, или одного из ее фрагментов, содержащих эпитоп, распознанный указанным моноклональным антителом. Приемлемые фрагменты
25 и пептиды или полипептиды, содержащие их, описаны в данной заявке и могут быть использованы для иммунизации животных с получением антитела против IL-6. Указанное IL-6, или один из его фрагментов, могут быть в частности получены в соответствии с обычными методами работы, путем генетической рекомбинации, начиная с последовательности нуклеиновой кислоты, которая содержится в кДНК
30 последовательности, кодирующей IL-6 или его фрагмент, путем пептидного синтеза, начиная с последовательности аминокислоты, которая содержится в пептидной последовательности IL-6 и/или его фрагмента.

[0082] Моноклональные антитела могут, например, быть очищены на колонке для аффинной хроматографии, на которой IL-6 или один из его фрагментов, содержащих эпитоп, распознанный указанным моноклональным антителом, был предварительно
35 иммобилизован. Более конкретно, моноклональные антитела могут быть очищены при помощи хроматографии на белке А и/или G, с последующей ион-обменной хроматографией, направленной на устранение остаточных белковых загрязнений, а также ДНК и липолисахарид, самих по себе, или без ион-обменной хроматографии, с
40 последующей эксклюзионной хроматографией на сефарозном геле для устранения возможных агрегатов, вызванных присутствием димеров или других мультимеров, или без эксклюзионной хроматографии. В одном варианте исполнения, все из этих методов могут быть использованы одновременно или последовательно.

Сайт связывания антигена

45 [0083] Это описывает часть молекулы, которая связывается и комплементарна всей или части антигена-мишени. Если молекулу антитела называют антительным сайтом связывания антигена, она составляет часть антитела, которая связывается со всем или с частью антигена-мишени. Если антиген большой, антитело может только связывать

конкретную часть антигена, такую часть называют эпитопом. Антительный сайт связывания антигена может быть обеспечен одним или более вариабельным доменом антитела. Антительный сайт связывания антигена может содержать антитело вариабельный участок легкой цепи (VL) и вариабельный участок тяжелой цепи антитела (VH).

[0084] WO 2006/072620 описывает конструирование сайтов связывания антигенов в структурных (не-CDR) петлях, расширяя бета-ветви иммуноглобулиновых доменов. Сайт связывания антигена может быть сконструирован в участке молекулы антитела отдельно от природного расположения CDRs, например, в каркасном участке VH или VL домена, или в константном домене антитела, например, CH1 и/или CH3. Сайт связывания антигена, сконструированный в структурном участке, может быть дополнительным, или замещать, сайт связывания антигена, образованный множествами CDRs VH и VL доменов. Там, где множественные сайты связывания антигенов присутствуют в молекулах, они могут связывать тот же самый антиген (IL-6), таким образом, повышая валентность агента связывания. Альтернативно, множественные сайты связывания антигенов могут связывать различные антигены (IL-6 и один или более других антигенов), и они могут быть использованы для добавления эффекторных функций, удлинения периода полувыведения или улучшения доставки молекулы антитела *in vivo*.

Выделенный

[0085] Это относится к состоянию, в котором агенты связывания в соответствии с данным изобретением, или нуклеиновая кислота, кодирующая такие агенты связывания, будет в общем находиться в соответствии с данным изобретением. Таким образом, агенты связывания, VH и/или VL домены, и кодирующие молекулы нуклеиновой кислоты и векторы в соответствии с данным изобретением могут быть обеспечены выделенными и/или очищенными, например, из природного окружения, в существенно чистой или гомогенной форме, или в случае нуклеиновой кислоты, не содержащей или в существенной степени не содержащей нуклеиновой кислоты или генов, которые получены не из последовательности, кодирующей полипептид с необходимой функцией. Выделенные компоненты и выделенная нуклеиновая кислота будут свободны, или в существенной степени свободны, от материала, с которым они природно связаны, например, других полипептидов или нуклеиновых кислот, с которыми они встречаются в природной окружающей их среде, или окружающей среде, в которой их получают (например, клеточной культуре), если такое получение производят путем рекомбинантной ДНК-технологии, которую реализуют *in vitro* или *in vivo*. Члены и нуклеиновая кислота могут быть составлены в композицию с разбавителями или адъювантами и выделены в практических целях, например, компоненты будут обычно смешаны с желатином или другими носителями при использовании для покрытия пластин микротитратора для применения в иммуноанализах, или будут смешаны с фармацевтически приемлемыми носителями или разбавителями при использовании в диагностике или терапии. Агенты связывания могут быть гликолизированы природно или при помощи систем гетерологических эукариотических клеток (например, CHO или NS0 (ECACC 85110503) клетки, или могут быть негликолизированы (например, если они получены путем экспрессии в прокариотическую клетку).

[0086] Гетерогенные препараты, содержащие молекулы анти-IL-6 антитела также входят в данное изобретение. Например, такие препараты могут быть смесями антител с полноразмерными тяжелыми цепями и тяжелыми цепями, не содержащими C-концевой лизин, с различными степенями гликолизирования и/или с дериватизированными

аминокислотами, например, циклизацией N- концевой глутамовой кислоты с образованием пироглутамового кислотного остатка.

[0087] Как используют в данной заявке, фраза "существенно, как приведено" относится к характеристике (кам) релевантных CDRs. VH VL члены доменного связывания, описанные в данной заявке, будут идентичны или в высокой степени аналогичны указанным участкам, последовательность которых приведена в данной заявке. Как описано в данной заявке, фраза "в высокой степени аналогичны" в отношении указанного участка (указанных участков) одного или более переменных доменов, охватывает, например, от 1 до приблизительно 5, от 1 до 4, включая 1-3, или 1 или 2, или 3 или 4, аминокислотных замещений, которые могут быть произведены в CDR и/или VH или VL домене.

Краткое описание фигур

[0088] На Фигуре 1 представлен Антителный 18E, но не Антителный 18 Fc участок содержит YTE эпитоп. Наличие YTE эпитопа в Fc участке было детектировано путем применения анти-YTE иммобилизованного антитела в анализе ELISA (твердофазного иммуноферментного анализа). Показаны кривые титрования ELISA для Антитела 18 и Антитела 18E.

[0089] На Фигуре 2 представлено связывание Антитела 18, Антитела 18E, IL-6 антитела A (AB A) и IL-6 антитела B (AB B) контролировали при помощи анализов ELISA. Полученный из E. coli рекомбинантный IL-6 использовали как иммобилизованный агент. Антитело 18 и Антитело 18E проявляли существенно идентичные IL-6 активности связывания. EC₅₀, детектированные для Антитела 18 и Антитела 18E, составляли 6,1 пМ и 6,5 пМ, соответственно.

[0090] 81/1

	Среднее EC ₅₀ (пМ)	П
18E	6,5	4
18	6.1	3
Ab A	7.8	4
Ab B	14.1	4

[0091] На Фигуре 3 представлено Антитело 18 и Антитело 18E ингибируют IL-6 вызванную TF-1 клеточную пролиферацию с существенно идентичной эффективностью. IC₅₀ значения были определены для антитела 18, Антитела 18E, IL-6 антитела A (AB A) и IL-6 антитела B (AB B). Показаны кривые % максимального ингибирования как функция концентрации антител. IC₅₀, детектированные для Антитела 18 и Антитела 18E, составляли 4,5 пМ и 5,2 пМ, соответственно.

	Среднее IC ₅₀ (пМ)	п
18Е	5.2	3
18	4.5	3
Ab A	5.9	3
Ab B	75.1	3

[0092] На Фигуре 4 представлено Антитело 18 и Антитело 18Е ингибируют эндогенное IL-6, вызвавший фактор роста эндотелия сосудов высвобождение из человеческих синовиальных фибробластов с существенно идентичной эффективностью. IC₅₀ значения были определены для антитела 18, Антитела 18Е, IL-6 антитела А (АВ А) и IL-6 антитела В (АВ В). Показаны кривые % максимального ингибирования как функция концентрации антитела. IC₅₀, детектированные для Антитела 18 и Антитела 18 Е, составляли 1,3 пМ и 1,2 пМ, соответственно.

	Среднее Ю ₅₀ (нМ)	п
18Е	1.2	3
1a	1.3	3
Ab A	2,8	3
Ab B	2.2	3

[0093] На Фигуре 5 представлен фармакокинетический профиль Антитела 18 и Антитела 18Е. Одинарную дозу 5 мг/кг Антитела 18 или Антитела 18Е вводили подкожно или внутривенно яванским макакам. Уровни антитела в плазме детектировали после введения антитела показаны как функция времени. Период полувыведения Антитела 18 составляет приблизительно от 8,5 дней до 9,1 дней после внутривенного и подкожного введения, соответственно. Период полувыведения Антитела 18Е составляет приблизительно от 28,4 дней до 28,8 дней после внутривенного и подкожного введения, соответственно.

[0094] На Фигуре 6 представлен фармакокинетический и фармакодинамический профиль антитела 18 и Антитела 18Е. 5 мг/кг Антитела 18 или Антитела 18Е вводили

подкожно яванским макакам. Уровни антитела в плазме общие уровни IL-6 в плазме, которые детектировали после введения антитела, показаны как функция времени. Символы представляют экспериментальные PK и PD и пунктирные линии являются моделью PKPD, которые подогнаны одновременно к данным PK и PD. Оцененный период полувыведения Антитела 18 и Антитела 18Е составляет от 9,1 дней до 28,8 дней, соответственно. Оцененный клиренс Антитела 18 и Антитела 18Е составляет 13,1 мл/день/кг и 2,8 мл/день/кг, соответственно.

[0095] На Фигуре 7 представлена симуляция свободных IL-6 уровней в плазме RA пациентов после подкожного введения различных доз Антитела 18Е. Симуляция прогнозирует, что непрерывное как минимум 90% ингибирование IL-6 опосредованной сигнализации должно быть достигнуто путем подкожного введения 100 мг Антитела 18Е каждые 8 недель или путем подкожного введения 50 мг Антитела 18Е каждые 4 недели. Подкожное введение 100 мг Антитела 18Е каждые 12 недель, как прогнозируют, не достигает непрерывного как минимум 90% ингибирования IL-6 опосредованной сигнализации.

[0096] На Фигуре 8 представлена симуляция свободных IL-6 уровней в плазме RA пациентов после подкожного введения Антитела 18 или Антитела 18Е. Симуляция прогнозирует, что непрерывное как минимум 90% ингибирование IL-6 опосредованной сигнализации должно быть достигнуто путем введения разовой дозы нагрузки 200 мг Антитела 18Е с последующими поддерживающими дозами 100 мг Антитела 18Е, которые давали один раз каждые 8 недель. Симуляция дополнительно прогнозирует, что введение 500 мг Антитела 18 каждые 8 недель не должно достигать непрерывного как минимум 90% ингибирования IL-6 опосредованной сигнализации.

[0097] На Фигуре 9 представлена симуляция свободных IL-6 уровней в плазме RA пациентов после подкожного введения различных доз антитела 18 или Антитела 18Е. Симуляция показывает, что непрерывное как минимум 90% ингибирование IL-6 опосредованной сигнализации должно быть достигнуто путем введения одинарной подкожной дозы нагрузки 100 мг Антитела 18Е с последующими ежемесячными подкожными поддерживающими дозами 50 мг Антитела 18Е. Симуляция дополнительно прогнозирует, что непрерывное как минимум 90% ингибирование IL-6 опосредованной сигнализации должно быть достигнуто путем введения два раза в неделю подкожных доз 100 мг Антитела 18, но не путем введения ежемесячно подкожных доз 100 мг Антитела 18.

[0098] На Фигуре 10 представлена симуляция свободных IL-6 уровней в плазме RA пациентов после подкожного введения различных доз антитела 18 или Антитела 18Е. Симуляция прогнозирует, что непрерывное как минимум 90% ингибирование IL-6 опосредованной сигнализации должно быть достигнуто путем введения одинарной подкожной дозы нагрузки 200 мг Антитела 18Е с последующим введением подкожно поддерживающих доз 100 мг Антитела 18Е каждые 4 или 8 недель. Симуляция дополнительно прогнозирует, что непрерывное как минимум 90% ингибирование IL-6 опосредованной сигнализации не может быть достигнуто путем введения 100 мг Антитела 18 каждые 4 или 8 недель.

[0099] На Фигуре 11 представлено влияние mAb406 на гиперчувствительность к нагреванию при 46°C в мышинной ПАФ хвостовой модели.

Без побочных эффектов

= $p < 0,01$ *= $p < 0,001$, критерий Стьюдента для одной выборки (IgG1 по сравнению с mAb406) в каждый момент времени.

IgG1 контроль или mAb406 введенное через 6 часов после полного адъюванта

Фрейнда

[00100] На Фигуре 12 представлено влияние mAb406 на гиперчувствительность к механическому сжатию в мышинной ПАФ хвостовой модели. Без побочных эффектов $*=p<0,05$, критерий Стьюдента для одной выборки (IgG1 по сравнению с mAb406) в

5 каждый момент времени.

IgG1 контроль или mAb406 введенное через 6 часов после полного адьюванта Фрейнда

[00101] На Фигуре 13 представлено влияние mAb406 на гиперчувствительность к нагреванию в мышинной ПАФ 24 часовой модели.

10 Уровень значимости: $*=p<0,01$, $***=p<0,001$.

Статистика: однонаправленный ANOVA с последующим тестом Холм Сидак с запаздыванием IgG1 контрольный изотип или mAb406 дозированное интраперитонеально через 6 часов после введения полного адьюванта Фрейнда. NT относится к мышам «без лечения».

15 [00102] На Фигуре 14 представлена доза-зависимые влияния mAb406 на гиперчувствительность к нагреванию в мышинной ПАФ 48 часовой модели.

Уровень значимости: $**=p<0,05$, $***=p<0,001$.

20 Статистика: однонаправленный ANOVA с последующим тестом Холм Сидак с запаздыванием IgG1 контрольный изотип или mAb406 дозированное интраперитонеально через 6 часов после введения полного адьюванта Фрейнда. NT относится к мышам «без лечения».

[00103] На Фигуре 15 представлена доза-зависимые влияния mAb406 на гиперчувствительность к механическому сжатию в мышинной ПАФ модели при 24 часах.

Уровень значимости: $**=p<0,05$, $***=p<0,001$.

25 Статистика: однонаправленный ANOVA с последующим тестом Холм Сидак с запаздыванием IgG1 контрольный изотип или mAb406 дозированное интраперитонеально через 6 часов после введения полного адьюванта Фрейнда. Nt относится к мышам «без лечения».

30 [00104] На Фигуре 16 представлено доза-зависимые влияния mAb406 на гиперчувствительность к механическому сжатию в мышинной ПАФ модели при 48 часах. Без побочных эффектов.

Уровень значимости: $**=p<0,01$, $***=p<0,001$.

35 Статистика: однонаправленный ANOVA с последующим тестом Холм Сидак с запаздыванием IgG1 контрольный изотип или mAb406 дозированное интраперитонеально через 6 часов после введения полного адьюванта Фрейнда. NT относится к мышам «без лечения».

Фигура 17. Показано влияние малой молекулы напроксена на гиперчувствительность к нагреванию в мышинной ПАФ хвостовой модели при 48 часах.

Без побочных эффектов.

40 $*=p<0,05$, $**=p<0,01$, $***=p<0,001$, однонаправленный ANOVA с последующим тестом Холм Сидак с запаздыванием.

[00105] Фигура 18. Показано влияние малой молекулы напроксена на гиперчувствительность к механическому сжатию в мышинной ПАФ хвостовой модели при 48 часах. Без побочных эффектов.

45 $*=p<0,05$, $**=p<0,01$, $***=p<0,001$, однонаправленный ANOVA с последующим тестом Холм Сидак с запаздыванием.

Подробное описание данного изобретения

[00106] Данное изобретение относится к способам генерирования анти-IL-6 антитела

с пролонгированным периодом полувыведения *in vivo*. С использованием способов в соответствии с данным изобретением, анти-IL-6 родительское антитело может быть модифицировано с получением анти-IL-6 антитела с пролонгированным периодом полувыведения *in vivo*. Любое анти-IL-6 антитело, которое специфично связывается с человеческим IL-6 антигеном, может быть использовано для реализации способа в соответствии с данным изобретением. В одном варианте исполнения, анти-IL-6 антитела, описанные в публикации РСТ № WO 2008/065378, могут быть модифицированы или применены для реализации способа в соответствии с данным изобретением. В конкретном варианте исполнения, анти-IL-6 антитело, обозначенное в публикации РСТ № WO 2008/065378 как Антитело 18 (в данной заявке Антитело 18 или Ab 18), может быть модифицировано или применено для реализации способа в соответствии с данным изобретением.

[00107] Данное изобретение представляет анти-IL-6 антитела с пролонгированным периодом полувыведения *in vivo*. В одном варианте исполнения, анти-IL-6 антитело, описанное в данной заявке, имеет пролонгированный период полувыведения *in vivo*, более длинные, чем у антитела, содержащего те же самые вариабельные домены и константные домены дикого типа. В конкретном варианте исполнения, анти-IL-6 антитело в соответствии с данным изобретением имеет пролонгированный период полувыведения *in vivo*, более длинный, чем у Антитела 18.

[00108] Данное изобретение представляет анти-IL-6 антитела с пролонгированным периодом полувыведения *in vivo*. В одном варианте исполнения, период полувыведения анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением представляет собой период полувыведения, измеренный у млекопитающего. В другом варианте исполнения, период полувыведения анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением представляет собой период полувыведения, измеренный у нечеловеческого примата (например, не ограничиваясь приведенным, у яванских макаков или макаков). В дополнительном варианте исполнения, период полувыведения анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением представляет собой период полувыведения, измеренный у человеческого субъекта.

[00109] В одном варианте исполнения, период полувыведения анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением как минимум в 2 раза, как минимум 3 раза, как минимум 4 раза, как минимум 5 раз, как минимум 10 раз или как минимум 20 раз длиннее, чем период полувыведения антитела, содержащего те же самые вариабельные домены и константные домены дикого типа. В другом варианте исполнения, период полувыведения анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением в 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 10 раз или 20 раз длиннее, чем период полувыведения антитела, содержащего те же самые вариабельные домены и константные домены дикого типа. В дополнительном варианте исполнения, период полувыведения анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением от 2 раз до 3 раз, от 2 раз до 5 раз, от 2 раз до 10 раз, от 3 раз до 5 раз, или от 3 раз до 10 раз длиннее, чем период полувыведения антитела, содержащего те же самые вариабельные домены и константные домены дикого типа.

[00110] В одном варианте исполнения, период полувыведения анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением как минимум приблизительно в 2 раза, как минимум приблизительно 3 раза, как минимум приблизительно 4 раза, как минимум приблизительно 5 раз, как минимум приблизительно 10 раз или как минимум приблизительно 20 раз длиннее, чем период полувыведения антитела, содержащего те же самые вариабельные домены и константные домены дикого типа. В другом варианте исполнения, период полувыведения анти-IL-6 антитела в соответствии с данным

изобретением в приблизительно 2 раза, приблизительно 3 раза, приблизительно 4 раза, приблизительно 5 раз, приблизительно 10 раз или приблизительно 20 раз длиннее, чем период полувыведения антитела, содержащего те же самые переменные домены и константные домены дикого типа. В дополнительном варианте исполнения, период полувыведения анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением составляет от приблизительно 2 раз до приблизительно 3 раз, от приблизительно 2 раз до приблизительно 5 раз, от приблизительно 2 раз до приблизительно 10 раз, от приблизительно 3 раз до приблизительно 5 раз, или от приблизительно 3 раз до приблизительно 10 раз длиннее, чем период полувыведения антитела, содержащего те же самые переменные домены и константные домены дикого типа.

[00111] В одном варианте исполнения, период полувыведения анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением составляет как минимум 10 дней, как минимум 15 дней, как минимум 20 дней, как минимум 25 дней, как минимум 26 дней, как минимум 27 дней, как минимум 28 дней, как минимум 29 дней, как минимум 30 дней, как минимум 35 дней, как минимум 40 дней, как минимум 45 дней или как минимум 50 дней. В другом варианте исполнения, период полувыведения анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением составляет 10 дней, 15 дней, 20 дней, 25 дней, 28 дней, 29 дней, 30 дней, 35 дней, 40 дней, 45 дней или 50 дней. В дополнительном варианте исполнения, период полувыведения анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением составляет от 10 дней до 20 дней, от 10 дней до 30 дней, от 10 дней до 40 дней, от 10 дней до 50 дней, от 20 дней до 30 дней, от 20 дней до 40 дней, от 20 дней до 50 дней, от 25 дней до 30 дней, от 25 дней до 40 дней, от 25 дней до 50 дней, от 30 дней до 40 дней, от 30 дней до 50 дней или от 40 дней до 50 дней.

[00112] В одном варианте исполнения, период полувыведения анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением составляет как минимум приблизительно 10 дней, как минимум приблизительно 15 дней, как минимум приблизительно 20 дней, как минимум 25 приблизительно дней, как минимум приблизительно 26 дней, как минимум приблизительно 27 дней, как минимум приблизительно 28 дней, как минимум 29 приблизительно дней, как минимум приблизительно 30 дней, как минимум приблизительно 35 дней, как минимум приблизительно 40 дней, как минимум приблизительно 45 дней или как минимум приблизительно 50 дней. В другом варианте исполнения, период полувыведения анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением составляет приблизительно 10 дней, приблизительно 15 дней, приблизительно 20 дней, приблизительно 25 дней, приблизительно 28 дней, приблизительно 29 дней, приблизительно 30 дней, приблизительно 35 дней, приблизительно 40 дней, приблизительно 45 дней или приблизительно 50 дней. В дополнительном варианте исполнения, период полувыведения анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением составляет от приблизительно 10 дней до приблизительно 20 дней, от приблизительно 10 дней до приблизительно 30 дней, от приблизительно 10 дней до приблизительно 40 дней, от 10 дней до приблизительно 50 дней, от приблизительно 20 дней до приблизительно 30 дней, от приблизительно 20 дней до приблизительно 40 дней, от приблизительно 20 дней до приблизительно 50 дней, от приблизительно 25 дней до приблизительно 30 дней, от приблизительно 25 дней до приблизительно 40 дней, от 25 дней до приблизительно 50 дней, от приблизительно 30 дней до приблизительно 40 дней, от приблизительно 30 дней до приблизительно 50 дней или от приблизительно 40 дней до приблизительно 50 дней.

[00113] Данное изобретение дополнительно представляет анти-IL-6 антитела с уменьшенной скоростью клиренса. Термин клиренс, как используют в данной заявке

понимают как отражающий объем плазмы, из которой состоит лекарственное средство, т.е. анти-IL-6 антитело, полностью удаляют за единицу времени. В одном варианте исполнения, анти-IL-6 антитело, описанное в данной заявке, имеет уменьшенную скорость клиренса по сравнению со скоростью клиренса родительского анти-IL-6 антитела. В конкретном варианте исполнения, анти-IL-6 антитело в соответствии с данным изобретением имеет уменьшенную скорость клиренса по сравнению со скоростью клиренса Антитела 18.

[00114] Данное изобретение представляет анти-IL-6 антитела с уменьшенной скоростью клиренса. В одном варианте исполнения, скорость клиренса анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением представляет собой скорость клиренса, измеренную у млекопитающего. В другом варианте исполнения, скорость клиренса анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением представляет собой скорость клиренса, измеренную у нечеловеческого примата (например, и не ограничиваясь приведенным, у яванских макаков). В дополнительном варианте исполнения, скорость клиренса анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением представляет собой скорость клиренса, измеренную у человеческого субъекта.

[00115] В одном варианте исполнения, скорость клиренса анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением в как минимум 2 раза, как минимум 3 раза, как минимум 4 раза, как минимум 5 раз, как минимум 10 раз или как минимум 20 раз ниже, чем скорость клиренса антитела, имеющего те же самые переменные домены и константные домены дикого типа. В другом варианте исполнения, скорость клиренса анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением в 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 10 раз или 20 раз ниже, чем скорость клиренса антитела, имеющего те же самые переменные домены и константные домены дикого типа. В дополнительном варианте исполнения, скорость клиренса анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением от 2 раз до 3 раз, от 2 раз до 5 раз, от 2 раз до 10 раз, от 3 раз до 5 раз, или от 3 раз до 10 раз ниже, чем скорость клиренса антитела, имеющего те же самые переменные домены и константные домены дикого типа.

[00116] В одном варианте исполнения, скорость клиренса анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением в как минимум приблизительно 2 раза, как минимум приблизительно 3 раза, как минимум приблизительно 4 раза, как минимум приблизительно 5 раз, как минимум приблизительно 10 раз или как минимум приблизительно 20 раз ниже, чем скорость клиренса антитела, имеющего те же самые переменные домены и константные домены дикого типа. В другом варианте исполнения, скорость клиренса анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением в приблизительно 2 раза, приблизительно 3 раза, приблизительно 4 раза, приблизительно 5 раз, приблизительно 10 раз или приблизительно 20 раз ниже, чем скорость клиренса антитела, имеющего те же самые переменные домены и константные домены дикого типа. В дополнительном варианте исполнения, скорость клиренса анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением от приблизительно 2 раз до приблизительно 3 раз, от приблизительно 2 раз до приблизительно 5 раз, от приблизительно 2 раз до приблизительно 10 раз, от приблизительно 3 раз до приблизительно 5 раз, или от приблизительно 3 раз до приблизительно 10 раз ниже, чем скорость клиренса антитела, имеющего те же самые переменные домены и константные домены дикого типа.

[00117] В одном варианте исполнения, скорость клиренса анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением составляет не более, чем 1 мл/кг/день, не более, чем 2 мл/кг/день, не более, чем 3 мл/кг/день, не более, чем 4 мл/кг/день, не более, чем

5 мл/кг/день, не более, чем 7 мл/кг/день, не более, чем 10 мл/кг/день, не более, чем 15 мл/кг/день или не более, чем 20 мл/кг/день. В другом варианте исполнения, скорость клиренса анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением составляет 1 мл/кг/день, 2 мл/кг/день, 3 мл/кг/день, 4 мл/кг/день, 5 мл/кг/день, 7 мл/кг/день, 10 мл/кг/день, 15 мл/кг/день или 20 мл/кг/день. В дополнительном варианте исполнения, скорость клиренса анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением составляет от 1 мл/кг/день до 2 мл/кг/день, от 1 мл/кг/день до 3 мл/кг/день, от 1 мл/кг/день до 5 мл/кг/день, от 1 мл/кг/день до 10 мл/кг/день, от 1 мл/кг/день до 15 мл/кг/день, от 2 мл/кг/день до 5 мл/кг/день, от 2 мл/кг/день до 10 мл/кг/день, от 3 мл/кг/день до 5 мл/кг/день, от 3 мл/кг/день до 10 мл/кг/день или от 5 мл/кг/день до 10 мл/кг/день.

[00118] В одном варианте исполнения, скорость клиренса анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением составляет не более чем приблизительно 1 мл/кг/день, не более чем приблизительно 2 мл/кг/день, не более чем приблизительно 3 мл/кг/день, не более чем приблизительно 4 мл/кг/день, не более чем приблизительно 5 мл/кг/день, не более чем приблизительно 7 мл/кг/день, не более чем приблизительно 10 мл/кг/день, не более чем приблизительно 15 мл/кг/день или не более чем приблизительно 20 мл/кг/день. В другом варианте исполнения, скорость клиренса анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением составляет приблизительно 1 мл/кг/день, приблизительно 2 мл/кг/день, приблизительно 3 мл/кг/день, приблизительно 4 мл/кг/день, приблизительно 5 мл/кг/день, приблизительно 7 мл/кг/день, приблизительно 10 мл/кг/день, приблизительно 15 мл/кг/день или приблизительно 20 мл/кг/день. В дополнительном варианте исполнения, скорость клиренса анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением составляет от приблизительно 1 мл/кг/день до приблизительно 2 мл/кг/день, от приблизительно 1 мл/кг/день до приблизительно 3 мл/кг/день, от приблизительно 1 мл/кг/день до приблизительно 5 мл/кг/день, от приблизительно 1 мл/кг/день до приблизительно 10 мл/кг/день, от приблизительно 1 мл/кг/день до приблизительно 15 мл/кг/день, от приблизительно 2 мл/кг/день до приблизительно 5 мл/кг/день, от приблизительно 2 мл/кг/день до приблизительно 10 мл/кг/день, от приблизительно 3 мл/кг/день до приблизительно 5 мл/кг/день, от приблизительно 3 мл/кг/день до приблизительно 10 мл/кг/день или от приблизительно 5 мл/кг/день до приблизительно 10 мл/кг/день.

[00119] В одном варианте исполнения, анти-IL-6 антитело в соответствии с данным изобретением содержит вариантный Fc участок. В другом варианте исполнения, анти-IL-6 антитело в соответствии с данным изобретением содержит вариантный Fc участок, имеющий измененную аффинность для Fc лигандного белка. В конкретном варианте исполнения, анти-IL-6 антитело в соответствии с данным изобретением содержит вариантный Fc участок, имеющий измененную аффинность для FcRn. В конкретном варианте исполнения, FcRn может быть мышинным, человеческим или приматным (например, яванской макаки) FcRn белком.

[00120] В одном варианте исполнения, анти-IL-6 антитело в соответствии с данным изобретением содержит вариантный Fc участок, имеющий повышенную аффинность для Fc лигандного белка. В конкретном варианте исполнения, анти-IL-6 антитело в соответствии с данным изобретением содержит вариантный Fc участок, имеющий повышенную аффинность для FcRn. В конкретном варианте исполнения, FcRn может быть мышинным, человеческим или приматным (например, яванской макаки) FcRn белком.

[00121] В одном варианте исполнения, анти-IL-6 антитело в соответствии с данным изобретением содержит вариантный Fc участок, аффинность связывания которого для

Fc лигандного белка является рН зависимой. В конкретном варианте исполнения, анти-IL-6 в соответствии с данным изобретением содержит вариантный Fc участок с рН зависимой аффинностью связывания для FcRn. В конкретном варианте исполнения, FcRn может быть мышинным, человеческим или приматным (например, яванской макаки) FcRn белком.

[00122] В одном варианте исполнения, анти-IL-6 антитело в соответствии с данным изобретением содержит человеческий IgG константный домен, имеющий одно или более аминокислотных замещений относительно человеческого константного домена IgG дикого типа. В различных вариантах исполнения человеческий IgG константный домен может быть человеческим IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 константным доменом. В конкретном варианте исполнения, анти-IL-6 антитело в соответствии с данным изобретением содержит человеческий IgG1 константный домен, имеющий одно или более аминокислотных замещений относительно человеческого дикого типа IgG1 константного домена.

[00123] В одном варианте исполнения, анти-IL-6 антитело в соответствии с данным изобретением содержит человеческий IgG константный домен, имеющий одно или более аминокислотных замещений, выбранных из группы, состоящей из: M252Y, M252F, M252W, M252T, S254T, T256S, T256R, T256Q, T256E, T256D, T256T, L309P, Q311S, H433R, H433K, H433S, H433I, H433P, H433Q, N434H, N434F, N434Y и N436H, где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с индексом ЕС как в Kabat. В другом варианте исполнения, анти-IL-6 антитело в соответствии с данным изобретением содержит человеческий IgG константный домен, имеющий одно или более аминокислотных замещений, выбранных из группы, состоящей из: M252Y, S254T, T256E, H433K, N434F и N436H, где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с индексом ЕС как в Kabat. В другом варианте исполнения, анти-IL-6 антитело в соответствии с данным изобретением содержит человеческий IgG константный домен, имеющий одно или более аминокислотных замещений, выбранных из группы, состоящей из: M252Y, S254T и T256E, где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с индексом ЕС как в Kabat. В конкретном варианте исполнения, анти-IL-6 антитело в соответствии с данным изобретением содержит человеческий IgG константный домен, содержащий M252Y, S254T и T256E аминокислотные замещения, где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с индексом ЕС как в Kabat. В различных вариантах исполнения человеческий IgG константный домен может быть человеческим IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 константным доменом. В конкретном варианте исполнения, анти-IL-6 антитело в соответствии с данным изобретением содержит человеческий IgG1 константный домен, содержащий M252Y, S254T и T256E аминокислотные замещения, где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с индексом ЕС как в Kabat.

[00124] В одном варианте исполнения, анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением содержит один, два, три, четыре, пять или все шесть CDRs Антитела 18 (см., публикацию PCT WO 2008/065378).

[00125] Аминокислотные последовательности для CDR1, CDR2 и CDR3 вариabельный участок тяжелой цепи Антитела 18, определенный в соответствии с Kabat, идентифицированный как SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO:2 и SEQ ID NO:3 соответственно. Аминокислотные последовательности для CDR1, CDR2 и CDR3 вариabельного участка легкой цепи Антитела 18, определенный в соответствии с Kabat, идентифицированный как SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:6 соответственно.

[00126] Нумерация Kabat основана на продуктивной работе Kabat et al. (1991) Последовательность of Proteins of Immunological Interest, Publication No. 91-3242,

опубликована как трехтомник National Institutes of Health, National Technical Information Service (в данной заявке "Kabat"). Kabat представляет множественные выравнивания последовательностей иммуноглобулиновых цепей из многочисленных видов изотипов антител. Выровненные последовательности нумеруют в соответствии с одной системой нумерации, системой нумерации Kabat. Последовательности Kabat были обновлены после публикации в 1991 г. и доступны в виде электронной базы данных последовательностей (наиболее поздняя версия для загрузки от 1997 г.). Любая иммуноглобулиновая последовательность может быть пронумерована в соответствии с Kabat путем выполнения выравнивания с реперной последовательностью Kabat.

Соответственно, система нумерации Kabat представляет однородную систему для нумерации иммуноглобулиновых цепей. Если не указано иное, все иммуноглобулиновые аминокислотные последовательности, описанные в данной заявке, пронумерованы в соответствии с системой нумерации Kabat. Аналогично, все одиночные аминокислотные положения, указанные в данной заявке, как пронумеровано в соответствии с системой нумерации Kabat.

[00127] В определенных вариантах исполнения, анти-IL-6 антитело, описанное в данной заявке, может содержать переменный участок тяжелой цепи, VH, содержащий как минимум один CDR, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 и SEQ ID NO:3. В определенных вариантах исполнения, анти-IL-6 антитело в соответствии с данным изобретением может содержать VH домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7.

[00128] В определенных вариантах исполнения, анти-IL-6 антитело, описанное в данной заявке, может содержать переменный участок легкой цепи, VL, содержащий как минимум один CDR, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:6. В определенных вариантах исполнения, анти-IL-6 антитело в соответствии с данным изобретением может содержать VL домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8.

[00129] В одном варианте исполнения, анти-IL-6 антитело в соответствии с данным изобретением содержит VL домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8 и дополнительно включает VH домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7.

[00130] Данное изобретение охватывает антитела, которые связывают человеческое IL-6, содержащее производные VH домена, VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL домена, VL CDR1, VL CDR2, или VL CDR3, описанные в данной заявке, которые могут связывать человеческое IL-6. Стандартные методы, известные специалисту в данной области, могут быть применены для введения мутаций (например, добавлений, делеций и/или замещений) в нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело, включая, например, сайт-направленный мутагенез и ПЦР-опосредованный мутагенез, которые обычно используют с получением аминокислотных замещений. В одном варианте исполнения, VH и/или VL CDR производные могут включать менее, чем 25 аминокислотных замещений, менее, чем 20 аминокислотных замещений, менее, чем 15 аминокислотных замещений, менее, чем 10 аминокислотных замещений, менее, чем 5 аминокислотных замещений, менее, чем 4 аминокислотных замещений, менее, чем 3 аминокислотных замещений, менее, чем 2 аминокислотных замещений, или 1 аминокислотное замещение относительно оригинальных VH и/или VL CDRs антител 18 анти-IL-6 антитела. В другом варианте исполнения, VH и/или VL CDR производные

могут содержать консервативные аминокислотные замещения (например, выше), полученные на одном или более предсказанных заменимых аминокислотных остатков (т.е., аминокислотных остатков, которые не являются критичными для антитела для специфичного связывания человеческого IL-6). Мутации могут быть также введены рандомизированно вдоль всех или части VH и/или VL CDR кодирующих последовательностей, например, путем мутагенеза насыщения, и полученные в результате мутанты могут быть подвергнуты скринингу на предмет биотической активности для идентификации мутантов, сохраняющих активность. После мутагенеза, кодированное антитело может быть экспрессировано и может быть определена активность антитела.

[00131] Данное изобретение дополнительно охватывает антитела, которые связывают человеческое IL-6, где указанные антитела или фрагменты антител содержащие один или более CDRs, где указанные CDRs содержат аминокислотную последовательность, которая составляет как минимум 45%, как минимум 50%, как минимум 55%, как минимум 60%, как минимум 65%, как минимум 70%, как минимум 75%, как минимум 80%, как минимум 85%, как минимум 90%, как минимум 95%, или как минимум 99% идентично аминокислотной последовательности одного или более CDRs Антитела 18. Процент идентичности двух аминокислотных последовательностей может быть определен при помощи любого способа, известного специалисту в данной области, включая но, не ограничиваясь приведенным, поиском белков BLAST.

[00132] Данное изобретение дополнительно охватывает антитела, которые связывают человеческое IL-6 с указанными антителами или фрагментами антител, которые содержат VH и/или VL домен, где указанные VH и/или VL домены содержат аминокислотную последовательность, которая составляет как минимум 45%, как минимум 50%, как минимум 55%, как минимум 60%, как минимум 65%, как минимум 70%, как минимум 75%, как минимум 80%, как минимум 85%, как минимум 90%, как минимум 95%, или как минимум 99% идентичны аминокислотной последовательности VH и VL домена Антитела 18. Процент идентичности двух аминокислотных последовательностей может быть определен при помощи любого способа, известного специалисту в данной области, включая, но, не ограничиваясь приведенным, поиском белков BLAST.

[00133] В одном варианте исполнения, анти-IL-6 антитело в соответствии с данным изобретением может связывать человеческое IL-6 с аффинностью, сравнимой с аффинностью Антитела 18.

[00134] В одном варианте исполнения, анти-IL-6 антитело в соответствии с данным изобретением специфично связывает тот же самый эпитоп IL-6, что и Антитело 18.

[00135] В одном варианте исполнения, анти-IL-6 антитело специфично конкурирует с Антителом 18 за IL-6 связывание. Конкурентный анализ может быть выполнен при помощи любого анализа связывания, известного из уровня техники, например, но не ограничиваясь приведенным, анализа ELISA или радиоиммунологического исследования.

[00136] Данное изобретение дополнительно представляет полинуклеотиды, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую анти-IL-6 антитело с пролонгированным периодом полувыведения *in vivo*. Данное изобретение также охватывает полинуклеотиды, которые гибридизуются в жестких или менее жестких условиях гибридизации, как определено в данной заявке, с полинуклеотидами, которые кодируют анти-IL-6 антитело с пролонгированным периодом полувыведения *in vivo*.

[0100] В одном варианте исполнения, полинуклеотид в соответствии с данным изобретением, кодирующий анти-IL 6 антитело с пролонгированным периодом полувыведения *in vivo*, описанное в данной заявке, содержит оптимизированную

полинуклеотидную последовательность. В конкретном варианте исполнения, полинуклеотид в соответствии с данным изобретением, кодирующий VH домен анти-IL-6 антитела, описанного в данной заявке, содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:11. В конкретном варианте исполнения, полинуклеотид в соответствии с данным изобретением, кодирующий VL домен анти-IL-6 антитела, описанного в данной заявке, содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 12. В конкретном варианте исполнения, полинуклеотид в соответствии с данным изобретением, кодирующий тяжелую цепь анти-IL-6 антитела, описанного в данной заявке, содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 13. В конкретном варианте исполнения, полинуклеотид в соответствии с данным изобретением, кодирующий легкую цепь анти-IL-6 антитела, описанного в данной заявке, содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 14.

[0101] Другой вариант исполнения в соответствии с данным изобретением представляет собой вектор, содержащий одну или более нуклеотидных последовательностей, кодирующих анти-IL-6 антитело с пролонгированным периодом полувыведения *in vivo*.

[0102] В одном варианте исполнения, вектор в соответствии с данным изобретением содержит одну или более нуклеотидных последовательностей, кодирующих анти-IL-6 антитело с пролонгированным периодом полувыведения *in vivo*, где нуклеотидная последовательность является оптимизированной нуклеотидной последовательностью. В конкретном варианте исполнения, вектор в соответствии с данным изобретением содержит любую из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO:11-14. В дополнительном конкретном варианте исполнения, вектор в соответствии с данным изобретением содержит одну или более нуклеотидных последовательностей, кодирующих анти-IL-6 антитело с пролонгированным периодом полувыведения *in vivo*, где нуклеотидную последовательность выбирают из группы, содержащей SEQ ID NO:11-14.

[0103] Данное изобретение дополнительно относится к выделенной клетке, содержащей вектор, где указанный вектор содержит одну или более нуклеотидных последовательностей, кодирующих анти-IL-6 антитело с пролонгированным периодом полувыведения *in vivo*. В конкретном варианте исполнения, выделенная клетка в соответствии с данным изобретением содержит полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-14.

[0104] Анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением включают антитела IgG1, IgG2, IgG3, или IgG4 человеческого изотипа.

[0105] Данное изобретение дополнительно относится к фармацевтическим композициям, содержащим анти-IL-6 антитело, содержащим любую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO:1-10.

[0106] Анти-IL-6 антитела, описанные в данной заявке, могут иметь высокую аффинность связывания к человеческому IL-6 антигену. Например, антитело, описанное в данной заявке, может иметь скорость ассоциации или k_{on} (антитело (Ab) + антиген (Ag) $\rightarrow$ Ab-Ag), составляющую как минимум $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, как минимум $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, как минимум $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, как минимум $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, как минимум $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, как минимум $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, или как минимум $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

[0107] В другом варианте исполнения, анти-IL-6 антитело может иметь скорость диссоциации k_{off} e ((Ab-Ag) $\rightarrow$ антитело (Ab) + антиген (Ag)), составляющую менее,

чем $5 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$, менее, чем 10^{-1} s^{-1} , менее, чем $5 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$, менее, чем 10^{-2} s^{-1} , менее, чем $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, менее, чем 10^{-3} s^{-1} , менее, чем $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, или менее, чем 10^{-4} s^{-1} . В другом варианте исполнения, антитело в соответствии с данным изобретением имеет k_{off} менее, чем $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, менее, чем 10^{-5} s^{-1} , менее, чем $5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$, менее, чем 10^{-6} s^{-1} , менее, чем $5 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$, менее, чем 10^{-7} s^{-1} , менее, чем $5 \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$, менее, чем 10^{-8} s^{-1} , менее, чем $5 \times 10^{-9} \text{ s}^{-1}$, менее, чем 10^{-9} s^{-1} , или менее, чем 10^{-10} s^{-1} .

[0108] В другом варианте исполнения, анти-IL-6 антитело может иметь константу аффинности или K_a ($k_{\text{on}}/k_{\text{off}}$), составляющую как минимум 10^2 M^{-1} , как минимум $5 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$, как минимум 10^3 M^{-1} , как минимум $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, как минимум 10^4 M^{-1} , как минимум $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, как минимум 10^5 M^{-1} , как минимум $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, как минимум 10^6 M^{-1} , как минимум $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, как минимум 10^7 M^{-1} , как минимум $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, как минимум 10^8 M^{-1} , как минимум $5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, как минимум 10^9 M^{-1} , как минимум $5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, как минимум 10^{10} M^{-1} , как минимум $5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$, как минимум 10^{11} M^{-1} , как минимум $5 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$, как минимум 10^{12} M^{-1} , как минимум $5 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}$, как минимум 10^{13} M^{-1} , как минимум $5 \times 10^{13} \text{ M}^{-1}$, как минимум 10^{14} M^{-1} , как минимум $5 \times 10^{14} \text{ M}^{-1}$, как минимум 10^{15} M^{-1} , или как минимум $5 \times 10^{15} \text{ M}^{-1}$. В еще одном варианте исполнения, анти-IL-6 антитело может иметь константу диссоциации, или K_d ($k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$) менее, чем $5 \times 10^{-2} \text{ M}$, менее, чем 10^{-2} M , менее, чем $5 \times 10^{-3} \text{ M}$, менее, чем 10^{-3} M , менее, чем $5 \times 10^{-4} \text{ M}$, менее, чем 10^{-4} M , менее, чем $5 \times 10^{-5} \text{ M}$, менее, чем 10^{-5} M , менее, чем $5 \times 10^{-6} \text{ M}$, менее, чем 10^{-6} M , менее, чем $5 \times 10^{-7} \text{ M}$, менее, чем 10^{-7} M , менее, чем $5 \times 10^{-8} \text{ M}$, менее, чем 10^{-8} M , менее, чем $5 \times 10^{-9} \text{ M}$, менее, чем 10^{-9} M , менее, чем $5 \times 10^{-10} \text{ M}$, менее, чем 10^{-10} M , менее, чем $5 \times 10^{-11} \text{ M}$, менее, чем 10^{-11} M , менее, чем $5 \times 10^{-12} \text{ M}$, менее, чем 10^{-12} M , менее, чем $5 \times 10^{-13} \text{ M}$, менее, чем 10^{-13} M , менее, чем $5 \times 10^{-14} \text{ M}$, менее, чем 10^{-14} M , менее, чем $5 \times 10^{-15} \text{ M}$, или менее, чем 10^{-15} M .

[0109] Антитело, которое применяют в соответствии с со способом, описанным в данной заявке, может иммуноспецифично связывать IL-6 и иметь константу диссоциации (K_d) менее, чем 3000 пМ, менее, чем 2500 пМ, менее, чем 2000 пМ, менее, чем 1500 пМ, менее, чем 1000 пМ, менее, чем 750 пМ, менее, чем 500 пМ, менее, чем 250 пМ, менее, чем 200 пМ, менее, чем 150 пМ, менее, чем 100 пМ, менее, чем 75 пМ, как оценено при помощи способа, описанного в данной заявке или известно специалисту в данной области (например, анализ BIAcore, ELISA) (Biacore International AB, Uppsala, Sweden). В конкретном варианте исполнения, антитело которое применяют в соответствии с со способом, описанным в данной заявке, может иммуноспецифично связывать человеческий IL-6 антиген и иметь константу диссоциации (K_d), составляющую 25-3400 пМ, 25-3000 пМ, 25-2500 пМ, 25-2000 пМ, 25-1500 пМ, 25-1000 пМ, 25-750 пМ, 25 -о 500 пМ, 25-250 пМ, 25-100 пМ, 25-75 пМ, 25-50 пМ, как оценено при помощи способа, описанного в данной заявке или известно специалисту в данной области (например, анализ BIAcore, ELISA). В другом варианте исполнения, анти-IL-6 антитело которое применяют в соответствии со способом, описанным в данной заявке, может иммуноспецифично связывать IL-6 и иметь константу диссоциации (K_d), составляющую

500 пМ, 100 пМ, 75 пМ или 50 пМ, как оценено при помощи способа, описанного в данной заявке или известно специалисту в данной области (например, анализ ВІАcore, ELISA).

[0110] Данное изобретение дополнительно представляет полинуклеотиды, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую анти-IL-6 антитело с пролонгированным периодом полувыведения *in vivo*. Данное изобретение также охватывает полинуклеотид, который гибридизуется в жестких и менее жестких условиях гибридизации, например, как определено в данной заявке, с полинуклеотидами, кодирующими анти-IL-6 антитело с пролонгированным периодом полувыведения *in vivo*.

[0111] Жесткие условия гибридизации включают, не ограничиваясь приведенным, гибридизацию до фильтр-связанной ДНК в 6X хлориде натрия/цитрате натрия (ХЦН) при приблизительно 45°C с последующим одним или более промываниями 0,2X ХЦН/0,1% ДСН при приблизительно 50-65°C, очень жесткую гибридизацию, такую, как гибридизация до фильтр-связанной ДНК в 6X ХЦН при приблизительно 45°C с последующим одним или более промываниями в 0,1X ХЦН/0,2% ДСН (додецилсульфате натрия) при приблизительно 60°C, или любые другие жесткие условия гибридизации, известные специалистам в данной области (см., например, Ausubel, F.M. et al., eds. 1989 Current Protocols in Molecular Biology, vol. 1, Green Publishing Associates, Inc. and John Wiley and Sons, Inc., NY на страницах 6, 3, 1 - 6, 3, 6 и 2, 10, 3).

[0112] Полинуклеотиды могут быть получены и нуклеотидная последовательность полинуклеотидов определена любым способом, известным из уровня техники. Например, если нуклеотидная последовательность антитела известна, то полинуклеотид, кодирующий антитело, может быть собран из химически синтезированных олигонуклеотидов (например, как описано в Kutmeier et al., BioTechniques 17:242 (1994)), что, кратко, включает синтез перекрывающихся олигонуклеотидов, содержащих части последовательности, кодирующие антитело, гибридизацию и замыкание таких олигонуклеотидов с последующей амплификацией замкнутых олигонуклеотидов при помощи ПЦР.

[0113] Полинуклеотид, кодирующий антитело, может быть также получен из нуклеиновой кислоты из приемлемого источника. Если клон, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую конкретное антитело, не доступен, но известна последовательность молекулы антитела, нуклеиновая кислота, кодирующая иммуноглобулин, может быть химически синтезирована или получена из приемлемого источника (например, библиотеки кДНК антител, или библиотеки кДНК, полученной из нуклеиновой кислоты, преимущественно полиА + РНК, выделенной из, любой ткани или клетки, экспрессирующей антитело, таких, как гибридомные клетки, выбранные для экспрессии антитела) при помощи ПЦР амплификации с использованием синтетических праймеров, которые могут быть гибридизованы в 3' и 5' концах последовательности, или путем клонирования при помощи олигонуклеотидного зонда, специфичного для идентификации конкретной генной последовательности, например, кДНК клона из библиотеки кДНК, которая кодирует антитело. Амплифицированные нуклеиновые кислоты, полученный при помощи ПЦР, могут затем быть клонированы в реплицируемые векторы клонирования при помощи любого способа, хорошо известного из уровня техники.

[0114] IL-6 участвовал в ряде заболеваний и состояний. Данные заболевания и состояния включают, не ограничиваясь приведенным, воспаление, боль и рак. Анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением, описанные в данной заявке,

преимущественно способны, например, к нейтрализации IL-6, уменьшению уровней IL-6 в организме и антагонизму сигнализации IL-6. Как таковые, анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением преимущественно способны действовать в качестве лекарственных средств для лечения таких состояний и заболеваний.

- 5 [0115] Данное изобретение дополнительно представляет антитела, которые эффективно нейтрализуют IL-6 активность у субъекта в течение продолжительных периодов времени. Не будучи ограниченными конкретным механизмом действия, анти-IL-6 антитело в соответствии с данным изобретением может нейтрализовать IL-6 путем его связывания и таким образом предотвращения участия IL-6 в белковых
- 10 взаимодействиях, которые необходимы для IL-6 опосредованной передачи сигнала. В одном варианте исполнения, антитело в соответствии с данным изобретением способно к уменьшению концентрации в плазме свободного (т.е., не связанного анти-IL-6 антителом) IL-6. Уровни свободного IL-6 в биологической жидкости (например, плазме) могут быть определены при помощи количественных биоанализов, например, но не
- 15 ограничиваясь приведенным, биоанализов, описанных в Papadopoulos et. al, Journal of Clinical Laboratory Analysis 9:234-37 (1995). Кратко, биоанализ измеряет IL-6 вызванную пролиферацию конкретной гибридной клетки (например, В9 гибридной клетки). Концентрация свободного IL-6 может быть также определена при помощи иммуноферментного сэндвич-анализа. Кратко, свободное IL-6 в сыворотке
- 20 иммобилизовали при помощи анти-IL-6 иммобилизованного антитела. Такое иммобилизованное антитело только связывается с IL-6 в отсутствие Антитела18Е и растворимого IL-6 рецептора. Иммобилизованное IL-6 детектировали при помощи детекторного антитела, которое не конкурирует с иммобилизованным антителом и мечено рутением или ПХ (пероксидазой хрена). Измеренный
- 25 электрохемилуминесцентный или колориметрический сигнал пропорционален концентрации свободного IL-6 в сыворотке. Концентрацию свободного IL-6 в сыворотке рассчитывали, исходя из стандартной кривой.

- [0116] В одном варианте исполнения, антитело в соответствии с данным изобретением способно к уменьшению концентрации в сыворотке свободного (т.е., не связанного
- 30 анти-IL-6 антителом) IL-6. Введение эффективной дозы анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением может достигать как минимум приблизительно 20%, как минимум приблизительно 30%, как минимум приблизительно 40%, как минимум приблизительно 50%, как минимум приблизительно 60%, как минимум приблизительно 70%, как минимум приблизительно 80%, как минимум приблизительно 90%, как минимум
- 35 приблизительно 95%, как минимум приблизительно 97%, как минимум приблизительно 99%, или как минимум приблизительно 100% уменьшения концентрации в сыворотке свободного IL-6. Эффективная доза может содержать 1 мг, 5 мг, 10 мг, 25 мг, 50 мг, 75 мг, 100 мг, 150 мг, 200 мг, 250 мг, 300 мг, 400 мг или 500 мг анти IL-6 антитела, описанного в данной заявке. Уменьшение уровней свободного IL-6 может продолжаться
- 40 в течение как минимум приблизительно 1 дня, как минимум приблизительно 2 дней, как минимум приблизительно 3 дней, как минимум приблизительно 4 дней, как минимум приблизительно 5 дней, как минимум приблизительно 6 дней, как минимум приблизительно 7 дней, как минимум приблизительно 10 дней, как минимум приблизительно 15 дней, или как минимум приблизительно 20 дней. Субъект может
- 45 быть человеком или нечеловеческим приматом.

[0117] В другом варианте исполнения, введение более чем одной дозы анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением может достигать непрерывного как минимум приблизительно 20%, как минимум приблизительно 30%, как минимум

приблизительно 40%, как минимум приблизительно 50%, как минимум приблизительно 60%, как минимум приблизительно 70%, как минимум приблизительно 80%, как минимум приблизительно 90%, как минимум приблизительно 95%, как минимум приблизительно 97%, как минимум приблизительно 99%, или как минимум приблизительно 100%

- 5 уменьшения в сыворотке концентрации свободного IL-6. В одном варианте исполнения, каждая более чем из одной доз содержит одно и то же количество анти-IL-6 антитела. Эффективная доза может содержать 1 мг, 5 мг, 10 мг, 25 мг, 50 мг, 75 мг, 100 мг, 150 мг, 200 мг, 250 мг, 300 мг, 400 мг или 500 мг анти-IL-6 антитела, описанного в данной заявке. В другом варианте исполнения, за начальной дозой нагрузки следуют
- 10 последовательные поддерживающие дозы. Начальная доза нагрузки может содержать в два, 3 раза, 4 раза, 5 раз, или 10 раз больше анти-IL-6 антитела, чем поддерживающие дозы. В одном варианте исполнения, временной интервал, разделяющий дозы, является постоянным. Дозы анти-IL-6 антитела могут быть введены один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в три недели, один раз в четыре недели, один раз в восемь
- 15 недель или один раз в двенадцать недель. В конкретном варианте исполнения, введение 50 мг дозы анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением каждые 4 недели достигает непрерывного как минимум 90% уменьшения в сыворотке концентрации свободного IL-6. В конкретном варианте исполнения, введение 100 мг дозы анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением каждые 8 недель достигает
- 20 непрерывного как минимум 90% уменьшения в сыворотке концентрации свободного IL-6. В конкретном варианте исполнения, введение 200 мг дозы анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением каждые 12 недель достигает непрерывного как минимум 90% уменьшения в сыворотке концентрации свободного IL-6. Анти-IL-6 антитело может быть введено при помощи любого способа, известного из уровня
- 25 техники, например, но не ограничиваясь приведенным, посредством подкожной или внутривенной инъекции. Субъект может быть человеком или нечеловеческим приматом.

- [0118] В одном варианте исполнения, антитело в соответствии с данным изобретением способно нейтрализовать сывороточное IL-6 у субъекта. Введение эффективной дозы анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением может достигать как минимум
- 30 приблизительно 20%, как минимум приблизительно 30%, как минимум приблизительно 40%, как минимум приблизительно 50%, как минимум приблизительно 60%, как минимум приблизительно 70%, как минимум приблизительно 80%, как минимум приблизительно 90%, как минимум приблизительно 95%, как минимум приблизительно 97%, как минимум приблизительно 99%, или как минимум приблизительно 100% нейтрализации
- 35 сывороточного IL-6. Эффективная доза может содержать 1 мг, 5 мг, 10 мг, 25 мг, 50 мг, 75 мг, 100 мг, 150 мг, 200 мг, 250 мг, 300 мг, 400 мг или 500 мг анти IL-6 антитела, описанного в данной заявке. Нейтрализация сывороточного IL-6 может продолжаться в течение как минимум приблизительно 1 дня, как минимум приблизительно 2 дней, как минимум приблизительно 3 дней, как минимум приблизительно 4 дней, как минимум
- 40 приблизительно 5 дней, как минимум приблизительно 6 дней, как минимум приблизительно 7 дней, как минимум приблизительно 10 дней, как минимум приблизительно 15 дней, или как минимум приблизительно 20 дней. Субъект может быть человеком или нечеловеческим приматом.

- [0119] В другом варианте исполнения, введение более чем одной дозы анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением может достигать непрерывной как минимум приблизительно 20%, как минимум приблизительно 30%, как минимум
- 45 приблизительно 40%, как минимум приблизительно 50%, как минимум приблизительно 60%, как минимум приблизительно 70%, как минимум приблизительно 80%, как минимум

приблизительно 90%, как минимум приблизительно 95%, как минимум приблизительно 97%, как минимум приблизительно 99%, или как минимум приблизительно 100% нейтрализации сывороточного IL-6. В одном варианте исполнения, каждая более чем из одной дозы содержит то же самое количество анти-IL-6 антитела. Эффективная доза может содержать 1 мг, 5 мг, 10 мг, 25 мг, 50 мг, 75 мг, 100 мг, 150 мг, 200 мг, 250 мг, 300 мг, 400 мг или 500 мг анти IL-6 антитела, описанного в данной заявке. В другом варианте исполнения, за начальной дозой нагрузки следуют последующие поддерживающие дозы. Начальная доза нагрузки может содержать в два, 3 раза, 4 раза, 5 раз, или 10 раз более анти-IL-6 антитела, чем поддерживающие дозы. В одном варианте исполнения, временной интервал, разделяющий дозы, является постоянным. Дозы анти-IL-6 антитела могут быть введены один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в три недели, один раз в четыре недели, один раз в восемь недель или один раз в двенадцать недель. В конкретном варианте исполнения, введение 50 мг дозы анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением каждые 4 недели достигает непрерывного как минимум 90% нейтрализации сывороточного IL-6. В конкретном варианте исполнения, введение 100 мг дозы анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением каждые 8 недель достигает непрерывного как минимум 90% нейтрализации сывороточного IL-6. В конкретном варианте исполнения, введение 200 мг дозы анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением каждые 12 недель достигает непрерывного как минимум 90% нейтрализации сывороточного IL-6. Анти-IL-6 антитело может быть введено при помощи любого способа, известного из уровня техники, например, не ограничиваясь приведенным, посредством подкожной или внутривенной инъекции. Субъект может быть человеком или нечеловеческим приматом.

[0120] В одном варианте исполнения, антитело в соответствии с данным изобретением способно к ингибированию IL-6 опосредованной сигнализации у субъекта. Введение эффективной дозы анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением может достигать как минимум приблизительно 20%, как минимум приблизительно 30%, как минимум приблизительно 40%, как минимум приблизительно 50%, как минимум приблизительно 60%, как минимум приблизительно 70%, как минимум приблизительно 80%, как минимум приблизительно 90%, как минимум приблизительно 95%, как минимум приблизительно 97%, как минимум приблизительно 99%, или как минимум приблизительно 100% ингибирование IL-6 опосредованной сигнализации у субъекта. Эффективная доза может содержать 1 мг, 5 мг, 10 мг, 25 мг, 50 мг, 75 мг, 100 мг, 150 мг, 200 мг, 250 мг, 300 мг, 400 мг или 500 мг анти IL-6 антитела, описанного в данной заявке. Ингибирование IL-6 опосредованной сигнализации у субъекта может продолжаться в течение как минимум приблизительно 1 дня, как минимум приблизительно 2 дней, как минимум приблизительно 3 дней, как минимум приблизительно 4 дней, как минимум приблизительно 5 дней, как минимум приблизительно 6 дней, как минимум приблизительно 7 дней, как минимум приблизительно 10 дней, как минимум приблизительно 15 дней, или как минимум приблизительно 20 дней. Субъект может быть человеком или нечеловеческим приматом.

[0121] В другом варианте исполнения, введение более чем одной дозы анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением может достигать непрерывного, как минимум приблизительно 20%, как минимум приблизительно 30%, как минимум приблизительно 40%, как минимум приблизительно 50%, как минимум приблизительно 60%, как минимум приблизительно 70%, как минимум приблизительно 80%, как минимум приблизительно 90%, как минимум приблизительно 95%, как минимум приблизительно 97%, как минимум приблизительно 99%, или как минимум приблизительно 100%

ингибирования IL-6 опосредованной сигнализации у субъекта. В одном варианте исполнения, каждая более чем из одной дозы содержит то же самое количество анти-IL-6 антитела. Эффективная доза может содержать 1 мг, 5 мг, 10 мг, 25 мг, 50 мг, 75 мг, 100 мг, 150 мг, 200 мг, 250 мг, 300 мг, 400 мг или 500 мг анти IL-6 антитела, описанного в данной заявке. В другом варианте исполнения, за начальной дозой нагрузки следуют последующие поддерживающие дозы. Начальная доза нагрузки может содержать в два, 3 раза, 4 раза, 5 раз, или 10 раз больше анти-IL-6 антитела, чем поддерживающие дозы. В одном варианте исполнения, временной интервал, разделяющий дозы, является постоянным. Дозы анти-IL-6 антитела могут быть введены один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в три недели, один раз в четыре недели, один раз в восемь недель или один раз в двенадцать недель. В конкретном варианте исполнения, введение 50 мг дозы анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением каждые 4 недели достигает непрерывного как минимум 90% ингибирования IL-6 опосредованной сигнализации у субъекта. В конкретном варианте исполнения, введение 100 мг дозы анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением каждые 8 недель достигает непрерывного как минимум 90% ингибирования IL-6 опосредованной сигнализации у субъекта. В конкретном варианте исполнения, введение 200 мг дозы анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением каждые 12 недель достигает непрерывного как минимум 90% ингибирования IL-6 опосредованной сигнализации у субъекта. Анти-IL-6 антитело может быть введено при помощи любого способа, известного из уровня техники, например, но не ограничиваясь приведенным, посредством подкожной или внутривенной инъекции. Субъект может быть человеком или нечеловеческим приматом.

[0122] В одном варианте исполнения, антитело в соответствии с данным изобретением способно к уменьшению роста синовиальных клеток у субъекта. Введение эффективной дозы анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением может достигать как минимум приблизительно 20%, как минимум приблизительно 30%, как минимум приблизительно 40%, как минимум приблизительно 50%, как минимум приблизительно 60%, как минимум приблизительно 70%, как минимум приблизительно 80%, как минимум приблизительно 90%, как минимум приблизительно 95%, как минимум приблизительно 97%, как минимум приблизительно 99%, или как минимум приблизительно 100% уменьшения роста синовиальных клеток у субъекта. Эффективная доза может содержать 1 мг, 5 мг, 10 мг, 25 мг, 50 мг, 75 мг, 100 мг, 150 мг, 200 мг, 250 мг, 300 мг, 400 мг или 500 мг анти IL-6 антитела, описанного в данной заявке. Уменьшение роста синовиальных клеток у субъекта может продолжаться в течение как минимум приблизительно 1 дня, как минимум приблизительно 2 дней, как минимум приблизительно 3 дней, как минимум приблизительно 4 дней, как минимум приблизительно 5 дней, как минимум приблизительно 6 дней, как минимум приблизительно 7 дней, как минимум приблизительно 10 дней, как минимум приблизительно 15 дней, или как минимум приблизительно 20 дней. Субъект может быть человеком или нечеловеческим приматом.

[0123] В другом варианте исполнения, введение более чем одной дозы анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением может достигать непрерывного как минимум приблизительно 20%, как минимум приблизительно 30%, как минимум приблизительно 40%, как минимум приблизительно 50%, как минимум приблизительно 60%, как минимум приблизительно 70%, как минимум приблизительно 80%, как минимум приблизительно 90%, как минимум приблизительно 95%, как минимум приблизительно 97%, как минимум приблизительно 99%, или как минимум приблизительно 100% уменьшения роста синовиальных клеток у субъекта. В одном варианте исполнения, каждая более чем из одной дозы содержит то же самое количество анти-IL-6 антитела.

Эффективная доза может содержать 1 мг, 5 мг, 10 мг, 25 мг, 50 мг, 75 мг, 100 мг, 150 мг, 200 мг, 250 мг, 300 мг, 400 мг или 500 мг анти IL-6 антитела, описанного в данной заявке. В другом варианте исполнения, за начальной дозой нагрузки следуют последующие поддерживающие дозы. Начальная доза нагрузки может содержать в
 5 два, 3 раза, 4 раза, 5 раз, или 10 раз больше анти-IL-6 антитела, чем поддерживающие дозы. В одном варианте исполнения, временной интервал, разделяющий дозы, является постоянным. Дозы анти-IL-6 антитела могут быть введены один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в три недели, один раз в четыре недели, один раз в восемь недель или один раз в двенадцать недель. В конкретном варианте исполнения, введение
 10 50 мг дозы анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением каждые 4 недели достигает непрерывного как минимум 90% уменьшения роста синовиальных клеток у субъекта. В конкретном варианте исполнения, введение 100 мг дозы анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением каждые 8 недель достигает непрерывного как минимум 90% уменьшения роста синовиальных клеток у субъекта. В конкретном
 15 варианте исполнения, введение 200 мг дозы анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением каждые 12 недель достигает непрерывного как минимум 90% уменьшения роста синовиальных клеток у субъекта. Анти-IL-6 антитело может быть введено при помощи любого способа, известного из уровня техники, например, но не ограничиваясь приведенным, посредством подкожной или внутривенной инъекции. Субъект может
 20 быть человеком или нечеловеческим приматом.

[0124] В одном варианте исполнения, антитело в соответствии с данным изобретением способно к уменьшению синовиального воспаления у субъекта. Введение эффективной дозы анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением может достигать как минимум приблизительно 20%, как минимум приблизительно 30%, как минимум
 25 приблизительно 40%, как минимум приблизительно 50%, как минимум приблизительно 60%, как минимум приблизительно 70%, как минимум приблизительно 80%, как минимум приблизительно 90%, как минимум приблизительно 95%, как минимум приблизительно 97%, как минимум приблизительно 99%, или как минимум приблизительно 100% уменьшения синовиального воспаления у субъекта. Эффективная доза может содержать
 30 1 мг, 5 мг, 10 мг, 25 мг, 50 мг, 75 мг, 100 мг, 150 мг, 200 мг, 250 мг, 300 мг, 400 мг или 500 мг анти IL-6 антитела, описанного в данной заявке. Уменьшение синовиального воспаления у субъекта может продолжаться в течение как минимум приблизительно 1 дня, как минимум приблизительно 2 дней, как минимум приблизительно 3 дней, как минимум приблизительно 4 дней, как минимум приблизительно 5 дней, как минимум
 35 приблизительно 6 дней, как минимум приблизительно 7 дней, как минимум приблизительно 10 дней, как минимум приблизительно 15 дней, или как минимум приблизительно 20 дней. Субъект может быть человеком или нечеловеческим приматом.

[0125] В другом варианте исполнения, введение более, чем одной дозы анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением может достигать непрерывного как
 40 минимум приблизительно 20%, как минимум приблизительно 30%, как минимум приблизительно 40%, как минимум приблизительно 50%, как минимум приблизительно 60%, как минимум приблизительно 70%, как минимум приблизительно 80%, как минимум приблизительно 90%, как минимум приблизительно 95%, как минимум приблизительно 97%, как минимум приблизительно 99%, или как минимум приблизительно 100% уменьшения синовиального воспаления у субъекта. В одном варианте исполнения, каждая более чем из одной дозы содержит то же самое количество анти-IL-6 антитела. Эффективная доза может содержать 1 мг, 5 мг, 10 мг, 25 мг, 50 мг, 75 мг, 100 мг, 150 мг, 200 мг, 250 мг, 300 мг, 400 мг или 500 мг анти IL-6 антитела, описанного в данной

заявке. В другом варианте исполнения, за начальной дозой нагрузки следуют последующие поддерживающие дозы. Начальная доза нагрузки может содержать в два, 3 раза, 4 раза, 5 раз, или 10 раз больше анти-IL-6 антитела, чем поддерживающие дозы. В одном варианте исполнения, временной интервал, разделяющий дозы, является постоянным. Дозы анти-IL-6 антитела могут быть введены один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в три недели, один раз в четыре недели, один раз в восемь недель или один раз в двенадцать недель. В конкретном варианте исполнения, введение 50 мг дозы анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением каждые 4 недели достигает непрерывного как минимум 90% уменьшения синовиального воспаления у субъекта. В конкретном варианте исполнения, введение 100 мг дозы анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением каждые 8 недель достигает непрерывного как минимум 90% уменьшения синовиального воспаления у субъекта. В конкретном варианте исполнения, введение 200 мг дозы анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением каждые 12 недель достигает непрерывного как минимум 90% уменьшения синовиального воспаления у субъекта. Анти-IL-6 антитело может быть введено при помощи любого способа, известного из уровня техники, например, но не ограничиваясь приведенным, посредством подкожной или внутривенной инъекции. Субъект может быть человеком или нечеловеческим приматом.

[0126] Данное изобретение дополнительно представляет способы уменьшения концентрации в сыворотке свободного IL-6, для нейтрализации сывороточного IL-6 у субъекта, для нейтрализации IL-6 у субъекта, для ингибирования IL-6 опосредованной сигнализации у субъекта, для уменьшения роста синовиальных клеток у субъекта и для уменьшения синовиального воспаления у субъекта.

[0127] В одном варианте исполнения, способ уменьшения концентрации в сыворотке свободного IL-6 (т.е. не связанного анти-IL-6 антитела) у субъекта включает введение эффективной дозы анти-IL-6 антитела с пролонгированным периодом полувыведения. Введение эффективной дозы анти-IL-6 антитела может достигать как минимум приблизительно 20%, как минимум приблизительно 30%, как минимум приблизительно 40%, как минимум приблизительно 50%, как минимум приблизительно 60%, как минимум приблизительно 70%, как минимум приблизительно 80%, как минимум приблизительно 90%, как минимум приблизительно 95%, как минимум приблизительно 97%, как минимум приблизительно 99%, или как минимум приблизительно 100% уменьшения в сыворотке концентрации свободного IL-6. Эффективная доза может содержать 1 мг, 5 мг, 10 мг, 25 мг, 50 мг, 75 мг, 100 мг, 150 мг, 200 мг, 250 мг, 300 мг, 400 мг или 500 мг анти IL-6 антитела, описанного в данной заявке. Уменьшение уровней свободного IL-6 может продолжаться в течение как минимум приблизительно 1 дня, как минимум приблизительно 2 дней, как минимум приблизительно 3 дней, как минимум приблизительно 4 дней, как минимум приблизительно 5 дней, как минимум приблизительно 6 дней, как минимум приблизительно 7 дней, как минимум приблизительно 10 дней, как минимум приблизительно 15 дней, или как минимум приблизительно 20 дней. Субъект может быть человеком или нечеловеческим приматом. В конкретном варианте исполнения, способ уменьшения концентрации в сыворотке свободного IL-6 на как минимум приблизительно 90% у субъекта включает введение эффективной дозы 1 мг, 5 мг, 10 мг, 25 мг, 50 мг, 75 мг, 100 мг, 150 мг, 200 мг, 250 мг, 300 мг, 400 мг или 500 мг анти-IL-6 антитела с пролонгированным периодом полувыведения, где как минимум 90% уменьшения в сыворотке концентрации свободного IL-6 продолжается в течение как минимум приблизительно 1 дня, как минимум приблизительно 2 дней, как минимум приблизительно 3 дней, как минимум

приблизительно 4 дней, как минимум приблизительно 5 дней, как минимум приблизительно 6 дней, как минимум приблизительно 7 дней, как минимум приблизительно 10 дней, как минимум приблизительно 15 дней, или как минимум приблизительно 20 дней.

- 5 [0128] В одном варианте исполнения, способ уменьшения концентрации в сыворотке свободного IL-6 у субъекта включает введение более чем одной дозы анти-IL-6 антитела с пролонгированным периодом полувыведения. Введение более чем одной дозы анти-IL-6 антитела может уменьшать концентрацию в сыворотке свободного IL-6 на как минимум приблизительно 20%, как минимум приблизительно 30%, как минимум
- 10 приблизительно 40%, как минимум приблизительно 50%, как минимум приблизительно 60%, как минимум приблизительно 70%, как минимум приблизительно 80%, как минимум приблизительно 90%, как минимум приблизительно 95%, как минимум приблизительно 97%, как минимум приблизительно 99%, или как минимум приблизительно 100%. В одном варианте исполнения, способ поддержания уменьшенной концентрации в
- 15 сыворотке свободного IL-6 у субъекта включает введение более чем одной дозы анти-IL-6 антитела с пролонгированным периодом полувыведения. Введение более чем одной дозы анти-IL-6 антитела может поддерживать как минимум приблизительно 20%, как минимум приблизительно 30%, как минимум приблизительно 40%, как минимум приблизительно 50%, как минимум приблизительно 60%, как минимум приблизительно 70%, как минимум приблизительно 80%, как минимум приблизительно 90%, как минимум
- 20 приблизительно 95%, как минимум приблизительно 97%, как минимум приблизительно 99%, или как минимум приблизительно 100% уменьшения в сыворотке концентрации свободного IL-6. В одном варианте исполнения, способ достижения непрерывного уменьшения в сыворотке концентрации свободного IL-6 у субъекта включает введение
- 25 более чем одной дозы анти-IL-6 антитела с пролонгированным периодом полувыведения. Введение более чем одной дозы анти-IL-6 антитела может достигать как минимум приблизительно 20%, как минимум приблизительно 30%, как минимум приблизительно 40%, как минимум приблизительно 50%, как минимум приблизительно 60%, как минимум приблизительно 70%, как минимум приблизительно 80%, как минимум приблизительно 90%, как минимум приблизительно 95%, как минимум приблизительно 97%, как минимум
- 30 приблизительно 99%, или как минимум приблизительно 100% непрерывного уменьшения в сыворотке концентрации свободного IL-6. В одном варианте исполнения, каждая более чем из одной дозы содержит то же самое количество анти-IL-6 антитела. Разовая доза может содержать 1 мг, 5 мг, 10 мг, 25 мг, 50 мг, 75 мг, 100 мг, 150 мг, 200 мг, 250
- 35 мг, 300 мг, 400 мг или 500 мг анти IL-6 антитела, описанного в данной заявке. В другом варианте исполнения, за начальной дозой нагрузки следуют последующие поддерживающие дозы. Начальная доза нагрузки может содержать в два, 3 раза, 4 раза, 5 раз, или 10 раз больше анти-IL-6 антитела, чем поддерживающие дозы. В одном варианте исполнения, временной интервал, разделяющий дозы, является постоянным.
- 40 Дозы анти-IL-6 антитела могут быть введены один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в три недели, один раз в четыре недели, один раз в восемь недель или один раз в двенадцать недель. Анти-IL-6 антитело может быть введено при помощи любого способа, известного из уровня техники, но, не ограничиваясь приведенным, посредством подкожной или внутривенной инъекции. Субъект может быть человеком или
- 45 нечеловеческим приматом.

[0129] В конкретном варианте исполнения, способ уменьшения концентрации в сыворотке свободного IL-6 у субъекта на как минимум 90% включает введение 50 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 4 недели. В конкретном варианте исполнения, способ

уменьшения концентрации в сыворотке свободного IL-6 у субъекта на как минимум 90% включает введение 100 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 8 недель. В конкретном варианте исполнения, способ уменьшения концентрации в сыворотке свободного IL-6 у субъекта на как минимум 90% включает введение 200 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 12 недель. В конкретном варианте исполнения, способ поддержания как минимум на 90% уменьшенной концентрации в сыворотке свободного IL-6 у субъекта включает введение 50 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 4 недели. В конкретном варианте исполнения, способ поддержания как минимум на 90% уменьшенной концентрации в сыворотке свободного IL-6 у субъекта включает введение 100 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 8 недель. В конкретном варианте исполнения, способ поддержания как минимум на 90% уменьшенной концентрации в сыворотке свободного IL-6 у субъекта включает введение 200 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 12 недель. В конкретном варианте исполнения, способ достижения непрерывного как минимум 90% уменьшения в сыворотке концентрации свободного IL-6 у субъекта включает введение 50 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 4 недели. В конкретном варианте исполнения, способ достижения непрерывного как минимум 90% уменьшения в сыворотке концентрации свободного IL-6 у субъекта включает введение 100 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 8 недель. В конкретном варианте исполнения, способ достижения непрерывного как минимум 90% уменьшения в сыворотке концентрации свободного IL-6 у субъекта включает введение 200 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 12 недель. Анти-IL-6 антитело может быть введено при помощи любого способа, известного из уровня техники, но, не ограничиваясь приведенным, посредством подкожной или внутривенной инъекции. Субъект может быть человеком или нечеловеческим приматом.

[0130] В конкретном варианте исполнения, способ уменьшения концентрации в сыворотке свободного IL-6 у субъекта на как минимум 90% включает (а) введение дозы нагрузки 100 мг анти-IL-6 антитела и (b) введение 50 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 4 недели. В конкретном варианте исполнения, способ уменьшения концентрации в сыворотке свободного IL-6 у субъекта на как минимум 90% включает (а) введение дозы нагрузки 200 мг анти-IL-6 антитела и (b) введение 100 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 8 недель. В конкретном варианте исполнения, способ уменьшения концентрации в сыворотке свободного IL-6 у субъекта на как минимум 90% включает (а) введение дозы нагрузки 400 мг анти-IL-6 антитела и (b) введение 200 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 12 недель. В конкретном варианте исполнения, способ поддержания как минимум на 90% уменьшенной концентрации в сыворотке свободного IL-6 у субъекта включает (а) введение дозы нагрузки 100 мг анти-IL-6 антитела и (b) введение 50 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 4 недели. В конкретном варианте исполнения, способ поддержания как минимум на 90% уменьшенной концентрации в сыворотке свободного IL-6 у субъекта включает (а) введение дозы нагрузки 200 мг анти-IL-6 антитела и (b) введение 100 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 8 недель. В конкретном варианте исполнения, способ поддержания как минимум на 90% уменьшенной концентрации в сыворотке свободного IL-6 у субъекта включает (а) введение дозы нагрузки 400 мг анти-IL-6 антитела и (b) введение 200 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 12 недель. В конкретном варианте исполнения, способ достижения непрерывного как минимум 90% уменьшения в сыворотке концентрации свободного IL-6 у субъекта включает (а) введение дозы нагрузки 100 мг анти-IL-6 антитела и (b) введение 50 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 4 недели. В конкретном варианте исполнения, способ достижения непрерывного как минимум 90% уменьшения в сыворотке концентрации

свободного IL-6 у субъекта включает (а) введение дозы нагрузки 200 мг анти-IL-6 антитела и (b) введение 100 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 8 недель. В конкретном варианте исполнения, способ достижения непрерывного как минимум 90% уменьшения в сыворотке концентрации свободного IL-6 у субъекта включает (а) введение дозы нагрузки 400 мг анти-IL-6 антитела и (b) введение 200 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 12 недель. Анти-IL-6 антитело может быть введено при помощи любого способа, известного из уровня техники, например, но не ограничиваясь приведенным, посредством подкожной или внутривенной инъекции. Субъект может быть человеком или нечеловеческим приматом.

[0131] В одном варианте исполнения, способ нейтрализации сывороточного IL-6 у субъекта включает введение эффективной дозы анти-IL-6 антитела с пролонгированным периодом полувыведения. Введение эффективной дозы анти-IL-6 антитела может достигать как минимум приблизительно 20%, как минимум приблизительно 30%, как минимум приблизительно 40%, как минимум приблизительно 50%, как минимум приблизительно 60%, как минимум приблизительно 70%, как минимум приблизительно 80%, как минимум приблизительно 90%, как минимум приблизительно 95%, как минимум приблизительно 97%, как минимум приблизительно 99%, или как минимум приблизительно 100% нейтрализации сывороточного IL-6. Эффективная доза может содержать 1 мг, 5 мг, 10 мг, 25 мг, 50 мг, 75 мг, 100 мг, 150 мг, 200 мг, 250 мг, 300 мг, 400 мг или 500 мг анти IL-6 антитела, описанного в данной заявке. Нейтрализация сывороточного IL-6 может продолжаться в течение как минимум приблизительно 1 дня, как минимум приблизительно 2 дней, как минимум приблизительно 3 дней, как минимум приблизительно 4 дней, как минимум приблизительно 5 дней, как минимум приблизительно 6 дней, как минимум приблизительно 7 дней, как минимум приблизительно 10 дней, как минимум приблизительно 15 дней, или как минимум приблизительно 20 дней. Субъект может быть человеком или нечеловеческим приматом. В конкретном варианте исполнения, способ нейтрализации как минимум приблизительно 90% сывороточного IL-6 у субъекта включает введение эффективной дозы 1 мг, 5 мг, 10 мг, 25 мг, 50 мг, 75 мг, 100 мг, 150 мг, 200 мг, 250 мг, 300 мг, 400 мг или 500 мг анти-IL-6 антитела с пролонгированным периодом полувыведения, где как минимум 90% нейтрализации сывороточного IL-6 продолжается в течение как минимум приблизительно 1 дня, как минимум приблизительно 2 дней, как минимум приблизительно 3 дней, как минимум приблизительно 4 дней, как минимум приблизительно 5 дней, как минимум приблизительно 6 дней, как минимум приблизительно 7 дней, как минимум приблизительно 10 дней, как минимум приблизительно 15 дней, или как минимум приблизительно 20 дней.

[0132] В одном варианте исполнения, способ нейтрализации сывороточного IL-6 у субъекта включает введение более чем одной дозы анти-IL-6 антитела с пролонгированным периодом полувыведения. Введение более чем одной дозы анти-IL-6 антитела может достигать как минимум приблизительно 20%, как минимум приблизительно 30%, как минимум приблизительно 40%, как минимум приблизительно 50%, как минимум приблизительно 60%, как минимум приблизительно 70%, как минимум приблизительно 80%, как минимум приблизительно 90%, как минимум приблизительно 95%, как минимум приблизительно 97%, как минимум приблизительно 99%, или как минимум приблизительно 100% нейтрализации сывороточного IL-6. В одном варианте исполнения, способ поддержания нейтрализации сывороточного IL-6 у субъекта включает введение более чем одной дозы анти-IL-6 антитела с пролонгированным периодом полувыведения. Введение более чем одной дозы анти-IL-6 антитела может

поддерживать как минимум приблизительно 20%, как минимум приблизительно 30%, как минимум приблизительно 40%, как минимум приблизительно 50%, как минимум приблизительно 60%, как минимум приблизительно 70%, как минимум приблизительно 80%, как минимум приблизительно 90%, как минимум приблизительно 95%, как минимум приблизительно 97%, как минимум приблизительно 99%, или как минимум приблизительно 100% нейтрализации сывороточного IL-6. В одном варианте исполнения, способ достижения непрерывной нейтрализации сывороточного IL-6 у субъекта включает введение более чем одной дозы анти-IL-6 антитела с пролонгированным периодом полувыведения. Введение более чем одной дозы анти-IL-6 антитела может достигать непрерывной как минимум приблизительно 20%, как минимум приблизительно 30%, как минимум приблизительно 40%, как минимум приблизительно 50%, как минимум приблизительно 60%, как минимум приблизительно 70%, как минимум приблизительно 80%, как минимум приблизительно 90%, как минимум приблизительно 95%, как минимум приблизительно 97%, как минимум приблизительно 99%, или как минимум приблизительно 100% нейтрализации сывороточного IL-6. В одном варианте исполнения, каждая более чем из одной дозы содержит то же самое количество анти-IL-6 антитела. Разовая доза может содержать 1 мг, 5 мг, 10 мг, 25 мг, 50 мг, 75 мг, 100 мг, 150 мг, 200 мг, 250 мг, 300 мг, 400 мг или 500 мг анти IL-6 антитела, описанного в данной заявке. В другом варианте исполнения, за начальной дозой нагрузки следуют последующие поддерживающие дозы. Начальная доза нагрузки может содержать в два, 3 раза, 4 раза, 5 раз, или в 10 раз больше анти-IL-6 антитела, чем поддерживающие дозы. В одном варианте исполнения, временной интервал, разделяющий дозы, является постоянным. Дозы анти-IL-6 антитела могут быть введены один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в три недели, один раз в четыре недели, один раз в восемь недель или один раз в двенадцать недель. Анти-IL-6 антитело может быть введено при помощи любого способа, известного из уровня техники, но, не ограничиваясь приведенным, посредством подкожной или внутривенной инъекции. Субъект может быть человеком или нечеловеческим приматом.

[0133] В конкретном варианте исполнения, способ нейтрализации как минимум приблизительно 90% сывороточного IL-6 у субъекта включает введение 50 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 4 недели. В конкретном варианте исполнения, способ нейтрализации как минимум приблизительно 90% сывороточного IL-6 у субъекта включает введение 100 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 8 недель. В конкретном варианте исполнения, способ нейтрализации как минимум приблизительно 90% сывороточного IL-6 у субъекта включает введение 200 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 12 недель. В конкретном варианте исполнения, способ поддержания как минимум 90% нейтрализации сывороточного IL-6 у субъекта включает введение 50 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 4 недели. В конкретном варианте исполнения, способ поддержания как минимум 90% нейтрализации сывороточного IL-6 у субъекта включает введение 100 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 8 недель. В конкретном варианте исполнения, способ поддержания как минимум 90% нейтрализации сывороточного IL-6 у субъекта включает введение 200 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 12 недель. В конкретном варианте исполнения, способ достижения непрерывного как минимум 90% нейтрализации сывороточного IL-6 у субъекта включает введение 50 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 4 недели. В конкретном варианте исполнения, способ достижения непрерывного как минимум 90% нейтрализации сывороточного IL-6 у субъекта включает введение 100 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 8 недель. В конкретном варианте исполнения, способ достижения непрерывного как минимум 90%

нейтрализации сывороточного IL-6 у субъекта включает введение 200 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 12 недель. Анти-IL-6 антитело может быть введено при помощи любого способа, известного из уровня техники, например, но не ограничиваясь приведенным, посредством подкожной или внутривенной инъекции. Субъект может

5 быть человеком или нечеловеческим приматом.

[0134] В конкретном варианте исполнения, способ нейтрализации как минимум приблизительно 90% сывороточного IL-6 у субъекта включает (а) введение дозы нагрузки 100 мг анти-IL-6 антитела и (b) введение 50 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 4 недели. В конкретном варианте исполнения, способ нейтрализации как минимум

10 приблизительно 90% сывороточного IL-6 у субъекта включает (а) введение дозы нагрузки 200 мг анти-IL-6 антитела и (b) введение 100 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 8 недель. В конкретном варианте исполнения, способ нейтрализации как минимум приблизительно 90% сывороточного IL-6 у субъекта включает (а) введение дозы нагрузки 400 мг анти-IL-6 антитела и (b) введение 200 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые

15 12 недель. В конкретном варианте исполнения, способ поддержания как минимум 90% нейтрализации сывороточного IL-6 у субъекта включает (а) введение дозы нагрузки 100 мг анти-IL-6 антитела и (b) введение 50 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 4 недели. В конкретном варианте исполнения, способ поддержания как минимум 90% нейтрализации сывороточного IL-6 у субъекта включает (а) введение дозы нагрузки

20 200 мг анти-IL-6 антитела и (b) введение 100 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 8 недель. В конкретном варианте исполнения, способ поддержания как минимум 90% нейтрализации сывороточного IL-6 у субъекта включает (а) введение дозы нагрузки 400 мг анти-IL-6 антитела и (b) введение 200 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 12 недель. В конкретном варианте исполнения, способ достижения непрерывного как

25 минимум 90% нейтрализации сывороточного IL-6 у субъекта включает (а) введение дозы нагрузки 100 мг анти-IL-6 антитела и (b) введение 50 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 4 недели. В конкретном варианте исполнения, способ достижения непрерывного как минимум 90% нейтрализации сывороточного IL-6 у субъекта включает (а) введение дозы нагрузки 200 мг анти-IL-6 антитела и (b) введение 100 мг дозы анти-IL-6 антитела

30 каждые 8 недель. В конкретном варианте исполнения, способ достижения непрерывного как минимум 90% нейтрализации сывороточного IL-6 у субъекта включает (а) введение дозы нагрузки 400 мг анти-IL-6 антитела и (b) введение 200 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 12 недель. Анти-IL-6 антитело может быть введено при помощи любого способа, известного из уровня техники, но, не ограничиваясь приведенным, посредством

35 подкожной или внутривенной инъекции. Субъект может быть человеком или нечеловеческим приматом.

[0135] В одном варианте исполнения, способ нейтрализации IL-6 у субъекта включает введение эффективной дозы анти-IL-6 антитела с пролонгированным периодом полувыведения. Введение эффективной дозы анти-IL-6 антитела может достигать как

40 минимум приблизительно 20%, как минимум приблизительно 30%, как минимум приблизительно 40%, как минимум приблизительно 50%, как минимум приблизительно 60%, как минимум приблизительно 70%, как минимум приблизительно 80%, как минимум приблизительно 90%, как минимум приблизительно 95%, как минимум приблизительно 97%, как минимум приблизительно 99%, или как минимум приблизительно 100%

45 нейтрализации IL-6. Эффективная доза может содержать 1 мг, 5 мг, 10 мг, 25 мг, 50 мг, 75 мг, 100 мг, 150 мг, 200 мг, 250 мг, 300 мг, 400 мг или 500 мг анти IL-6 антитела, описанного в данной заявке. Нейтрализация IL-6 может продолжаться в течение как минимум приблизительно 1 дня, как минимум приблизительно 2 дней, как минимум

приблизительно 3 дней, как минимум приблизительно 4 дней, как минимум приблизительно 5 дней, как минимум приблизительно 6 дней, как минимум приблизительно 7 дней, как минимум приблизительно 10 дней, как минимум приблизительно 15 дней, или как минимум приблизительно 20 дней. Субъект может
 5 быть человеком или нечеловеческим приматом. В конкретном варианте исполнения, способ нейтрализации как минимум приблизительно 90% IL-6 у субъекта включает введение эффективной дозы 1 мг, 5 мг, 10 мг, 25 мг, 50 мг, 75 мг, 100 мг, 150 мг, 200 мг, 250 мг, 300 мг, 400 мг или 500 мг анти-IL-6 антитела с пролонгированным периодом полувыведения, где как минимум 90% нейтрализации IL-6 продолжается в течение как
 10 минимум приблизительно 1 дня, как минимум приблизительно 2 дней, как минимум приблизительно 3 дней, как минимум приблизительно 4 дней, как минимум приблизительно 5 дней, как минимум приблизительно 6 дней, как минимум приблизительно 7 дней, как минимум приблизительно 10 дней, как минимум приблизительно 15 дней, или как минимум приблизительно 20 дней.

15 [0136] В одном варианте исполнения, способ нейтрализации IL-6 у субъекта включает введение более чем одной дозы анти-IL-6 антитела с пролонгированным периодом полувыведения. Введение более чем одной дозы анти-IL-6 антитела может достигать как минимум приблизительно 20%, как минимум приблизительно 30%, как минимум приблизительно 40%, как минимум приблизительно 50%, как минимум приблизительно
 20 60%, как минимум приблизительно 70%, как минимум приблизительно 80%, как минимум приблизительно 90%, как минимум приблизительно 95%, как минимум приблизительно 97%, как минимум приблизительно 99%, или как минимум приблизительно 100% нейтрализации IL-6. В одном варианте исполнения, способ поддержания IL-6 нейтрализации у субъекта включает введение более чем одной дозы анти-IL-6 антитела
 25 с пролонгированным периодом полувыведения. Введение более чем одной дозы анти-IL-6 антитела может поддерживать как минимум приблизительно 20%, как минимум приблизительно 30%, как минимум приблизительно 40%, как минимум приблизительно 50%, как минимум приблизительно 60%, как минимум приблизительно 70%, как минимум приблизительно 80%, как минимум приблизительно 90%, как минимум приблизительно
 30 95%, как минимум приблизительно 97%, как минимум приблизительно 99%, или как минимум приблизительно 100% нейтрализации IL-6. В одном варианте исполнения, способ достижения непрерывной нейтрализации IL-6 у субъекта включает введение более чем одной дозы анти-IL-6 антитела с пролонгированным периодом полувыведения. Введение более чем одной дозы анти-IL-6 антитела может достигать непрерывной как
 35 минимум приблизительно 20%, как минимум приблизительно 30%, как минимум приблизительно 40%, как минимум приблизительно 50%, как минимум приблизительно 60%, как минимум приблизительно 70%, как минимум приблизительно 80%, как минимум приблизительно 90%, как минимум приблизительно 95%, как минимум приблизительно 97%, как минимум приблизительно 99%, или как минимум приблизительно 100%
 40 нейтрализации IL-6. В одном варианте исполнения, каждая более чем из одной дозы содержит то же самое количество анти-IL-6 антитела. Разовая доза может содержать 1 мг, 5 мг, 10 мг, 25 мг, 50 мг, 75 мг, 100 мг, 150 мг, 200 мг, 250 мг, 300 мг, 400 мг или 500 мг анти IL-6 антитела, описанного в данной заявке. В другом варианте исполнения, за начальной дозой нагрузки следуют последующие поддерживающие дозы. Начальная
 45 доза нагрузки может содержать в два, 3 раза, 4 раза, 5 раз, или 10 раз больше анти-IL-6 антитела, чем поддерживающие дозы. В одном варианте исполнения, временной интервал, разделяющий дозы, является постоянным. Дозы анти-IL-6 антитела могут быть введены один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в три недели, один

раз в четыре недели, один раз в восемь недель или один раз в двенадцать недель. Анти-IL-6 антитело может быть введено при помощи любого способа, известного из уровня техники, но, не ограничиваясь приведенным, посредством подкожной или внутривенной инъекции. Субъект может быть человеком или нечеловеческим приматом.

5 [0137] В конкретном варианте исполнения, способ нейтрализации как минимум приблизительно 90% IL-6 у субъекта включает введение 50 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 4 недели. В конкретном варианте исполнения, способ нейтрализации как минимум приблизительно 90% IL-6 у субъекта включает введение 100 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 8 недель. В конкретном варианте исполнения, способ
10 нейтрализации как минимум приблизительно 90% IL-6 у субъекта включает введение 200 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 12 недель. В конкретном варианте исполнения, способ поддержания как минимум 90% нейтрализации IL-6 у субъекта включает введение 50 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 4 недели. В конкретном варианте исполнения, способ поддержания как минимум 90% нейтрализации IL-6 у субъекта
15 включает введение 100 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 8 недель. В конкретном варианте исполнения, способ поддержания как минимум 90% нейтрализации IL-6 у субъекта включает введение 200 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 12 недель. В конкретном варианте исполнения, способ достижения непрерывный как минимум 90% нейтрализации IL-6 у субъекта включает введение 50 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые
20 4 недели. В конкретном варианте исполнения, способ достижения непрерывной как минимум 90% нейтрализации IL-6 у субъекта включает введение 100 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 8 недель. В конкретном варианте исполнения, способ достижения непрерывной как минимум 90% нейтрализации IL-6 у субъекта включает введение 200 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 12 недель. Анти-IL-6 антитело может быть введено
25 при помощи любого способа, известного из уровня техники, но, не ограничиваясь приведенным, посредством подкожной или внутривенной инъекции. Субъект может быть человеком или нечеловеческим приматом.

[0138] В конкретном варианте исполнения, способ нейтрализации как минимум приблизительно 90% IL-6 у субъекта включает (а) введение дозы нагрузки 100 мг анти-IL-6 антитела и (b) введение 50 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 4 недели. В
30 конкретном варианте исполнения, способ нейтрализации как минимум приблизительно 90% IL-6 у субъекта включает (а) введение дозы нагрузки 200 мг анти-IL-6 антитела и (b) введение 100 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 8 недель. В конкретном варианте исполнения, способ нейтрализации как минимум приблизительно 90% IL-6 у субъекта
35 включает (а) введение дозы нагрузки 400 мг анти-IL-6 антитела и (b) введение 200 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 12 недель. В конкретном варианте исполнения, способ поддержания как минимум 90% нейтрализации IL-6 у субъекта включает (а) введение дозы нагрузки 100 мг анти-IL-6 антитела и (b) введение 50 мг дозы анти-IL-6 антитела
40 каждые 4 недели. В конкретном варианте исполнения, способ поддержания как минимум 90% нейтрализации IL-6 у субъекта включает (а) введение дозы нагрузки 200 мг анти-IL-6 антитела и (b) введение 100 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 8 недель. В конкретном варианте исполнения, способ поддержания как минимум 90%
45 нейтрализации IL-6 у субъекта включает (а) введение дозы нагрузки 400 мг анти-IL-6 антитела и (b) введение 200 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 12 недель. В конкретном варианте исполнения, способ достижения непрерывной как минимум 90% нейтрализации IL-6 у субъекта включает (а) введение дозы нагрузки 100 мг анти-IL-6 антитела и (b) введение 50 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 4 недели. В конкретном варианте исполнения, способ достижения непрерывной как минимум 90% нейтрализации IL-6 у

субъекта включает (а) введение дозы нагрузки 200 мг анти-IL-6 антитела и (б) введение 100 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 8 недель. В конкретном варианте исполнения, способ достижения непрерывной как минимум 90% нейтрализации IL-6 у субъекта включает (а) введение дозы нагрузки 400 мг анти-IL-6 антитела и (б) введение 200 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 12 недель. Анти-IL-6 антитело может быть введено при помощи любого способа, известного из уровня техники, но, не ограничиваясь приведенным, посредством подкожной или внутривенной инъекции. Субъект может быть человеком или нечеловеческим приматом.

[0139] В одном варианте исполнения, способ ингибирования IL-6 опосредованной сигнализации у субъекта включает введение эффективной дозы анти-IL-6 антитела с пролонгированным периодом полувыведения. Введение эффективной дозы анти-IL-6 антитела может достигать как минимум приблизительно 20%, как минимум приблизительно 30%, как минимум приблизительно 40%, как минимум приблизительно 50%, как минимум приблизительно 60%, как минимум приблизительно 70%, как минимум приблизительно 80%, как минимум приблизительно 90%, как минимум приблизительно 95%, как минимум приблизительно 97%, как минимум приблизительно 99%, или как минимум приблизительно 100% ингибирования IL-6 опосредованной сигнализации. Эффективная доза может содержать 1 мг, 5 мг, 10 мг, 25 мг, 50 мг, 75 мг, 100 мг, 150 мг, 200 мг, 250 мг, 300 мг, 400 мг или 500 мг анти IL-6 антитела, описанного в данной заявке. Ингибирование IL-6 опосредованной сигнализации может продолжаться в течение как минимум приблизительно 1 дня, как минимум приблизительно 2 дней, как минимум приблизительно 3 дней, как минимум приблизительно 4 дней, как минимум приблизительно 5 дней, как минимум приблизительно 6 дней, как минимум приблизительно 7 дней, как минимум приблизительно 10 дней, как минимум приблизительно 15 дней, или как минимум приблизительно 20 дней. Субъект может быть человеком или нечеловеческим приматом. В конкретном варианте исполнения, способ ингибирования как минимум приблизительно 90% IL-6 опосредованной сигнализации у субъекта включает введение эффективной дозы 1 мг, 5 мг, 10 мг, 25 мг, 50 мг, 75 мг, 100 мг, 150 мг, 200 мг, 250 мг, 300 мг, 400 мг или 500 мг анти-IL-6 антитела с пролонгированным периодом полувыведения, где как минимум 90% ингибирование IL-6 опосредованной сигнализации продолжается в течение как минимум приблизительно 1 дня, как минимум приблизительно 2 дней, как минимум приблизительно 3 дней, как минимум приблизительно 4 дней, как минимум приблизительно 5 дней, как минимум приблизительно 6 дней, как минимум приблизительно 7 дней, как минимум приблизительно 10 дней, как минимум приблизительно 15 дней, или как минимум приблизительно 20 дней.

[0140] В одном варианте исполнения, способ ингибирования IL-6 опосредованной сигнализации у субъекта включает введение более чем одной дозы анти-IL-6 антитела с пролонгированным периодом полувыведения. Введение более чем одной дозы анти-IL-6 антитела может достигать как минимум приблизительно 20%, как минимум приблизительно 30%, как минимум приблизительно 40%, как минимум приблизительно 50%, как минимум приблизительно 60%, как минимум приблизительно 70%, как минимум приблизительно 80%, как минимум приблизительно 90%, как минимум приблизительно 95%, как минимум приблизительно 97%, как минимум приблизительно 99%, или как минимум приблизительно 100% ингибирования IL-6 опосредованной сигнализации. В одном варианте исполнения, способ поддерживания ингибирования IL-6 опосредованной сигнализации у субъекта включает введение более чем одной дозы анти-IL-6 антитела с пролонгированным периодом полувыведения. Введение более чем одной дозы анти-

IL-6 антитела может поддерживать как минимум приблизительно 20%, как минимум приблизительно 30%, как минимум приблизительно 40%, как минимум приблизительно 50%, как минимум приблизительно 60%, как минимум приблизительно 70%, как минимум приблизительно 80%, как минимум приблизительно 90%, как минимум приблизительно 95%, как минимум приблизительно 97%, как минимум приблизительно 99%, или как минимум приблизительно 100% ингибирования IL-6 опосредованной сигнализации. В одном варианте исполнения, способ достижения непрерывного ингибирования IL-6 опосредованной сигнализации у субъекта включает введение более чем одной дозы анти-IL-6 антитела с пролонгированным периодом полувыведения. Введение более чем одной дозы анти-IL-6 антитела может достигать непрерывного как минимум приблизительно 20%, как минимум приблизительно 30%, как минимум приблизительно 40%, как минимум приблизительно 50%, как минимум приблизительно 60%, как минимум приблизительно 70%, как минимум приблизительно 80%, как минимум приблизительно 90%, как минимум приблизительно 95%, как минимум приблизительно 97%, как минимум приблизительно 99%, или как минимум приблизительно 100% ингибирования IL-6 опосредованной сигнализации. В одном варианте исполнения, каждая более чем из одной дозы содержит то же самое количество анти-IL-6 антитела. Разовая доза может содержать 1 мг, 5 мг, 10 мг, 25 мг, 50 мг, 75 мг, 100 мг, 150 мг, 200 мг, 250 мг, 300 мг, 400 мг или 500 мг анти IL-6 антитела, описанного в данной заявке. В другом варианте исполнения, за начальной дозой нагрузки следуют последующие поддерживающие дозы. Начальная доза нагрузки может содержать в два, 3 раза, 4 раза, 5 раз, или в 10 раз больше анти-IL-6 антитела, чем поддерживающие дозы. В одном варианте исполнения, временной интервал, разделяющий дозы, является постоянным. Дозы анти-IL-6 антитела могут быть введены один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в три недели, один раз в четыре недели, один раз в восемь недель или один раз в двенадцать недель. Анти-IL-6 антитело может быть введено при помощи любого способа, известного из уровня техники, но, не ограничиваясь приведенным, посредством подкожной или внутривенной инъекции. Субъект может быть человеком или нечеловеческим приматом.

[0141] В конкретном варианте исполнения, способ ингибирования как минимум приблизительно 90% IL-6 опосредованной сигнализации у субъекта включает введение 50 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 4 недели. В конкретном варианте исполнения, способ ингибирования как минимум приблизительно 90% IL-6 опосредованной сигнализации у субъекта включает введение 100 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 8 недель. В конкретном варианте исполнения, способ ингибирования как минимум приблизительно 90% IL-6 опосредованной сигнализации у субъекта включает введение 200 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 12 недель. В конкретном варианте исполнения, способ поддержания как минимум 90% ингибирования IL-6 опосредованной сигнализации у субъекта включает введение 50 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 4 недели. В конкретном варианте исполнения, способ поддержания как минимум 90% ингибирования IL-6 опосредованной сигнализации у субъекта включает введение 100 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 8 недель. В конкретном варианте исполнения, способ поддержания как минимум 90% ингибирования IL-6 опосредованной сигнализации у субъекта включает введение 200 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 12 недель. В конкретном варианте исполнения, способ достижения непрерывного как минимум 90% ингибирования IL-6 опосредованной сигнализации у субъекта включает введение 50 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 4 недели. В конкретном варианте исполнения, способ достижения непрерывного как минимум 90% ингибирования IL-6

опосредованной сигнализации у субъекта включает введение 100 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 8 недель. В конкретном варианте исполнения, способ достижения непрерывного как минимум 90% ингибирования IL-6 опосредованной сигнализации у субъекта включает введение 200 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 12 недель. Анти-IL-6 антитело может быть введено при помощи любого способа, известного из уровня техники, но, не ограничиваясь приведенным, посредством подкожной или внутривенной инъекции. Субъект может быть человеком или нечеловеческим приматом.

[0142] В конкретном варианте исполнения, способ ингибирования как минимум приблизительно 90% IL-6 опосредованной сигнализации у субъекта включает (а) введение дозы нагрузки 100 мг анти-IL-6 антитела и (b) введение 50 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 4 недели. В конкретном варианте исполнения, способ ингибирования как минимум приблизительно 90% IL-6 опосредованной сигнализации у субъекта включает (а) введение дозы нагрузки 200 мг анти-IL-6 антитела и (b) введение 100 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 8 недель. В конкретном варианте исполнения, способ ингибирования как минимум приблизительно 90% IL-6 опосредованной сигнализации у субъекта включает (а) введение дозы нагрузки 400 мг анти-IL-6 антитела и (b) введение 200 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 12 недель. В конкретном варианте исполнения, способ поддержания как минимум 90% ингибирования IL-6 опосредованной сигнализации у субъекта включает (а) введение дозы нагрузки 100 мг анти-IL-6 антитела и (b) введение 50 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 4 недели. В конкретном варианте исполнения, способ поддержания как минимум 90% ингибирования IL-6 опосредованной сигнализации у субъекта включает (а) введение дозы нагрузки 200 мг анти-IL-6 антитела и (b) введение 100 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 8 недель. В конкретном варианте исполнения, способ поддержания как минимум 90% ингибирования IL-6 опосредованной сигнализации у субъекта включает (а) введение дозы нагрузки 400 мг анти-IL-6 антитела и (b) введение 200 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 12 недель. В конкретном варианте исполнения, способ достижения непрерывного как минимум 90% ингибирования IL-6 опосредованной сигнализации у субъекта включает (а) введение дозы нагрузки 100 мг анти-IL-6 антитела и (b) введение 50 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 4 недели. В конкретном варианте исполнения, способ достижения непрерывного как минимум 90% ингибирования IL-6 опосредованной сигнализации у субъекта включает (а) введение дозы нагрузки 200 мг анти-IL-6 антитела и (b) введение 100 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 8 недель. В конкретном варианте исполнения, способ достижения непрерывного как минимум 90% ингибирования IL-6 опосредованной сигнализации у субъекта включает (а) введение дозы нагрузки 400 мг анти-IL-6 антитела и (b) введение 200 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 12 недель. Анти-IL-6 антитело может быть введено при помощи любого способа, известного из уровня техники, но, не ограничиваясь приведенным, посредством подкожной или внутривенной инъекции. Субъект может быть человеком или нечеловеческим приматом.

[0143] В одном варианте исполнения, способ уменьшения роста синовиальных клеток у субъекта включает введение эффективной дозы анти-IL-6 антитела с пролонгированным периодом полувыведения. Введение эффективной дозы анти-IL-6 антитела может достигать как минимум приблизительно 20%, как минимум приблизительно 30%, как минимум приблизительно 40%, как минимум приблизительно 50%, как минимум приблизительно 60%, как минимум приблизительно 70%, как минимум приблизительно 80%, как минимум приблизительно 90%, как минимум приблизительно 95%, как минимум приблизительно 97%, как минимум приблизительно 99%, или как минимум приблизительно 100% уменьшения роста синовиальных клеток. Эффективная

доза может содержать 1 мг, 5 мг, 10 мг, 25 мг, 50 мг, 75 мг, 100 мг, 150 мг, 200 мг, 250 мг, 300 мг, 400 мг или 500 мг анти IL-6 антитела, описанного в данной заявке.

Уменьшение роста синовиальных клеток может продолжаться в течение как минимум приблизительно 1 дня, как минимум приблизительно 2 дней, как минимум

5 приблизительно 3 дней, как минимум приблизительно 4 дней, как минимум приблизительно 5 дней, как минимум приблизительно 6 дней, как минимум приблизительно 7 дней, как минимум приблизительно 10 дней, как минимум приблизительно 15 дней, или как минимум приблизительно 20 дней. Субъект может быть человеком или нечеловеческим приматом. В конкретном варианте исполнения, 10 способ уменьшения роста синовиальных клеток на как минимум приблизительно 90% у субъекта включает введение эффективной дозы 1 мг, 5 мг, 10 мг, 25 мг, 50 мг, 75 мг, 100 мг, 150 мг, 200 мг, 250 мг, 300 мг, 400 мг или 500 мг анти-IL-6 антитело с пролонгированным периодом полувыведения, где как минимум 90% уменьшения роста синовиальных клеток продолжается в течение как минимум приблизительно 1 дня, как 15 минимум приблизительно 2 дней, как минимум приблизительно 3 дней, как минимум приблизительно 4 дней, как минимум приблизительно 5 дней, как минимум приблизительно 6 дней, как минимум приблизительно 7 дней, как минимум приблизительно 10 дней, как минимум приблизительно 15 дней, или как минимум приблизительно 20 дней.

20 [0144] В одном варианте исполнения, способ уменьшения роста синовиальных клеток у субъекта включает введение более чем одной дозы анти-IL-6 антитела с пролонгированным периодом полувыведения. Введение более чем одной дозы анти-IL-6 антитела может достигать как минимум приблизительно 20%, как минимум приблизительно 30%, как минимум приблизительно 40%, как минимум приблизительно 50%, как минимум приблизительно 60%, как минимум приблизительно 70%, как минимум 25 приблизительно 80%, как минимум приблизительно 90%, как минимум приблизительно 95%, как минимум приблизительно 97%, как минимум приблизительно 99%, или как минимум приблизительно 100% уменьшения роста синовиальных клеток. В одном варианте исполнения, способ поддержания уменьшения роста синовиальных клеток 30 у субъекта включает введение более чем одной дозы анти-IL-6 антитела с пролонгированным периодом полувыведения. Введение более чем одной дозы анти-IL-6 антитела может поддерживать как минимум приблизительно 20%, как минимум приблизительно 30%, как минимум приблизительно 40%, как минимум приблизительно 50%, как минимум приблизительно 60%, как минимум приблизительно 70%, как минимум 35 приблизительно 80%, как минимум приблизительно 90%, как минимум приблизительно 95%, как минимум приблизительно 97%, как минимум приблизительно 99%, или как минимум приблизительно 100% уменьшения роста синовиальных клеток. В одном варианте исполнения, способ достижения непрерывного уменьшения роста синовиальных клеток у субъекта включает введение более чем одной дозы анти-IL-6 40 антитела с пролонгированным периодом полувыведения. Введение более чем одной дозы анти-IL-6 антитела может достигать непрерывного как минимум приблизительно 20%, как минимум приблизительно 30%, как минимум приблизительно 40%, как минимум приблизительно 50%, как минимум приблизительно 60%, как минимум приблизительно 70%, как минимум приблизительно 80%, как минимум приблизительно 90%, как минимум 45 приблизительно 95%, как минимум приблизительно 97%, как минимум приблизительно 99%, или как минимум приблизительно 100% уменьшения роста синовиальных клеток. В одном варианте исполнения, каждая более чем из одной дозы содержит то же самое количество анти-IL-6 антитела. Разовая доза может содержать 1 мг, 5 мг, 10 мг, 25 мг,

50 мг, 75 мг, 100 мг, 150 мг, 200 мг, 250 мг, 300 мг, 400 мг или 500 мг анти-IL-6 антитела, описанного в данной заявке. В другом варианте исполнения, за начальной дозой нагрузки следуют последующие поддерживающие дозы. Начальная доза нагрузки может содержать в два, 3 раза, 4 раза, 5 раз, или в 10 раз больше анти-IL-6 антитела, чем поддерживающие дозы. В одном варианте исполнения, временной интервал, разделяющий дозы, является постоянным. Дозы анти-IL-6 антитела могут быть введены один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в три недели, один раз в четыре недели, один раз в восемь недель или один раз в двенадцать недель. Анти-IL-6 антитело может быть введено при помощи любого способа, известного из уровня техники, но, не ограничиваясь приведенным, посредством подкожной или внутривенной инъекции. Субъект может быть человеком или нечеловеческим приматом.

[0145] В конкретном варианте исполнения, способ уменьшения роста синовиальных клеток на как минимум приблизительно 90% у субъекта включает введение 50 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 4 недели. В конкретном варианте исполнения, способ уменьшения роста синовиальных клеток на как минимум приблизительно 90% у субъекта включает введение 100 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 8 недель. В конкретном варианте исполнения, способ уменьшения роста синовиальных клеток на как минимум приблизительно 90% у субъекта включает введение 200 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 12 недель. В конкретном варианте исполнения, способ поддержания как минимум 90% уменьшения роста синовиальных клеток у субъекта включает введение 50 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 4 недели. В конкретном варианте исполнения, способ поддержания как минимум 90% уменьшения роста синовиальных клеток у субъекта включает введение 100 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 8 недель. В конкретном варианте исполнения, способ поддержания как минимум 90% уменьшения роста синовиальных клеток у субъекта включает введение 200 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 12 недель. В конкретном варианте исполнения, способ достижения непрерывного как минимум 90% уменьшения роста синовиальных клеток у субъекта включает введение 50 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 4 недели. В конкретном варианте исполнения, способ достижения непрерывного как минимум 90% уменьшения роста синовиальных клеток у субъекта включает введение 100 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 8 недель. В конкретном варианте исполнения, способ достижения непрерывного как минимум 90% уменьшения роста синовиальных клеток у субъекта включает введение 200 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 12 недель. Анти-IL-6 антитело может быть введено при помощи любого способа, известного из уровня техники, но, не ограничиваясь приведенным, посредством подкожной или внутривенной инъекции. Субъект может быть человеком или нечеловеческим приматом.

[0146] В конкретном варианте исполнения, способ уменьшения роста синовиальных клеток на как минимум приблизительно 90% у субъекта включает (а) введение дозы нагрузки 100 мг анти-IL-6 антитела и (b) введение 50 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 4 недели. В конкретном варианте исполнения, способ уменьшения роста синовиальных клеток на как минимум приблизительно 90% у субъекта включает (а) введение дозы нагрузки 200 мг анти-IL-6 антитела и (b) введение 100 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 8 недель. В конкретном варианте исполнения, способ уменьшения роста синовиальных клеток на как минимум приблизительно 90% у субъекта включает (а) введение дозы нагрузки 400 мг анти-IL-6 антитела и (b) введение 200 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 12 недель. В конкретном варианте исполнения, способ поддержания как минимум 90% уменьшения роста синовиальных клеток у субъекта включает (а) введение дозы нагрузки 100 мг анти-IL-6 антитела и (b) введение 50 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые

4 недели. В конкретном варианте исполнения, способ поддержания как минимум 90% уменьшения роста синовиальных клеток у субъекта включает (а) введение дозы нагрузки 200 мг анти-IL-6 антитела и (b) введение 100 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 8 недель. В конкретном варианте исполнения, способ поддержания как минимум 90% уменьшения роста синовиальных клеток у субъекта включает (а) введение дозы нагрузки 400 мг анти-IL-6 антитела и (b) введение 200 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 12 недель. В конкретном варианте исполнения, способ достижения непрерывного как минимум 90% уменьшения роста синовиальных клеток у субъекта включает (а) введение дозы нагрузки 100 мг анти-IL-6 антитела и (b) введение 50 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 4 недели. В конкретном варианте исполнения, способ достижения непрерывного как минимум 90% уменьшения роста синовиальных клеток у субъекта включает (а) введение дозы нагрузки 200 мг анти-IL-6 антитела и (b) введение 100 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 8 недель. В конкретном варианте исполнения, способ достижения непрерывного как минимум 90% уменьшения роста синовиальных клеток у субъекта включает (а) введение дозы нагрузки 400 мг анти-IL-6 антитела и (b) введение 200 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 12 недель. Анти-IL-6 антитело может быть введено при помощи любого способа, известного из уровня техники, например, но не ограничиваясь приведенным, посредством подкожной или внутривенной инъекции. Субъект может быть человеком или нечеловеческим приматом.

[0147] В одном варианте исполнения, способ уменьшения синовиального воспаления у субъекта включает введение эффективной дозы анти-IL-6 антитела с пролонгированным периодом полувыведения. Введение эффективной дозы анти-IL-6 антитела может достигать как минимум приблизительно 20%, как минимум приблизительно 30%, как минимум приблизительно 40%, как минимум приблизительно 50%, как минимум приблизительно 60%, как минимум приблизительно 70%, как минимум приблизительно 80%, как минимум приблизительно 90%, как минимум приблизительно 95%, как минимум приблизительно 97%, как минимум приблизительно 99%, или как минимум приблизительно 100% уменьшения синовиального воспаления. Эффективная доза может содержать 1 мг, 5 мг, 10 мг, 25 мг, 50 мг, 75 мг, 100 мг, 150 мг, 200 мг, 250 мг, 300 мг, 400 мг или 500 мг анти IL-6 антитела, описанного в данной заявке.

Уменьшение синовиального воспаления может продолжаться в течение как минимум приблизительно 1 дня, как минимум приблизительно 2 дней, как минимум приблизительно 3 дней, как минимум приблизительно 4 дней, как минимум приблизительно 5 дней, как минимум приблизительно 6 дней, как минимум приблизительно 7 дней, как минимум приблизительно 10 дней, как минимум приблизительно 15 дней, или как минимум приблизительно 20 дней. Субъект может быть человеком или нечеловеческим приматом. В конкретном варианте исполнения, способ уменьшения синовиального воспаления на как минимум приблизительно 90% у субъекта включает введение эффективной дозы 1 мг, 5 мг, 10 мг, 25 мг, 50 мг, 75 мг, 100 мг, 150 мг, 200 мг, 250 мг, 300 мг, 400 мг или 500 мг анти-IL-6 антитела с пролонгированным периодом полувыведения, где как минимум 90% уменьшения синовиального воспаления продолжается в течение как минимум приблизительно 1 дня, как минимум приблизительно 2 дней, как минимум приблизительно 3 дней, как минимум приблизительно 4 дней, как минимум приблизительно 5 дней, как минимум приблизительно 6 дней, как минимум приблизительно 7 дней, как минимум приблизительно 10 дней, как минимум приблизительно 15 дней, или как минимум приблизительно 20 дней.

[0148] В одном варианте исполнения, способ уменьшения синовиального воспаления

у субъекта включает введение более чем одной дозы анти-IL-6 антитела с пролонгированным периодом полувыведения. Введение более чем одной дозы анти-IL-6 антитела может достигать как минимум приблизительно 20%, как минимум приблизительно 30%, как минимум приблизительно 40%, как минимум приблизительно 50%, как минимум приблизительно 60%, как минимум приблизительно 70%, как минимум приблизительно 80%, как минимум приблизительно 90%, как минимум приблизительно 95%, как минимум приблизительно 97%, как минимум приблизительно 99%, или как минимум приблизительно 100% уменьшения синовиального воспаления. В одном варианте исполнения, способ поддержания уменьшения синовиального воспаления у субъекта включает введение более чем одной дозы анти-IL-6 антитела с пролонгированным периодом полувыведения. Введение более чем одной дозы анти-IL-6 антитела может поддерживать как минимум приблизительно 20%, как минимум приблизительно 30%, как минимум приблизительно 40%, как минимум приблизительно 50%, как минимум приблизительно 60%, как минимум приблизительно 70%, как минимум приблизительно 80%, как минимум приблизительно 90%, как минимум приблизительно 95%, как минимум приблизительно 97%, как минимум приблизительно 99%, или как минимум приблизительно 100% уменьшения синовиального воспаления. В одном варианте исполнения, способ достижения непрерывного уменьшения синовиального воспаления у субъекта включает введение более чем одной дозы анти-IL-6 антитела с пролонгированным периодом полувыведения. Введение более чем одной дозы анти-IL-6 антитела может достигать непрерывного как минимум приблизительно 20%, как минимум приблизительно 30%, как минимум приблизительно 40%, как минимум приблизительно 50%, как минимум приблизительно 60%, как минимум приблизительно 70%, как минимум приблизительно 80%, как минимум приблизительно 90%, как минимум приблизительно 95%, как минимум приблизительно 97%, как минимум приблизительно 99%, или как минимум приблизительно 100% уменьшения синовиального воспаления. В одном варианте исполнения, каждая более чем из одной дозы содержит то же самое количество анти-IL-6 антитела. Разовая доза может содержать 1 мг, 5 мг, 10 мг, 25 мг, 50 мг, 75 мг, 100 мг, 150 мг, 200 мг, 250 мг, 300 мг, 400 мг или 500 мг анти IL-6 антитела, описанного в данной заявке. В другом варианте исполнения, за начальной дозой нагрузки следуют последующие поддерживающие дозы. Начальная доза нагрузки может содержать в два, 3 раза, 4 раз, 5 раз, или 10 раз больше анти-IL-6 антитела, чем поддерживающие дозы. В одном варианте исполнения, временной интервал, разделяющий дозы, является постоянным. Дозы анти-IL-6 антитела могут быть введены один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в три недели, один раз в четыре недели, один раз в восемь недель или один раз в двенадцать недель. Анти-IL-6 антитело может быть введено при помощи любого способа, известного из уровня техники, но, не ограничиваясь приведенным, посредством подкожной или внутривенной инъекции. Субъект может быть человеком или нечеловеческим приматом.

[0149] В конкретном варианте исполнения, способ уменьшения синовиального воспаления на как минимум приблизительно 90% у субъекта включает введение 50 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 4 недели. В конкретном варианте исполнения, способ уменьшения синовиального воспаления на как минимум приблизительно 90% у субъекта включает введение 100 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 8 недель. В конкретном варианте исполнения, способ уменьшения синовиального воспаления на как минимум приблизительно 90% у субъекта включает введение 200 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 12 недель. В конкретном варианте исполнения, способ поддержания как минимум 90% уменьшения синовиального воспаления у субъекта включает введение

50 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 4 недели. В конкретном варианте исполнения, способ поддержания как минимум 90% уменьшения синовиального воспаления у субъекта включает введение 100 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 8 недель. В конкретном варианте исполнения, способ поддержания как минимум 90% уменьшения синовиального воспаления у субъекта включает введение 200 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 12 недель. В конкретном варианте исполнения, способ достижения непрерывного как минимум 90% уменьшения синовиального воспаления у субъекта включает введение 50 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 4 недели. В конкретном варианте исполнения, способ достижения непрерывного как минимум 90% уменьшения синовиального воспаления у субъекта включает введение 100 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 8 недель. В конкретном варианте исполнения, способ достижения непрерывного как минимум 90% уменьшения синовиального воспаления у субъекта включает введение 200 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 12 недель. Анти-IL-6 антитело может быть введено при помощи любого способа, известного из уровня техники, но, не ограничиваясь приведенным, посредством подкожной или внутривенной инъекции. Субъект может быть человеком или нечеловеческим приматом.

[0150] В конкретном варианте исполнения, способ уменьшения синовиального воспаления на как минимум приблизительно 90% у субъекта включает (а) введение дозы нагрузки 100 мг анти-IL-6 антитела и (b) введение 50 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 4 недели. В конкретном варианте исполнения, способ уменьшения синовиального воспаления на как минимум приблизительно 90% у субъекта включает (а) введение дозы нагрузки 200 мг анти-IL-6 антитела и (b) введение 100 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 8 недель. В конкретном варианте исполнения, способ уменьшения синовиального воспаления на как минимум приблизительно 90% у субъекта включает (а) введение дозы нагрузки 400 мг анти-IL-6 антитела и (b) введение 200 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 12 недель. В конкретном варианте исполнения, способ поддержания как минимум 90% уменьшения синовиального воспаления у субъекта включает (а) введение дозы нагрузки 100 мг анти-IL-6 антитела и (b) введение 50 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 4 недели. В конкретном варианте исполнения, способ поддержания как минимум 90% уменьшения синовиального воспаления у субъекта включает (а) введение дозы нагрузки 200 мг анти-IL-6 антитела и (b) введение 100 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 8 недель. В конкретном варианте исполнения, способ поддержания как минимум 90% уменьшения синовиального воспаления у субъекта включает (а) введение дозы нагрузки 400 мг анти-IL-6 антитела и (b) введение 200 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 12 недель. В конкретном варианте исполнения, способ достижения непрерывного как минимум 90% уменьшения синовиального воспаления у субъекта включает (а) введение дозы нагрузки 100 мг анти-IL-6 антитела и (b) введение 50 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 4 недели. В конкретном варианте исполнения, способ достижения непрерывного как минимум 90% уменьшения синовиального воспаления у субъекта включает (а) введение дозы нагрузки 200 мг анти-IL-6 антитела и (b) введение 100 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 8 недель. В конкретном варианте исполнения, способ достижения непрерывного как минимум 90% уменьшения синовиального воспаления у субъекта включает (а) введение дозы нагрузки 400 мг анти-IL-6 антитела и (b) введение 200 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 12 недель. Анти-IL-6 антитело может быть введено при помощи любого способа, известного из уровня техники, но, не ограничиваясь приведенным, посредством подкожной или внутривенной инъекции. Субъект может быть человеком или нечеловеческим приматом.

[0151] Дополнительные аспекты данного изобретения обеспечивают композиции,

содержащие агенты связывания в соответствии с данным изобретением, и их применение в способах связывания, ингибирования и/или нейтрализации IL-6, включая способы лечения человеческого или животного организма при помощи терапии.

[0152] Агенты связывания в соответствии с данным изобретением могут быть использованы в способе лечения или диагностики, таких способов лечения (что может включать профилактическое лечение) заболевания или расстройства человеческого или животного организма (например, у человеческого пациента), которые включают введение указанному пациенту эффективное количество агента связывания в соответствии с данным изобретением. Состояния, которые поддаются лечению в соответствии с данным изобретением, включают любые состояния, в которых задействовано IL-6, как подробно описано по всей данной заявке.

[0153] В одном варианте исполнения, способ лечения человека, который нуждается в этом, включает введение терапевтически эффективной дозы анти-IL-6 антитела с пролонгированным периодом полувыведения. В одном варианте исполнения, способ лечения ревматоидного артрита, ювенильного хронического артрита, ювенильного идиопатического артрита с системным началом, серонегативных спондилоартропатий (включая анкилозирующий спондилит, псориатический артрит и триаду Рейтера) псориаза или СКВ у человека включает введение терапевтически эффективной дозы анти-IL-6 антитела с пролонгированным периодом полувыведения. В конкретном варианте исполнения, способ лечения ревматоидного артрита у человека включает введение терапевтически эффективной дозы анти-IL-6 антитела с пролонгированным периодом полувыведения. В конкретном варианте исполнения, способу лечения воспалительного заболевания кишечника или СКВ у человека включает введение терапевтически эффективной дозы анти-IL-6 антитела с пролонгированным периодом полувыведения. В одном варианте исполнения, терапевтически эффективная доза может содержать 1 мг, 5 мг, 10 мг, 25 мг, 50 мг, 75 мг, 100 мг, 150 мг, 200 мг, 250 мг, 300 мг, 400 мг или 500 мг анти IL-6 антитела, описанного в данной заявке. В одном варианте исполнения, терапевтически эффективная доза может содержать приблизительно 0,1-5 мг/кг, приблизительно 0,1-2 мг/кг, приблизительно 0,1-1 мг/кг, приблизительно 0,3-2 мг/кг, приблизительно 0,3-1 мг/кг, приблизительно 0,5-2 мг/кг, или приблизительно 0,5-1 мг/кг анти-IL-6 антитела. В другом варианте исполнения, терапевтически эффективная доза может содержать приблизительно 20-500 мг, приблизительно 20-200 мг, приблизительно 20-100 мг, приблизительно 50-500 мг, приблизительно 50-200 мг, или приблизительно 50-100 мг анти-IL-6 антитела. Анти-IL-6 антитело может быть введено при помощи любого способа, известного из уровня техники, но, не ограничиваясь приведенным, посредством подкожной или внутривенной инъекции. В конкретном варианте исполнения, способ лечения ревматоидного артрита, воспалительного заболевания кишечника или СКВ у человека включает введение 1 мг, 5 мг, 10 мг, 25 мг, 50 мг, 75 мг, 100 мг, 150 мг, 200 мг, 250 мг, 300 мг, 400 мг или 500 мг анти-IL-6 антитела с пролонгированным периодом полувыведения. В конкретном варианте исполнения, способ лечения ревматоидного артрита, воспалительного заболевания кишечника или СКВ у человека включает введение приблизительно 0,1-5 мг/кг, приблизительно 0,1-2 мг/кг, приблизительно 0,1-1 мг/кг, приблизительно 0,3-2 мг/кг, приблизительно 0,3-1 мг/кг, приблизительно 0,5-2 мг/кг, или приблизительно 0,5-1 мг/кг анти-IL-6 антитела с пролонгированным периодом полувыведения. В конкретном варианте исполнения, способ лечения ревматоидного артрита, воспалительного заболевания кишечника или СКВ у человека включает введение приблизительно 20-500 мг, приблизительно 20-200 мг, приблизительно 20-100 мг, приблизительно 50-500 мг, приблизительно 50-200 мг,

или приблизительно 50-100 мг анти-IL-6 антитела с пролонгированным периодом полувыведения.

[0154] В одном варианте исполнения, способ лечения человека, который нуждается в этом, включает введение более чем одной дозы анти-IL-6 антитела с пролонгированным периодом полувыведения. В одном варианте исполнения, способ лечения ревматоидного артрита, ювенильного хронического артрита, ювенильного идиопатического артрита с системным началом, серонегативных спондилоартропатий (включая анкилозирующий спондилит, псориатический артрит и триаду Рейтера), псориаз или СКВ у человека включает введение более чем одной дозы анти-IL-6 антитела с пролонгированным периодом полувыведения. В конкретном варианте исполнения, способ лечения ревматоидного артрита, воспалительного заболевания кишечника или СКВ у человека включает введение более чем одной дозы анти-IL-6 антитела с пролонгированным периодом полувыведения. В одном варианте исполнения, каждая более чем из одной дозы содержит то же самое количество анти-IL-6 антитела. В одном варианте исполнения, разовая доза может содержать 1 мг, 5 мг, 10 мг, 25 мг, 50 мг, 75 мг, 100 мг, 150 мг, 200 мг, 250 мг, 300 мг, 400 мг или 500 мг анти IL-6 антитела, описанного в данной заявке. В одном варианте исполнения, разовая доза может содержать приблизительно 0,1-5 мг/кг, приблизительно 0,1-2 мг/кг, приблизительно 0,1-1 мг/кг, приблизительно 0,3-2 мг/кг, приблизительно 0,3-1 мг/кг, приблизительно 0,5-2 мг/кг, или приблизительно 0,5-1 мг/кг анти-IL-6 антитела. В другом варианте исполнения, разовая доза может содержать приблизительно 20-500 мг, приблизительно 20-200 мг, приблизительно 20-100 мг, приблизительно 50-500 мг, приблизительно 50-200 мг, или приблизительно 50-100 мг анти-IL-6 антитела. В одном варианте исполнения, каждая из более чем одной дозы содержит то же самое количество анти-IL-6 антитела. В одном варианте исполнения, за начальной дозой нагрузки следуют последующие поддерживающие дозы. В одном варианте исполнения, начальная доза нагрузки может содержать в два, 3 раза, 4 раза, 5 раз, или в 10 раз больше анти-IL-6 антитела, чем поддерживающие дозы. В одном варианте исполнения, доза нагрузки может содержать 1 мг, 5 мг, 10 мг, 25 мг, 50 мг, 75 мг, 100 мг, 150 мг, 200 мг, 250 мг, 300 мг, 400 мг или 500 мг анти IL-6 антитела, описанного в данной заявке. В одном варианте исполнения, доза нагрузки может содержать приблизительно 0,1-5 мг/кг, приблизительно 0,1-2 мг/кг, приблизительно 0,1-1 мг/кг, приблизительно 0,3-2 мг/кг, приблизительно 0,3-1 мг/кг, приблизительно 0,5-2 мг/кг, или приблизительно 0,5-1 мг/кг анти-IL-6 антитела. В другом варианте исполнения, доза нагрузки может содержать приблизительно 20-500 мг, приблизительно 20-200 мг, приблизительно 20-100 мг, приблизительно 50-500 мг, приблизительно 50-200 мг, или приблизительно 50-100 мг анти-IL-6 антитела. В одном варианте исполнения, временной интервал, разделяющий введение доз, является постоянным. Дозы анти-IL-6 антитела могут быть введены один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в три недели, один раз в четыре недели, один раз каждые восемь недель, один раз в двенадцать недель, один раз каждые шестнадцать недель или один раз каждые шесть месяцев. Анти-IL-6 антитело может быть введено при помощи любого способа, известного из уровня техники, но, не ограничиваясь приведенным, посредством подкожной или внутривенной инъекции.

[0155] В одном варианте исполнения, способ лечения человека, который нуждается в этом, включает введение 50 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 4 недели. В одном варианте исполнения, способ лечения человека, который нуждается в этом, включает введение 100 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 8 недель. В одном варианте исполнения, способ лечения человека, который нуждается в этом, включает введение 200 мг дозы

дозы анти-IL-6 антитела каждые 4 недели. В одном варианте исполнения, способ лечения ревматоидного артрита, воспалительного заболевания кишечника или СКВ у человека включает (а) введение дозы нагрузки 200 мг анти-IL-6 антитела и (b) введение 100 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 8 недель. В одном варианте исполнения, способ лечения ревматоидного артрита, воспалительного заболевания кишечника или СКВ у человека включает (а) введение дозы нагрузки 400 мг анти-IL-6 антитела и (b) введение 200 мг дозы анти-IL-6 антитела каждые 12 недель.

Анти-IL-6 антитела

[0158] Агент связывания в соответствии с данным изобретением, как было показано, нейтрализует IL-6 с высокой эффективностью. Нейтрализация означает ингибирование биологической активности IL-6. Агент связывания в соответствии с данным изобретением может нейтрализовать одну или более активностей IL-6. Ингибированная биологическая активность является типично IL-6 связыванием с одним или более его партнерами связывания. Например, ингибированная биологическая активность может быть связыванием IL-6 с трансмембранным и/или растворимым IL-6R α . Это может быть продемонстрировано в следующих анализах, которые кратко описаны в данном разделе и более подробно ниже: Анализ TF-1 демонстрирует, что агент связывания в соответствии с данным изобретением ингибирует IL-6 связывание с мембраной IL-6R α , поскольку TF-1 клетки не продуцируют растворимое IL-6R α . Как таковые, агенты связывания в соответствии с данным изобретением, поэтому ингибируют IL-6 связывание с мембранным рецептором. В анализе синовиальных фибробластов, агенты связывания в соответствии с данным изобретением ингибируют IL-6 связывание с растворимым IL-6R α , поскольку sIL-6R α необходимо добавлять в анализ для того, чтобы он работал. Добавленный IL-1 β индуцирует продуцирование эндогенного IL-6, который ингибируется агентом связывания в соответствии с данным изобретением и предотвращает продуцирование фактора роста эндотелия сосудов.

[0159] В соответствии с данным изобретением, связывание человеческого или нечеловеческого приматного, например, яванской макаки, IL-6 с IL-6R α может быть ингибировано, например, агент связывания может ингибировать связывание зрелого человеческого IL-6 с IL-6R α .

[0160] Ингибирование биологической активности может быть частичным или полным. Агент связывания может ингибировать IL-6 биологическую активность на 100%, или как минимум 95%, как минимум 90%, как минимум 85%, как минимум 80%, как минимум 75%, как минимум 70%, как минимум 60%, или как минимум 50% активности в отсутствие агента связывания.

[0161] Эффективность нейтрализации агента связывания может быть определена. Эффективность обычно выражают как значение IC₅₀, в нМ, если не указано иное. В функциональных анализах, IC₅₀ представляет собой концентрацию агента связывания, которая уменьшает биологический ответ на 50% от его максимума. В исследованиях лигандного связывания, IC₅₀ представляет собой концентрацию, которая уменьшает образование комплекса лиганд-рецептор на 50% максимального уровня специфического связывания. IC₅₀ может быть рассчитан путем нанесения на график % максимального биологического ответа как функции логарифма концентрации агента связывания и при помощи программного обеспечения, такого, как Prism (GraphPad) или Origin (Origin Labs) для подгонки сигмоидальной функции данных с получением значений IC₅₀. Эффективность может быть определена или измерена при помощи одного или более анализов, известных специалисту в данной области и/или как описано или указано в

данной заявке.

[0162] Нейтрализация IL-6 активности агентом связывания в анализе, описанном в данной заявке, например, анализе пролиферации TF-1 или других клеточных анализах, описанных ниже, указывает на то, что агент связывания связывается и нейтрализует IL-6. Другие способы, которые могут быть использованы для определения связывания агента связывания с IL-6, включают ELISA, Вестерн блоттинг, иммуноосаждение, аффинную хроматографию и биохимические анализы.

[0163] Агенты связывания, описанные в данной заявке, были продемонстрированы как связывающие и нейтрализующие биологические эффекты эндогенного человеческого IL-6, как показано в анализе, ингибирования высвобождающих факторы роста эндотелия сосудов из человеческих синовиальных фибробластов, в ответ на эндогенное человеческое IL-6, о чем сообщено в Примерах 1,7 и 2,7 в данной заявке. В данном анализе, синовиальные фибробласты от пациентов с ревматоидным артритом продуцируют IL-6 в ответ на стимуляцию и IL-1 β и растворимым IL-6Ra, приводя к IL-6 индуцированной экскреции фактора роста эндотелия сосудов. IL-6 продуцированное человеческими синовиальными фибробластами, таким образом, представляет собой эндогенное человеческое IL-6. Эндогенное IL-6 является молекулярной мишенью для медицинского лечения у людей, таким образом, нейтрализация эндогенного IL-6 является важным индикатором терапевтического потенциала агентов связывания. Поскольку анализы были проведены с синовиальными фибробластами, полученными от пациентов с ревматоидным артритом, результаты являются особенно релевантными для использования в качестве агентов связывания для лечения ревматоидного артрита. Эффективность нейтрализации оптимизированных молекул антитела анализировали в анализе высвобождения фактора роста эндотелия сосудов, превышающей эффективность нейтрализации известного анти IL-6 антитела CNTO-328.

[0164] Агент связывания в соответствии с данным изобретением может иметь IC₅₀ менее, чем 50 нМ, например, менее, чем 5 нМ, например, менее, чем 1 нМ в анализе ингибирования фактора роста эндотелия сосудов, высвобожденных из человеческих синовиальных фибробластов, стимулированных 0,6 пМ человеческим IL-1 β и 2,4 нМ растворимым человеческим IL-6Ra.

[0165] Как известно, эндогенный IL-6 является смесью гликозилированных и негликозилированных форм. Связывающие агента связывания в соответствии с данным изобретением с эндогенным IL-6 были продемонстрированы в анализе синовиальных фибробластов, в котором используют IL-6 из человеческих синовиальных фибробластов, т.е. эндогенное IL-6.

[0166] Агент связывания в соответствии с данным изобретением может ингибировать IL-6 индуцированную пролиферацию TF-1 клетки. TF-1 является человеческой премиемоидной клеточной линией, установленной от пациента с эритролейкемией (Kitamura et al. 1989). TF-1 клеточная линия требует присутствия фактора роста для выживания и пролиферации. Индивидуальные факторы роста TF-1 клетки, которые могут отвечать, включают IL-6, ГМКСФ и онкостатин М. Агент связывания в соответствии с данным изобретением может иметь IC₅₀ менее, чем 100 нМ, например, менее, чем 20 нМ, 10 нМ или 1 нМ, например, менее, чем 100 пМ, 70 пМ, 50 пМ, 40 пМ, 30 пМ, 20 пМ или 10 пМ, в анализе ингибирования пролиферации TF-1 клетки в ответ на 20 пМ человеческое IL-6. Как описано в данной заявке (см. Примеры 1,5), родительское IgG "CAN022D10" было показано как имеющее IC₅₀ в анализе пролиферации TF-1, составляющее приблизительно 93 нМ, и мы затем сгенерировали

оптимизированные варианты CAN022D10, имеющие в существенной степени повышенную эффективность (IC_{50} в общем менее, чем 100 пМ), как показано в Примерах 2,2, 2,5 и 2,6 (Таблицы 3, 4 и 5, соответственно). В особенности, IC_{50} значения для некоторых оптимизированных клонов, как измеряли, 5 пМ или менее, например для зародышевых IgG Антитела 7, Антитела 17 и Антитела 18, представляя собой

[0167] Агент связывания в соответствии с данным изобретением может ингибировать IL-6 вызванную пролиферацию B9 клетки. B9 клетки являются субклоном мышинной B-клеточной гибридомной клеточной линии, B13,29, выбранной исходя из их специфичного ответа на IL-6. B9 клетки требуют IL-6 для выживания и пролиферации и отвечают на очень низкие концентрации IL-6. Как таковая, пролиферация данных клеток в присутствии IL-6 антитела может быть оценена и определена аффинность антитела. Пример 2,10 в данной заявке демонстрирует, что Антитело 18 ингибировало клеточную B9 клеточную пролиферацию в ответ на IL-6, и демонстрировали высокую аффинность в данном анализе.

[0168] Продуцирование ауто-антител при ревматоидном артрите по большей части производится IgM классом. SKW6,4 является клональным IgM секретирующей человеческой лимфобластоидной B клеточной линией. После стимуляции IL-6 данные клетки секретируют IgM, таким образом, данный анализ рассматривали как релевантный при ревматоидном артрите. SKW6,4 клетки могут быть использованы в анализе для определения эффективности связывания компонентов в течение нейтрализации IL-6, путем определения ингибирования IgM экскреции в ответ на IL-6. Агент связывания в соответствии с данным изобретением может иметь IC_{50} менее, чем 10 пМ, например, менее, чем 5 пМ, в SKW6,4 клеточном анализе ингибирования IgM экскреции в ответ на 100 пМ человеческого IL-6. Антитело 18, как было показано, нейтрализует действие IL-6 в данном анализе - см. Пример 2,11 (Таблица 9).

[0169] Данное изобретение представляет высокоаффинные агенты связывания для человеческого IL-6. Высокая аффинность IL-6 из яванских макаков также была продемонстрирована. Агент связывания в соответствии с данным изобретением может связывать человеческое IL-6 и/или IL-6 яванских макаков с KD не более чем 1 нМ, например, не более чем 100 пМ, 50 пМ, 30 пМ или 10 пМ. KD может быть определено при помощи поверхностного плазмонного резонанса, например, BIAcore®. BIAcore® измерения аффинности описаны в данной заявке в Примере 2,9. Следует отметить, что аффинность антитела 7 и 18, как было найдено, находится вне пределов, измеримых с использованием устройства BIAcore®, что указывает на значение KD менее 10 пМ.

[0170] Как указано во всей данной заявке, поверхностный плазмонный резонанс включает пропускание аналита в жидкой фазе над лигандом, присоединенным к подложке, и определение связывания аналита и лиганда. Может быть, например, выполнен поверхностный плазмонный резонанс, где IL-6 пропускают в жидкой фазе над агентом связывания, присоединенным к подложке. Данные поверхностного плазмонного резонанса могут быть подогнаны к модели данных моновалентного аналита. Константа аффинности K_d может быть рассчитана из соотношения констант k_d/k_a , как определено при помощи поверхностного плазмонного резонанса при помощи модели данных моновалентного аналита.

[0171] Аффинность агента связывания для IL-6 может быть альтернативно рассчитана при помощи анализа по Шильд, например, исходя из анализа ингибирования TF-1 клеточной пролиферации в ответ на различные концентрации человеческого IL-6. Агент

связывания в соответствии с данным изобретением может иметь аффинность менее чем 10 пМ, например, менее чем 1 пМ, как рассчитано при помощи анализа по Шильд. Как сообщено в Примере 2,10 в данной заявке, аффинность Антитела 18 для человеческого IL-6 была рассчитана как 0,4 пМ с использованием анализа по Шильд.

[0172] Агент связывания в соответствии с данным изобретением может необязательно не реагировать перекрестно с одним или более, или со всеми, из следующих: фактор ингибирования лейкемии (ФИЛ), цилиарный нейротрофический фактор (ЦНТФ), IL-11 или онкостатин М.

[0173] Агент связывания в соответствии с данным изобретением может необязательно не реагировать перекрестно с крысиным IL-6, мышинным IL-6 и/или собачим IL-6.

[0174] Перекрестная реактивность агентов связывания для связывания других белков или нечеловеческого IL-6 может быть проанализирована, например, при помощи анализа флуоресценции с временным разрешением для ингибирования связывания человеческого IL-6 с агентом связывания, иммобилизованным на подложке, таким, как анализ конкурирования эпитопов DELFIA®, как описано в Примере 1,6. Например, любой или все из ФИЛ, ЦНТФ, IL-11, онкостатина М, крысиного IL-6 и мышинового IL-6 может проявлять не менее чем 50% ингибирования, или может иметь IC₅₀ более 0,5 мМ или более 1 мМ в анализе флуоресценции с временным разрешением для ингибирования и связывания меченого человеческого IL-6 с агентом связывания, иммобилизованным на подложке. Например, любой или все из ФИЛ, ЦНТФ, IL-11, онкостатина М, крысиного IL-6 и мышинового IL-6 может не проявлять ингибирования или может иметь IC₅₀ в как минимум 10- или 100-раза более чем немеченый человеческий IL-6 в анализе флуоресценции с временным разрешением для анализа перекрестной реактивности. В данном анализе, меченое зрелое человеческое IL-6 дикого типа используют при конечной концентрации K_d его взаимодействия с агентом связывания.

[0175] Агент связывания в соответствии с данным изобретением может перекрестно реагировать с IL-6 яванских макак. Перекрестная реактивность может быть определена как ингибирование связывания меченого человеческого IL-6 с агентом связывания, иммобилизованного на подложке в анализе флуоресценции с временным разрешением, описанном выше. Например, IL-6 яванских макак может иметь IC₅₀ менее чем 5 нМ, например, менее чем 2,5 нМ, например, приблизительно 1 нМ, в данном анализе флуоресценции с временным разрешением. IL-6 яванских макак может иметь IC₅₀ менее чем в 10 раз отличное, например, менее чем в 5 раз отличное, от IC₅₀ немеченого человеческого IL-6 в данном анализе.

[0176] В одном варианте исполнения, анти-IL-6 антитело связывает эпитоп на IL-6, который является консервированным человеческим и IL-6 яванских макак последовательности, и отличается от мышиной, крысиной и собачей IL-6 последовательности по сравнению с человеческой последовательностью.

[0177] В одном варианте исполнения, агент связывания связывает участок "сайта 1" IL-6, который представляет собой участок, который взаимодействует с IL-6R α . Агент связывания в соответствии с данным изобретением может таким образом конкурентно ингибировать IL-6 связывание с IL-6R α , таким образом нейтрализуя биологический эффект IL-6, которой опосредован через IL-6R α .

[0178] Агент связывания в соответствии с данным изобретением может связывать человеческое IL-6 при pHe102 и/или Ser204. Агент связывания в соответствии с данным изобретением может также связывать человеческое IL-6 при Arg207. Необязательно агент связывания может связывать боковые остатки или структурно соседние остатки

в молекуле IL-6, в дополнение связывания Phe102 и/или Ser 204. По договоренности, нумерация остатков соответствует полноразмерному человеческому IL-6 (SEQ ID NO: 15). Однако связывание может быть определено при помощи зрелого человеческого IL-6. Связывание с IL-6 остатками определяется сайт-направленным мутагенезом, как

5 объяснено ниже.
[0179] Мутагенез одинарных аминокислот участков белков для корреляции структуры с активностью хорошо известен специалисту в данной области и был использован для определения участков белка, которые связывают антитела (Lu et al., (2005) Biochemistry 44:11106-14). Связывание и/или нейтрализация мутантного человеческого IL-6 могут

10 быть использованы для оценки того, связывает ли агент связывания Phe102, Ser204 и/или Arg207. Отсутствие связывания или нейтрализации, или значительно уменьшенное связывание или нейтрализация, с мутантным IL-6 по сравнению с диким типом указывает на то, что агент связывания связывается с мутировавшим остатком.
[0180] Связывание с остатком в IL-6 может быть определено при помощи IL-6,

15 мутировавшего в выбранном остатке в анализе флуоресценции с временным разрешением ингибирования связывания меченого человеческого IL-6 дикого типа с агентом связывания, иммобилизованным на подложке, где меченое зрелое человеческое IL-6 дикого типа находится к конечной концентрации, равной i Kd его взаимодействия с агентом связывания. Если мутантное IL-6 не ингибирует связывание меченого IL-6

20 дикого типа с агентом связывания, или если мутантное IL-6 имеет IC_{50} более чем у немеченого IL-6 дикого типа (например, более чем в 10 раз или в 100 раз), это указывает на то, что мутированный остаток связан агентом связывания.

[0181] Агент связывания в соответствии с данным изобретением может необязательно не связывать и/или нейтрализовать мутантное человеческое IL-6, имеющее мутацию на

25 остатке Phe102, Ser204 и/или Arg207, например, мутацию Phe102Glu, Ser204Glu, Ser204Tyr и/или Arg207Glu.

[0182] Агент связывания в соответствии с данным изобретением может содержать молекулу антитела, например, молекулу человеческого антитела. Агент связывания обычно содержит VH и/или VL домен антитела. Компоненты связывания VH и VL

30 доменов также обеспечены как часть данного изобретения. Внутри каждого из VH и VL доменов находятся гипервариабельные участки, ("CDRs"), и каркасные участки, ("FRs"). VH домен содержит множество HCDRs, и VL домен содержит множество LCDRs. Молекула антитела может содержать VH домен антитела, содержащий VH CDR1, CDR2 и CDR3 и каркас. Он может альтернативно или также содержать VL домен антитела,

35 содержащий VL CDR1, CDR2 и CDR3 и каркас. Каркас VH или VL домена содержит четыре каркасных участка, FR1, FR2, FR3 и FR4, распределенных в CDRs в следующей структуре: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4.

[0183] Примеры VH и VL доменов антитела и CDRs в соответствии с данным изобретением являются такими, как перечислено в перечне последовательностей,

40 который входит в данное описание. Дополнительно CDRs описаны в публикации PCT № WO 2008/065378. Все VH и VL последовательности, CDR последовательности, множества CDRs и множества HCDRs и множества LCDRs, которые описаны в данной заявке и в публикации PCT № WO 2008/065378, представляют собой аспекты и варианты исполнения в соответствии с данным изобретением. Как описано в данной заявке,

45 "множество CDRs" содержит CDR1, CDR2 и CDR3. Таким образом, множество HCDRs относится к HCDR1, HCDR2 и HCDR3, и множество LCDRs относится к LCDR1, LCDR2 и LCDR3. Если не указано иное, "множество CDRs" включает HCDRs и LCDRs. Типично, агенты связывания в соответствии с данным изобретением являются моноклональными

антителами.

[0184] Агент связывания в соответствии с данным изобретением может содержать сайт связывания антигена в молекуле не-антитела, обычно обеспеченного одним или более CDRs например, множеством CDRs в клеточном каркасе не-антительного белка,

как дополнительно обсуждено ниже.

[0185] Как отмечено выше, агент связывания в соответствии с данным изобретением модулирует и может нейтрализовать биологическую активность IL-6. Как описано в данной заявке, IL-6-агенты связывания в соответствии с данным изобретением могут быть оптимизированы для эффективности нейтрализации. В общем, оптимизация эффективности включает мутацию последовательности выбранного агента связывания (обычно последовательности вариабельного домена антитела) с получением библиотеки агентов связывания, которые затем оценивают на предмет эффективности и выбирают более эффективные агенты связывания. Таким образом, выбранные "оптимизированные по эффективности" агенты связывания имеют тенденцию к тому, чтобы иметь более высокую эффективность, чем агент связывания, из которого была получена библиотека. Тем не менее, высокоэффективные агенты связывания могут быть также получены без оптимизации, например высокоэффективный агент связывания, может быть получен непосредственно из начального скрининга, например, анализа биохимической нейтрализации. "Оптимизированный по эффективности" агент связывания относится к агенту связывания с оптимизированной эффективностью нейтрализации конкретной активности или нижнего функционального IL-6. Анализы по эффективности более подробно описаны во всей данной заявке. Данное изобретение представляет как оптимизированные по эффективности, так и неоптимизированные агенты связывания, а также способы оптимизации эффективности из выбранного агента связывания. Данное изобретение, таким образом, позволяет специалисту в данной области получать агенты связывания с высокой эффективностью.

[0186] В дополнительном аспекте, данное изобретение представляет способ получения одного или более агентов связывания, способных к связыванию антигена, где способ включает контактирование агентов связывания библиотеки в соответствии с данным изобретением и указанного антигена, и выбор одного или более агентов связывания библиотеки, способных к связыванию указанного антигена.

[0187] Библиотека может быть визуализирована на частицах или молекулярных комплексах, например, реплицируемых генетических упаковках, таких, как частицы дрожжей, бактериальные или бактериофаговые (например, T7) частицы, вирусы, клетки или ковалентные, рибосомальные или другие *in vitro* системы отображения, где каждая частица или молекулярный комплекс содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую VH вариабельный домен антитела, отображаемый на нем, и необязательно также отображаемый VL домен, если он присутствует. Фаговый дисплей описан в WO 92/01047 и, например, патентах США US 5969108, US 5565332, US 5733743, US 5858657, US 5871907, US 5872215, US 5885793, US 5962255, US 6140471, US 6172197, US 6225447, US 6291650, US 6492160 и US 6521404, каждый, из которых, включен в данную заявку полностью путем ссылки.

[0188] После отбора агентов связывания, способных связывать антиген, и отображения на бактериофагах или других частицах или молекулярных комплексах библиотек, нуклеиновая кислота может быть взята из бактериофага или другой частицы или молекулярного комплекса, отображающего указанный выбранный агент связывания. Такая нуклеиновая кислота может быть использована в последующем продуцировании агента связывания или антительного VH или VL вариабельного домена

путем экспрессии из нуклеиновой кислоты с последовательностью нуклеиновой кислоты, взятой из бактериофага или другой частицы или молекулярного комплекса, отображающего указанный выбранный агент связывания.

[0189] Варианты VH и VL доменов и CDRs в соответствии с данным изобретением, включая те из них, для которых аминокислотные последовательности указаны в данной заявке и которые могут быть применены в агентах связывания в соответствии с данным изобретением, могут быть получены при помощи способов изменения или мутации последовательностей и скрининга для нахождения агентов связывания антигена с желаемыми характеристиками. Приемы желательных характеристик включают, не ограничиваясь приведенным:

- Повышенная аффинность связывания к антигену относительно известных антител, которые являются специфичными для данного антигена;

- Повышенная нейтрализация активности антигена относительно известных антител, которые являются специфичными для данного антигена, если его активность известна;

- Указанная конкурентоспособность по сравнению с известным антителом или лигандом, к антигену при конкретном молярном соотношении;

- Способность к иммуноосаждению комплекса;

- Способность связывать указанный эпитоп:

- о линейный эпитоп, например, пептидную последовательность, идентифицированную при помощи сканирования пептидного связывания, как описано в данной заявке, например, при помощи пептидов, которые подвергали скринингу в линейной и/или ограниченной конформации;

- о конформационный эпитоп, сформированный не-непрерывными остатками;

- Способность модулировать новую биологическую активность IL-6, или нижней молекулы.

Такие способы также обеспечены в данной заявке.

[0190] Варианты молекул антитела, описанные в данной заявке, могут быть получены и применены в данном изобретении. В соответствии с руководством по компьютерной химии по применению методов анализа мультивариантных данных к соотношениям структура/свойство (Wold, et al. Multivariate data analysis in chemistry. Chemometrics - Mathematics and Statistics in Chemistry (Ed.: B. Kowalski), D. Reidel Publishing Company, Dordrecht, Holland, 1984 (ISBN 90-277-1846-6)) могут быть получены антитела с количественными соотношениями активность-свойство при помощи хорошо известных математических методов, таких, как статическая регрессия, распознавание образцов и классификация (Norman et al. Applied Regression Analysis. Wiley-Interscience; 3rd edition (April 1998) ISBN: 0471170828; Kandel, Abraham & Backer, Eric. Computer-Assisted Reasoning in Cluster Analysis. Prentice Hall PTR, (May 11, 1995), ISBN: 0133418847; Krzanowski, Wojtek. Principles of Multivariate Analysis: A User's Perspective (Oxford Statistical Science Series, No 22 (Paper)). Oxford University Press; (December 2000), ISBN: 0198507089; Witten, Ian H. & Frank, Eibe. Data Mining: Practical Machine Learning Tools and Techniques with Java Implementations. Morgan Kaufmann; (October 11, 1999), ISBN: 1558605525; Denison David G.T. (Editor), Christopher C. Holmes, Bani K. Mallick, Adrian F.M. Smith. Bayesian Methods for Nonlinear Classification and Regression (Wiley Series in Probability and Statistics). John Wiley & Sons; (July 2002), ISBN: 0471490369; Ghose, Arup K. & Viswanadhan, Vellarkad N. Combinatorial Library Design and Evaluation Principles, Software, Tools, and applications in Drug Discovery. ISBN: 0-8247-0487-8). Свойства антител могут быть получены из эмпирических и теоретических моделей (например, анализа вероятно контактирующих остатков или рассчитанного физико-химического свойства) последовательности

антитела, функциональных и трехмерных структур, и данные свойства должны быть рассмотрены по отдельности и в комбинации.

[0191] Антительный сайт связывания антигена, состоящий из VH домена и VL домена, типично образован шестью петлями полипептида: три из варибельного домена (VL) легкой цепи и три из варибельного домена (VH) тяжелой цепи. Анализ антитела известной атомной структуры разъяснил взаимосвязь последовательности и сайтов сочетания трехмерной структуры антитела (Chothia C. et al. (1992) J. Molecular Biology 227, 799-817; Al-Lazikani, et al. (1997) J. Molecular Biology 273(4), 927-948). Такие взаимосвязи предполагают что, за исключением третьего участка (петли) в VH домене, петли сайтов связывания имеют один из небольшого количества конформаций основной цепи: канонические структуры. Канонические структуры, образованные в конкретной петле, были показаны как определяемые их размером и присутствием определенных остатков в ключевых сайтах, как в петле, так и в каркасном участке (Chothia C. et al. (1992) J. Molecular Biology 227, 799-817; Al-Lazikani, et al. (1997) J. Molecular Biology 273 (4), 927-948).

[0192] Такое исследование взаимосвязи последовательность-структура может быть применено для прогнозирования остатков в антителе известной последовательности, но неизвестной трехмерной структуры, что является важным при сохранении трехмерной структуры его CDR петель и поэтому сохранения специфичности связывания. Такие прогнозы могут быть основаны на сравнении прогнозов результатов основных экспериментов оптимизации. В структурном подходе может быть создана модель молекулы антитела (Chothia, et al. (1986) Science, 223, 755-758) при использовании любого бесплатного или коммерческого программного обеспечения, такого, как WAM (Whitelegg, N.R.u. & Rees, A.R (2000). Prot. Eng., 12, 815-824). Затем может быть использовано программное обеспечение анализа визуализации белков, такое, как Insight II (Accelrys, Inc.) или Deep View (Guex, N. and Peitsch, M.C. (1997) Electrophoresis 18, 2714-2723) для оценки возможных замещений в каждом положении в CDR. Эта информация может затем быть использована для получения замещений, которые, вероятно, имеют минимальное или благоприятное влияние на активность.

[0193] Методы, необходимые для получения замещений в аминокислотных последовательностях CDRs, антительных VH или VL доменах и агентах связывания, в общем, известны в данной области. Могут быть получены варианты последовательности, с замещениями, которые могут быть или могут не быть прогнозированы, как имеющие минимальное или благоприятное влияние на активность, и проанализированы на предмет способности связывать и/или нейтрализовать IL-6 и/или для получения другого желательного свойства.

[0194] Варианты аминокислотных последовательностей варибельного домена любого из VH и VL домена, последовательности, которых конкретно описаны в данной заявке, могут быть применены в соответствии с данным изобретением, как обсуждено.

[0195] Варианты VL домена в соответствии с данным изобретением, и агенты связывания или молекулы антитела, содержащие их, включают VL домены, в которых не присутствует аргинин, в остатке Kabat 108, например, если остаток Kabat 108 является другим остатком или удален. Например, молекула антитела, такая, как молекула антитела, в которой отсутствует константный домен, например, scFv, может содержать VL домен, содержащий последовательность VL домена или его вариант, как описано в данной заявке, в которой аргинин в остатке Kabat 108 аминокислотного остатка не является аргинином или удален.

[0196] Дополнительный аспект в соответствии с данным изобретением представляет

собой молекулу антитела, содержащую VH домен, имеющий как минимум 60, 70, 80, 85, 90, 95, 98 или 99% идентичности аминокислотной последовательности с VH доменом Антитела18, который приведен в перечне последовательностей, который прилагается, и/или содержит VL домен, имеющий как минимум 60, 70, 80, 85, 90, 95, 98 или 99% идентичности аминокислотной последовательности с VL доменом Антитела18, показанным в перечне последовательностей, который прилагается. Алгоритмы, которые могут быть использованы для расчета % идентичности двух аминокислотных последовательностей включают, например, BLAST (Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 405-410), FASTA (Pearson and Lipman (1988) PNAS USA 85: 2444-2448), или алгоритм Смита-Ватермана (Smith and Waterman (1981) J. Mol Biol. 147: 195-197), например, с применением параметров по умолчанию.

[0197] Конкретные варианты могут включать одно или более изменений аминокислотной последовательности (добавление, деление, замещение и/или инсерцию аминокислотного остатка).

[0198] Изменения могут быть произведены в одном или более каркасных участках и/или одном или более CDRs. Изменения обычно не приводят к утрате функции, таким образом, агент связывания, содержащий измененную аминокислотную последовательность, может сохранять способность к связыванию и/или нейтрализации IL-6. Он может сохранять ту же самую способность к количественному связыванию и/или нейтрализации в качестве агента связывания, в котором не было произведено изменение, например, как измерено в анализе описанного в данной заявке. Агент связывания, содержащий таким образом измененную аминокислотную последовательность, может иметь улучшенную способность связывания и/или нейтрализации IL-6.

[0199] Изменение может включать замену одного или более аминокислотного остатка на не встречающиеся в природе или нестандартные аминокислоты, модификацию одного или более аминокислотного остатка на не встречающуюся в природе или нестандартную форму, или инсерцию одной или более не встречающейся в природе или нестандартной аминокислоты на последовательность. Примеры номеров и положений изменений последовательности в соответствии с данным изобретением описаны по всей данной заявке. Встречающиеся в природе аминокислоты включают 20 "стандартных" 1-аминокислот, идентифицированных как G, A, V, L, I, M, P, F, W, S, T, N, Q, Y, C, K, R, H, D, E по их стандартным однобуквенным кодам. Нестандартные аминокислоты включают любой другой остаток, который может быть введен в полипептидный каркас или быть результатом модификации существующего аминокислотного остатка.

Нестандартные аминокислотами могут встречаться в природе или не встречаться в природе. Несколько встречающихся в природе нестандартных аминокислот известны в данной области, такие, как 4-гидроксипролин, 5-гидроксилизин, 3-метилгистидин, N-ацетилсерин, и т.д. (Voet & Voet, Biochemistry, 2nd Edition, (Wiley) 1995). Те аминокислотные остатки, которые дериватизованы в их N-альфа положении, будут расположены только на N-конце аминокислотной последовательности. Обычно в данном изобретении аминокислота представляет собой 1-аминокислоту, но она может быть d-аминокислотой. Изменение может, поэтому включать модификацию 1-аминокислоты в, или замену на, d-аминокислоту. Метилированные, ацетилированные и/или фосфорилированные формы аминокислот также известны, и аминокислоты в данном изобретении могут быть подвержены такой модификации.

[0200] Аминокислотные последовательности в доменах антител и агентах связывания в соответствии с данным изобретением могут содержать неприродные или

нестандартные аминокислоты, описанные выше. Нестандартные аминокислоты (например, d-аминокислоты) могут быть введены в аминокислотную последовательность во время синтеза, или путем модификации или замены "исходной" стандартной аминокислоты после синтеза аминокислотной последовательности.

5 [0201] Применение нестандартных и/или не встречающихся в природе аминокислот повышает структурное и функциональное разнообразие, и может таким образом увеличивать потенциал для достижения желательного IL-6-связывания и нейтрализующих свойств агента связывания в соответствии с данным изобретением. Дополнительно, d-аминокислоты и аналоги, как было показано, имеют различные фармакокинетические
10 профили по сравнению со стандартными L-аминокислотами, например из-за распада *in vivo* полипептидов, имеющих L-аминокислоты после введения животному, например, человеку, что означает, что d-аминокислоты являются преимущественными для некоторых применений *in vivo*.

[0202] Новые VH или VL участки, содержащие CDR-производные последовательности
15 в соответствии с данным изобретением могут быть получены при помощи рандомизованного мутагенеза одного или более выбранных VH и/или VL генов с получением мутаций внутри всего вариабельного домена. Такая методика описана в Gram et al. (Gram et al., (1992) PNAS USA 89:3576-3580), которые использовали ПЦР пониженной точности. В некоторых вариантах исполнения одно или два
20 аминокислотных замещений произведены внутри всего вариабельного домена или множества CDRs.

[0203] Другой способ, который может быть использован, является прямой мутагенез в CDR участки VH или VL генов. Такие методы описаны Barbas et al. (Barbas et al., (1994) PNAS USA 91:3809-3813) и Schier et al. (Schier et al., (1996) J. Mol. Biol. 263:551-567).

25 [0204] Все описанные выше методы известны как таковые из уровня техники и специалист в данной области сможет применить такие методы для обеспечения агентов связывания в соответствии с данным изобретением при помощи стандартной методологии в данной области.

[0205] Дополнительный аспект данного изобретения представляет способ получения
30 антительного сайта связывания антигена к IL-6, где способ включает обеспечение путем добавления, делеции, замещения или инсерции одной или более аминокислот в аминокислотной последовательности VH домена, указанных в данной заявке, где VH домен, который является вариантом аминокислотной последовательности VH домена, необязательно комбинируя VH домен, обеспеченный, таким образом, с одним или более
35 VL доменами, и анализ VH домена или VH/VL комбинации или комбинаций для идентификации агента связывания или антительного сайта связывания антигена для IL-6 и необязательно одним или более желательными свойствами, например, способностью нейтрализации IL-6 активности. Указанный VL домен может иметь аминокислотную последовательность, которая является незаменимой, как приведено
40 в данной заявке. Может быть применен аналогичный способ, в котором один или более вариантов последовательностей VL домена, описанных в данной заявке, комбинируют с одним или более VH доменами.

[0206] Как отмечено выше, CDR аминокислотная последовательность в существенной степени, как приведено в данной заявке, может быть произведена как CDR в
45 вариабельном домене человеческого антитела или в его большей части. HCDR3 последовательности в существенной степени, как приведено в данной заявке представляют варианты исполнения данного изобретения и каждая из них может быть произведена как HCDR3 в человеческой тяжелой цепи вариабельного домена или в его

большей части.

[0207] Вариабельные домены, примененные в данном изобретении, могут быть получены или дериватизованы от любой зародышевой линии или реарранжированного человеческого вариабельного домена, или могут быть синтетическим вариабельным доменом, исходя из консенсусной или фактической последовательности известного человеческого вариабельного домена. Вариабельный домен может быть дериватизован из нечеловеческого антитела. CDR последовательность в соответствии с данным изобретением (например, CDR3) может быть введена в спектр вариабельных доменов, у которых отсутствует CDR (например, CDR3), при помощи рекомбинантной ДНК технологии. Например, Marks et al. (Marks et al. (1992) Bio/Technology 10:779-783) описывают способы продуцирования спектров вариабельных доменов антител, в которых консенсусные праймеры, направленные на прилегающие к 5' концу области вариабельного домена используют в соединении с консенсусными праймерами к третьему каркасному участку генов человеческого VH для обеспечения спектра VH вариабельных доменов, у которых отсутствует CDR3. Marks et al. дополнительно описывают, каким образом такой спектр может быть скомбинирован с CDR3 конкретного антитела. Используя аналогичные методы, CDR3-дериватизованные последовательности в соответствии с данным изобретением могут быть перетасованы со спектрами VH или VL доменов, у которых отсутствует CDR3, и перетасованные полные VH или VL домены скомбинированы с родственным VL или VH доменом с обеспечением агентов связывания в соответствии с данным изобретением. Спектр может затем быть проявлен в приемлемой системе хозяина, например, в системе фагового дисплея в WO 92/01047, который включен полностью в данную заявку путем ссылки, или любого последующего большого тела, описанного в литературе, включая Kay, Winter & McCafferty (Kay, B.K., Winter, J., and McCafferty, J. (1996) Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual, San Diego: Academic Press), таким образом, что могут быть выбраны приемлемые агенты связывания. Спектр может состоять из любых индивидуальных компонентов выше, например как минимум 105, как минимум 106, как минимум 107, как минимум 108, как минимум 109 или как минимум 1010 компонентов или более. Другие приемлемые системы хозяев включают, не ограничиваясь приведенным, дрожжевой дисплей, бактериальный дисплей, T7 дисплей, вирусный дисплей, клеточный дисплей, рибосомный дисплей и ковалентный дисплей.

[0208] Обеспечен способ получения агента связывания IL-6 антигена, где способ включает:

- (а) обеспечение начального спектра нуклеиновых кислот, кодирующих VH домен, который содержит CDR3 для замещения или не содержит CDR3 кодирующий участок;
- (б) комбинирование указанного спектра с донорной нуклеиновой кислотой, кодирующей аминокислотную последовательность в существенной степени, как приведено в данной заявке для VH CDR3, таким образом, что указанная донорная нуклеиновая кислота вставлена в CDR3 участок в спектре, таким образом, чтобы обеспечить спектр продуктов нуклеиновых кислот, кодирующих VH домен;
- (в) экспрессию нуклеиновых кислот указанным спектром продуктов;
- (г) выбор агента связывания для IL-6;
- (д) восстановление указанного агента связывания или нуклеиновой кислоты, которая его кодирует.

[0209] Снова, может быть применен аналогичный способ, в котором VL CDR3 в соответствии с данным изобретением соединяют со спектром нуклеиновых кислот, кодирующих VL домен, который включает CDR3 для замещения или не содержит CDR3

кодирующий участок.

[0210] Аналогично, один или более, или все три CDRs могут быть привиты в спектр VH или VL доменов, которые подвергают скринингу на предмет агентов связывания или агентов связывания IL-6.

5 [0211] Аналогично, могут быть применены другие VH и VL домены, множества CDRs и множества HCDRs и/или множества LCDRs, описанные в данной заявке.

[0212] Существенная часть иммуноглобулинового варибельного домена может содержать как минимум три CDR участка, вместе с их промежуточными каркасными участками. Данная часть может также содержать как минимум приблизительно 50% 10 любого из или обоих из первого и четвертого каркасных участков, 50% являются С-концевыми 50% первого каркасного участка, и N-концевого 50% четвертого каркасного участка. Дополнительными остатками на N-конце или С-конце существенной части варибельного домена могут быть остатки, которые обычно связаны с встречающимися в природе участками варибельного домена. Например, конструирование компонентов 15 связывания в соответствии с данным изобретением, произведенное путем рекомбинантных ДНК методов, может привести к введению N-или С-концевых остатков, кодированных линкерами, введенными для способствования клонирования или других стадий манипуляций. Другие стадии манипуляций включают введение линкеров для присоединения варибельных доменов в соответствии с данным изобретением к 20 дополнительной белковой последовательности, включая константные участки антитела, другие варибельные домены (например при продуцировании диабоди) или детектируемые/функциональные метки, как более подробно обсуждено по всей данной заявке.

[0213] Хотя в некоторых аспектах в соответствии с данным изобретением, агенты 25 связывания содержат пару VH и VL доменов, одинарные домены связывания, основанные на VH или VL доменных последовательностях, образуют дополнительные аспекты в соответствии с данным изобретением. Известно, что одинарные иммуноглобулиновые домены, в особенности VH домены, способны связывать антитела-мишени особым образом. Например, см. обсуждение dAbs, приведенное выше.

30 [0214] В случае одинарного домена связывания, такие домены могут быть использованы для скрининга комплементарности доменов, способных образовывать двухдоменный агент связывания, способный к связыванию IL-6. Это может быть достигнуто при помощи способов скрининга фаговым дисплеем с использованием так называемого иерархического двойного комбинаторного подхода, описанного в WO 35 92/01047, который полностью включен в данную заявку путем ссылки, в которой индивидуальную колонию, содержащую клон Н или L цепи, используют для инфицирования полной библиотеки клонов, кодирующих другую цепь (L или Н) и полученный в результате двухцепочечный агент связывания выбирают в соответствии с методами фагового дисплея, например, описанными в данной ссылке. Данный метод 40 также описан в Marks et al., *ibid.* (Marks et al. (1992) *Bio/Technology* 10:779-783).

[0215] Агенты связывания в соответствии с данным изобретением могут дополнительно содержать константные участки антитела или их части, например, константные участки человеческого антитела, или их части. Например, VL домен может быть присоединен его С-концом к константному домену легкой цепи антитела, включая 45 человеческие Ск или Сл цепи. Аналогично, агент связывания на основе VH домена может быть присоединен своим С-концом ко всей или части (например, СH1 домену) иммуноглобулиновой тяжелой цепи, полученной из любого изотипа антитела, например, IgG, IgA, IgE и IgM и любого изотипного подкласса, в частности IgG1 и IgG4. IgG1

является преимущественным, ввиду его эффекторной функции и легкости получения. Любой синтетический вариант или вариант константного участка, имеющий такие свойства и стабилизирующий переменные участки, может быть также полезным в данном изобретении.

5 [0216] Агенты связывания в соответствии с данным изобретением могут быть мечены детектируемой или функциональной меткой. Таким образом, агент связывания или молекула антитела могут присутствовать в форме иммуноконъюгата так, чтобы получать детектируемый и/или определяемый количественно сигнал. Иммуноконъюгаты могут содержать молекулу антитела в соответствии с данным изобретением,
 10 конъюгированную с детектируемой или функциональной меткой. Меткой может быть любая молекула, которая продуцирует или может быть индуцирована для продуцирования сигнала, включая, но, не ограничиваясь такими, как: флуорофоры, радиоактивные метки, ферменты, хемилюминесцентные вещества или фотосенсибилизаторы. Таким образом, связывание может быть детектировано и/или
 15 измерено путем детекции флуоресценции или люминесценции, радиоактивности, ферментной активности или поглощения света.

[0217] Приемлемые метки включают, для иллюстрации и не для ограничения:

- ферменты, такие, как щелочные фосфатазы, глюкоза-6-фосфат дегидрогеназа ("G6PDH"), альфа-D-галактозидаза, глюкозооксидаза, глюкозоамилаза, карбоангидраза,
 20 ацетилхолинэстераза, лизоцим, малатдегидрогеназа и пероксидаза, например, пероксидаза хрена;

- красители;

- флуоресцентные метки, или флуорофоры, такие, как флуоресцеин и его производные, флуорохром, соединения и производные родамина, ЗФБ (ЗФБ означает "зеленый
 25 флуоресцентный белок"), dANCyI, умбелдиферон, фикоэритрин, фикоцианин, аллофикоцианин, о-фталальдегид и флуоресцамин; флуорофоры, такие, как криптаты и хелаты лантанидов например, европия и т.д. (Perkin Elmer and Cis Biointernational),

- хемилюминесцентные метки или хемилюминесцентные вещества, такие, как изолуминол, луминол и диокситаны;

30 - биолуминесцентные метки, например, люциферазу и люциферин;

- сенсибилизаторы;

- коферменты;

- ферментные субстраты;

- радиоактивные метки, включая, но, не ограничиваясь приведенным: бром 77,
 35 углерод 14, кобальт 57, фтор 8, галлий 67, галлий 68, водород 3 (тритий), индий 111, индий 113m, йод 123m, йод 125, йод 126, йод 131, йод 133, ртуть 107, ртуть 203, фосфор 32, рений 99m, рений 101, рений 105, рутений 95, рутений 97, рутений 103, рутений 105, скандий 47, селен 75, серу 35, технеций 99, технеций 99m, теллур 121m, теллур 122m, теллур 125m, тулий 165, тулий 167, тулий 168, иттрий 199 и другие радиоактивные метки,
 40 указанные в данной заявке;

- частицы, такие, как частицы латекса или углерода; золь металла; кристаллит; липосомы; клетки и т.д., которые могут быть дополнительно мечены красителем, катализатором или другой детектируемой группой;

- молекулы, например, биотин, дигоксигенин или 5-бромдезоксисуридин;

45 - фрагменты токсина, такие, как например, фрагмент токсина, выбранный из группы экзотоксин *Pseudomonas* (PE или его цитотоксический фрагмент или мутант), токсин дифтерии или его цитотоксический фрагмент или мутант, токсин ботулизма A, B, C, D, E или F, рицин или его цитотоксический фрагмент, например, рицин A, абрин или его

цитотоксический фрагмент, сапонин или его цитотоксический фрагмент, противовирусный токсин фитолакки или его цитотоксический фрагмент и бриодин 1 или его цитотоксический фрагмент.

[0218] Приемлемые токсины и коферменты описаны в Litman, et al., US 4275149, и
 5 Boguslaski, et al., US 4318980, каждый из которых полностью включен в данную заявку путем ссылки. Приемлемые флуорофоры и хемилюминесцентные вещества описаны в Litman, et al., US 4275149, которые полностью включены в данную заявку путем ссылки. Метки дополнительно включают химические фрагменты, такие, как биотин, который
 10 может быть детектирован путем связывания с конкретным родственным детектируемым фрагментом, например, меченым авидином или стрептавидином. Детектируемые метки могут быть присоединены к антителам в соответствии с данным изобретением при помощи стандартной химии, известной в данной области.

[0219] Иммуноконъюгаты или их функциональные фрагменты могут быть получены способами, известными специалистам в данной области. Они могут быть соединены с
 15 ферментами или флуоресцентными метками непосредственно или при помощи промежуточного звена в виде спейсерной группы или связывающей группы, такой, как полиальдегид, такой, как альдегид глутаровой кислоты, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТК), диэтилентриаминпентауксусная кислота (ДПА), или в присутствии агентов сочетания, таких, которые перечислены выше для терапевтических конъюгатов.
 20 Конъюгаты, содержащие метки флуоресценового типа, могут быть получены путем реакции с изоцианатом.

[0220] Способы, известные специалисту в данной области, существуют для сочетания терапевтических радиоизотопов и антитела непосредственно или при помощи
 хелатирующего агента, такого, как ЭДТК, ДТПК, указанных выше, и могут быть
 25 применены для радиоактивных элементов, которые могут применяться в диагностике. Аналогичным образом, можно провести метки натрия 125 по хлораминовому Т способу (Hunter W.M. and Greenwood F.C. (1962) Nature 194:495) или также с технеций 99m по методу Crockford et al., (US 4424200, который полностью включен в данную заявку путем ссылки) или присоединять при помощи ДТПК, как описано Hnatowich (US 4479930,
 30 который полностью включен в данную заявку путем ссылки).

[0221] Существуют многочисленные способы, при помощи которых метка может продуцировать сигнал, детектируемый внешними средствами, например, путем
 визуального осмотра, электромагнитного излучения, тепла и химических реактивов. Метка может быть также связана с другим агентом связывания, который связывает
 35 антитело в соответствии с данным изобретением, или подложку.

[0222] Метка может непосредственно продуцировать сигнал, и поэтому, для получения сигнала нет необходимости в дополнительных компонентах. Многочисленные органические молекулы, например, флуорофоры, способны поглощать
 ультрафиолетовый и видимый свет, где поглощение света переносит энергию в данные
 40 молекулы и переводит их в состояния повышенной энергии. Такая поглощенная энергия затем диссипируется путем эмиссии света при второй длине волны. Такая эмиссия второй длины волны может также переносить энергию в меченую акцепторную молекулу, и полученная в результате энергия диссипирует из акцепторной молекулы путем эмиссии света, например, резонансного переноса флуоресцентной энергии (РПЭФ).
 45 Другие метки, которые непосредственно продуцируют сигнал, включают радиоактивные изотопы и красители.

[0223] Альтернативно, метка может требовать другие компоненты для продуцирования сигнала, и система продуцирования сигнала будет затем содержать

все компоненты, необходимые для получения измеримого сигнала, которые могут включать подложки, коферменты, энхансеры, дополнительные ферменты, вещества, реагирующие с ферментными продуктами, катализаторы, активаторы, кофакторы, ингибиторы, ловушки, ионы металлов и специфично связывающие вещества, необходимые для связывания вещества, генерирующего сигнал. Подробное обсуждение приемлемых систем про индуцирующий сигнал, можно найти в Ullman, et al. US 5185243, каждое из которых полностью включено в данную заявку путем ссылки.

[0224] Данное изобретение представляет способ, включающий связывание агента связывания, обеспеченного в данной заявке, с IL-6. Как отмечено, такое связывание может происходить *in vivo*, например, после введения агента связывания, или нуклеиновой кислоты, кодирующей агент связывания, или может происходить *in vitro*, например, в анализе ELISA, вестерн-блоттинг, иммуноцитохимическом анализе, анализе иммуноосаждения, аффинной хроматографии и биохимическом или клеточном анализе, таких, как анализ TF-1 клеточной пролиферации.

[0225] Данное изобретение также представляет измерение уровней антигена непосредственно, путем применения агента связывания в соответствии с данным изобретением, например в биосенсорной системе. Например, данное изобретение включает способ детекции и/или измерения связывания с IL-6, включающий, (i) воздействие на указанный агент связывания IL-6 и (ii) детекцию связывания указанного агента связывания с IL-6, где связывание детектируют любым способом или при помощи детектируемой метки, описанной в данной заявке. Этот и любой другой способ детекции связывания, описанный в данной заявке, может быть интерпретирован непосредственно особой, реализующей данный способ, например, путем визуального наблюдения детектируемой метки. Альтернативно, данный способ или любой другой способ детекции связывания, описанный в данной заявке, может производить отчет в виде ауторадиографии, фотографии, компьютерной распечатки, проточного цитометрического отчета, графика, схемы, тестовой пробирки или контейнера, или ячейки, содержащей результат, или любого другого визуального или физического представления результата данного способа.

[0226] Количество связывания связывающего компоненты с IL-6 может быть определено. Количественное определение может относиться к количеству антигена в тестовой пробе, которая может представлять диагностический интерес. Скрининг IL-6 связывания и/или его количественное определение могут быть полезными, например, при скрининге пациентов на предмет заболеваний или расстройств, указанных в данной заявке, и/или любого другого заболевания или расстройства, включающих aberrantную IL-6 экспрессию и/или активность.

[0227] Диагностический способ в соответствии с данным изобретением может включать (i) получение пробы ткани или жидкости от субъекта, (ii) воздействие на указанную пробу ткани или жидкости одного или более агентов связывания в соответствии с данным изобретением; и (iii) детекцию связывания IL-6 по сравнению с контрольной пробой где увеличение количества IL-6 связывания по сравнению с контрольной пробой может указывать на aberrantный уровень экспрессии или активности IL-6. Пробы ткани или жидкости для анализа включают кровь, сыворотку, мочевину, материалы биопсии, опухоли, или любую ткань, которую подозревают в том, что она содержит aberrantные уровни IL-6. Субъекты, которых анализируют как позитивные для aberrantных уровней и активности IL-6 могут также иметь преимущества от способов лечения, описанных в данной заявке ниже.

[0228] Специалисты в данной области способны выбрать приемлемый режим

определения связывания агента связывания с антигеном в соответствии с их предпочтениями и общими знаниями, учитывая способы, описанные в данной заявке.

[0229] Радиоактивности компонентов связывания в пробе могут быть определены при помощи любых соответствующих средств. Радиоиммунологическое исследование (РИА) является одной из возможностей. Радиоактивно меченый антиген смешивают с немеченым антигеном (тестовой пробой) и позволяют связывать агент связывания. Связанный антиген физически отделяют от несвязанного антигена и определяют количество радиоактивного антигена, связанного с агентом связывания. Чем больше антигена находится в тестовой пробе, тем меньшее количество радиоактивного антигена будет связывать агент связывания. Анализ конкурентного связывания может быть также полезным для нерадиоактивного антигена, с использованием антигена или аналога, связанного с репортерной молекулой. Репортерная молекула представляет собой люминофор, фосфорный или лазерный краситель со спектрально выделенными характеристиками поглощения или испускания. Приемлемые люминофоры включают флуоресцеин, родамин, фикоэритрин и тexasский красный, и хелаты или криптаты лантанидов. Приемлемые хромогенные красители включают диаминобензидин.

[0230] Другие репортеры включают макромолекулярные коллоидные частицы или материалы на основе частиц, такие, как окрашенные, магнитные или парамагнитные, или биологически или химически активные агенты, которые могут непосредственно или опосредованно производить детектируемые сигналы для визуального наблюдения электроннодетектируемые или зарегистрированные иным образом. Такие молекулы могут быть ферментами, катализирующими реакции, которые разбивают или изменяют цвета или приводят к изменениям электрических свойств, например, они могут быть молекулярно возбуждаемыми, так, что электронные переходы между уровнями энергии приводят к характерным спектральным поглощениям или испусканиям. Они могут включать химические объекты, которые используют в соединении с биосенсорами. Могут быть применены системы детекции биотин/авидин или биотин/стрептавидин и щелочная фосфатаза.

[0231] Сигналы, генерируемые индивидуальными конъюгатами агент связывания-репортер, могут быть использованы для получения определяемых количественно абсолютных или относительных данных о связывании релевантного агент связывания в пробах (нормальных и тестовых).

[0232] В качестве аспекта данного изобретения также обеспечен набор, содержащий агент связывания в соответствии с любым аспектом или вариантом исполнения данного изобретения. В данном наборе, агент связывания может быть меченым для детекции его реакционной способности в пробе для определения, например, как дополнительно описано ниже. Дополнительно, агент связывания может быть, а может и не быть присоединен к твердой подложке. Компоненты набора являются в общем стерильными и содержатся в герметично закрытых виолах или других контейнерах. Наборы могут быть применены для диагностического анализа или в других способах, для которых агенты связывания являются полезными. Набор может содержать инструкции по применению компонентов способом, например, в соответствии с данным изобретением. Вспомогательные материалы для способствования или для того, чтобы позволить реализацию такого способа, могут быть включены в набор в соответствии с данным изобретением. Вспомогательные материалы включают второй отличный агент связывания, который связывается с первым агентом связывания и конъюгирован с детектируемой меткой (например, флуоресцентной меткой, радиоактивным изотопом или ферментом). Наборы на основе антител могут также содержать подложки для

проведения иммуноосаждения. Каждый компонент наборов, в общем, находится в собственном приемлемом контейнере. Таким образом, такие наборы содержат отдельные контейнеры, приемлемые для каждого агента связывания. Дополнительно, наборы могут содержать инструкции по выполнению анализа и способов интерпретации

и анализа данных, полученных в результате выполнения данного анализа.

[0233] Данное изобретение также представляет применение агента связывания, указанного выше, для измерения уровней антигена в конкурентном анализе, то есть способе измерения уровня антигена в пробе путем применения агента связывания, как обеспечено в данном изобретении, в конкурентном анализе. Это может быть в случаях, когда отсутствует необходимость в физическом разделении связанных антител от несвязанных антител. Связывание репортерной молекулы с агентом связывания, происходит таким образом, чтобы происходило физическое или оптическое изменение при связывании, что является одной возможностью. Репортерная молекула может непосредственно или опосредованно генерировать детектируемые сигналы, которые могут быть определены количественно. Связь репортерных молекул может быть непосредственной или опосредованной, ковалентной, например, посредством пептидной связи, или нековалентной. Связь посредством пептидной связи может быть результатом рекомбинантной экспрессии генной гибридизации, кодирующей антитело и репортерную молекулу.

[0234] В различных аспектах и вариантах исполнения, данное изобретение охватывает агент связывания, конкурирующий за связывание с IL-6 с любым агентом связывания, определенным в данной заявке, например, Антителом 18, например, в формате IgG1. Конкуренция агентов связывания может быть легко проанализирована *in vitro*, например путем метки конкретной репортерной молекулой с одним агентом связывания, который может быть детектирован в присутствии другого немеченого агента связывания (агентов связывания), позволяя идентификацию компонентов связывания, которые связывают один и тот же перекрывающийся эпитоп. Конкуренция может быть определена, например, путем использования ELISA, где IL-6 иммобилизуют на планшете и первый и теговый или меченый агент связывания вместе с одним или более нетеговым или немеченым агентом связывания добавляют к планшету. Присутствие нетегового агента связывания, конкурирующего с теговым агентом связывания, наблюдают путем уменьшения сигнала, испускаемого теговым агентом связывания.

[0235] Например, данное изобретение включает способ идентификации соединения, связывающего IL-6, включающий (i) иммобилизацию IL-6 на подложке, (ii) контактирование указанного IL-6 одновременно или поэтапно с, как минимум, одним теговым или меченым агентом связывания в соответствии с данным изобретением и одним или более нетеговым или немеченым тестовым связывающимся соединением, и (iii) идентификацию нового соединения, связывающего IL-6 путем наблюдаемого уменьшения количества связанного тега от тегового агента связывания. Такие способы могут быть реализованы высокоэффективным образом при помощи многолуночного или матричного формата. Такие анализы могут также быть произведены в растворе. См., например, U.S. 5,814,468, который включен полностью в данную заявку путем ссылки. Как описано выше, детекция связывания может быть интерпретирована непосредственно особой, реализующей данный способ, например, путем визуального наблюдения детектируемой метки, или уменьшения ее присутствия. Альтернативно, способы связывания в соответствии с данным изобретением могут производить отчет в форме ауторадиографии, фотографии, компьютерной распечатки, отчета проточной цитометрии, графика, схемы, тестовой пробирки, или контейнера, или ячейки,

содержащей результат, или другой визуальной или физической репрезентации результата данного способа.

[0236] Конкурентные анализы могут быть также применены при эпитопном картировании. В одном случае эпитопное картирование может быть использовано для 5 идентификации эпитопа, связанного IL-6 агентом связывания, который необязательно может иметь оптимизированные нейтрализующие и/или модулирующие характеристики. Такой эпитоп может быть линейным или конформационным. Конформационный эпитоп может содержать как минимум два различных IL-6, где указанные фрагменты 10 расположены вблизи друг от друга, если IL-6 пропускают в его третичной или четвертичной структуре с образованием конформационного эпитопа, который признают в качестве ингибитора IL-6, такого, как IL-6-агент связывания. При анализе конкуренции может быть применен пептидный фрагмент антигена, в особенности пептид, содержащий или в существенной степени состоящий из рассматриваемых эпитопов. Может быть 15 использован пептид, содержащий эпитопную последовательность плюс одну или более аминокислот на любом конце. Агенты связывания в соответствии с данным изобретением могут быть такими, что их связывание с антигеном ингибировано пептидом, содержащим или включающим данную последовательность.

[0237] Данное изобретение дополнительно представляет выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую агент связывания в соответствии с данным изобретением. 20 Нуклеиновая кислота может включать ДНК и/или РНК. В одном аспекте, данное изобретение представляет нуклеиновую кислоту, кодирующую CDR или множество CDRs, или VH домен, или VL домен, или антигеновый сайт связывания антигена, или молекулу антитела, например, scFv или IgG1, в соответствии с данным изобретением, как определено выше.

[0238] Данное изобретение также представляет конструкторы в форме плазмид, векторов, кассет транскрипции или экспрессии, которые содержат как минимум один 25 полинуклеотид, как указано выше.

[0239] Данное изобретение также представляет рекомбинантную клетку-хозяина, содержащую один или более конструкторов, как указано выше. Нуклеиновая кислота, 30 кодирующая любой CDR или множество CDRs или VH домен или VL домен или антигеновый сайт связывания антигена или молекулы антитела, например, scFv или IgG1, как обеспечено, сама по себе образует аспект данного изобретения, как способ продуцирования кодированного продукта, где способ включает экспрессию из кодирующей его нуклеиновой кислоты. Экспрессия может быть традиционно достигнута 35 путем культивирования в соответствующих условиях, где рекомбинантные клетки-хозяева содержат нуклеиновую кислоту. После продуцирования путем экспрессии VH или VL домен, или агент связывания может быть выделен и/или очищен при помощи любого приемлемого метода и затем применен в зависимости от ситуации.

[0240] Нуклеиновая кислота в соответствии с данным изобретением может содержать 40 ДНК или РНК и может быть полностью или частично синтетической. Ссылка на нуклеотидную последовательность, как приведено в данной заявке, охватывает ДНК молекулу с указанной последовательностью и охватывает молекулу РНК с указанной последовательностью, в которой U замещен на Т, если иное не следует из контекста.

[0241] Еще один дополнительный аспект представляет способ продуцирования VH 45 варибельного домена антитела, где способ включает индуцирование экспрессии кодирующих нуклеиновых кислот. Такой способ может включать культивирование клетки-хозяина в условиях продуцирования VH варибельного домена указанного антитела.

[0242] Аналогичные способы продуцирования VL вариабельного домена и агентов связывания, включающий VN и/или VL домен, обеспечен в качестве дополнительного аспекта данного изобретения.

[0243] Способ продуцирования может включать стадию выделения и/или очистки продукта. Способ продуцирования может включать составление продукта в композицию, содержащую как минимум один дополнительный компонент, такой, как фармацевтически приемлемый эксципиент.

[0244] Системы клонирования и экспрессии полипептида во множестве различных клеток-хозяев хорошо известны. Приемлемые клетки-хозяева включают бактерии, клетки млекопитающих, растительные клетки, гифомицеты, дрожжи и бакуловирусные системы и трансгенные растения и животные. Антитела и фрагменты антител экспрессирующие в прокариотических клетках хорошо известны из уровня техники.

Обзор приведен в **Plückthun (Plückthun** , A.

(1991) Bio/Technology 9: 545-551). Традиционным бактериальным хозяином является E. coli.

[0245] Экспрессия эукариотических клеток в культуре также доступна специалистам в данной области, как возможность для продуцирования агентов связывания (Chadd HE and Chamow SM (2001) Current Opinion in Biotechnology 12: 188-194; Andersen DC and Krurnen L (2002) Current Opinion in Biotechnology 13: 117; Larrick JW and Thomas DW (2001) Current Opinion in Biotechnology 12:411-418). Клеточные линии млекопитающих, доступные в данной области для экспрессии гетерологического полипептида включают клетки яичников китайских хомячков (ЯКХ), HeLa клетки, клетки почек новорожденных хомячков, меланомные клетки NS0 мыши, миеломные клетки YB2/0 крысы, клетки почек человеческих эмбрионов, клетки сетчатки человеческих эмбрионов и многие другие.

[0246] Могут быть выбраны или сконструированы приемлемые векторы, содержащие соответствующие регуляторные последовательности, включая промоторные последовательности, терминаторные последовательности, последовательности полиаденилирования, энхансерные последовательности, маркерные гены и другие последовательности, в зависимости от ситуации. Векторами могут быть плазмиды, например, фагмиды, или вирусный, например, 'фаг, в зависимости от ситуации (Sambrook and Russell, Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 3rd edition, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press). Многие известные способы и протоколы манипуляций с нуклеиновыми кислотами, например при получении конструкторов нуклеиновых кислот, мутагенеза, секвенирования, введения ДНК в клетки и генной экспрессии и анализа белков, подробно описаны в Ausubel et al. (Ausubel et al. eds., Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 4th edition 1999).

[0247] Дополнительный аспект данного изобретения представляет клетку-хозяина, содержащую нуклеиновую кислоту, как описано в данной заявке. Такая клетка-хозяин может быть in vitro и может быть в культуре. Такая клетка-хозяин может быть in vivo. In vivo присутствие клетки-хозяина может позволить внутриклеточную экспрессию агента связывания в соответствии с данным изобретением как "интрабоди" или внутриклеточные антитела. Интрабоди могут быть использованы для генной терапии.

[0248] Еще один дополнительный аспект представляет способ, включающий введение нуклеиновой кислоты в соответствии с данным изобретением в клетку-хозяин. Введение

может задействовать любую доступную методику. Для эукариотических клеток, приемлемые методики могут включать трансфекцию фосфата кальция, диэтиламиноэтилдекстран, электропорацию, липосомно-опосредованную трансфекцию и передачу сигналов с использованием ретровируса или другого вируса, например, вакцин или, для инертных клеток, бакуловируса. Введение нуклеиновой кислоты в клетку-хозяин, в частности, эукариотическую клетку, может использовать вирусную или плазмидную систему. Плазмидная система может быть сохранена эписомально или может быть включена в клетку-хозяина или в искусственные хромосомы. Введение может быть рандомизованной или направленной интеграцией одной или более копий в одном или более местах. Для бактериальных клеток, приемлемые методы могут включать трансформацию хлорида кальция, электропорацию и трансфекцию при помощи бактериофага.

[0249] За введением может следовать индуцирование или разрешение экспрессии из нуклеиновой кислоты, например, путем культивирования клетки-хозяина в условиях экспрессии гена. Очистка экспрессированного продукта может быть достигнута способами, известными специалисту в данной области.

[0250] Нуклеиновая кислота в соответствии с данным изобретением может быть интегрирована в геном (например, хромосом) клетки-хозяина. Интеграция может быть промодутирована путем включения последовательности, которая промодутирует рекомбинацию с геномом, в соответствии со стандартным методом.

[0251] Данное изобретение также представляет способ, включающий применение конструкта, как указано выше, в системе экспрессии для экспрессии агента связывания или полипептида, как указано выше.

[0252] Существует свидетельство участия IL-6 в различных расстройствах, как обсуждено во всей данной заявке. Агенты связывания в соответствии с данным изобретением могут, поэтому быть применены в способе диагностики или лечения расстройства, связанного с IL-6. Такое расстройство может быть, например, воспалительным и/или аутоиммунным расстройством, таким, как, например, ревматоидный артрит, остеоартрит, кахексия, хроническое обструктивное легочное заболевание (ХОБЛ), ювенильный идиопатический артрит, астма, системной красной волчанки, воспалительное заболевание кишечника, болезнь Хрона или атеросклероз. Агент связывания в соответствии с данным изобретением может быть также, применен для лечения такого расстройства, как опухоль и/или рак. Дополнительно, агент связывания в соответствии с данным изобретением может быть использован для лечения и/или профилактики боли, возникающей в результате или связанной с заболеваниями или состояниями, указанными в данной заявке. Агент связывания в соответствии с данным изобретением может быть также применен в способе диагностики или лечения как минимум одного связанного с IL-6 заболевания, у пациента, животного, органа, ткани или клетки, включая, но не ограничиваясь приведенным: обструктивные заболевания дыхательных путей, включая хроническое обструктивное легочное заболевание (ХОБЛ); астму, такую, как бронхиальная, аллергическая, врожденная, наружная астма или астма на пыль, в частности хроническая или застарелая астма (например, поздняя астма и гипервосприимчивость дыхательных путей); бронхит; острый-, аллергический-, атрофический ринит и хронический ринит, включая вазомоторный ринит с казеозными пробками, гипертрофический ринит, гнойный ринит, сухой ринит и медикаментозный ринит; оболочечный ринит, включая крупозный, фиброзный и псевдооболочечный ринит и скрофулезный ринит; сезонный ринит, включая нейрогенный ринит (сенную лихорадку) и вазомоторный ринит, синусит,

интерстициальный фиброз легких (ИФЛ); саркоидоз, аллергический альвеолит у сельскохозяйственных рабочих и родственные заболевания, синдром острой дыхательной недостаточности у взрослых, пневмония гиперчувствительности, пневмосклероз и идиопатическую интерстициальную пневмонию; ревматоидный артрит, ювенильный хронический артрит, ювенильный идиопатический артрит с системным началом, серонегативную спондилоартропатию, включая анкилозирующий спондилит, псориатический артрит и триаду Рейтера), синдром Бехчета, синдром Шегрена и системный склероз, подагру, остеопороз и остеоартрит; псориаз, атопический дерматит, контактный дерматит и другие экзематозные дерматозы, аллергический контактный дерматит, себорейный дерматит, красный плоский лишай, склеродерму, пемфигус, буллезный пемфигоид, буллезный эпидермоз, крапивницу, ангиобласты, васкулиты, эритемы, кожные эозинофилии, увеиты, очаговую алопецию, аллергический конъюнктивит и вернальвермальный конъюнктивит;

язву желудка (желудочно-кишечного тракта), целиакию, проктит, эозинофильный гастроэнтерит, мастоцит, воспалительное заболевание кишечника, болезнь Хрона, язвенный колит, антифосфолипидный синдром)), пищевые аллергии, которые имеют воздействия, удаленные от кишки, например, мигрень, ринит и экзема; кахексию, рассеянный склероз, атеросклероз, синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД), мезенгиальный пролиферативный гломерулонефрит, нефротический синдром, нефрит, гломерулонефрит, острую почечную недостаточность, гемодиализ, уремию, локализованную или дискоидную красную волчанку, системную красную волчанку, болезнь Кастлемана, тиреоидит Хашимото, миастению гравис, диабет I типа, инсулинрезистентный диабет типа В, серповидно-клеточную анемию, иридоциклит/ увеит/оптический неврит, нефритический синдром, эозинофильный фасцит, гипер IgE синдром, системный васкулит/гранулематоз Вегенера, орхит/процедуры реверсивной вазэктомии, лепроматозная лепра, алкогольный гепатит, ретикулез Сезари и идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура; послеоперационные спайки, нефроз, синдром системной воспалительной реакции, сепсисный синдром, грампозитивный сепсис, грамотригательный сепсис, культурно-отрицательный сепсис, грибковый сепсис, нейтропеническую лихорадку, острый панкреатит, уросепсис, диффузный токсический зоб, болезнь Рейно, антитело-опосредованную цитотоксичность, реакции гиперчувствительности типа III, синдром Кроу-Фукаса (полинейропатию, органомегалию, эндокринопатию, моноклональную гаммопатию и синдром изменений кожи), смешанное поражение соединительной ткани, идиопатическую бронзовую болезнь, сахарный диабет, хронический активный гепатит, первичный билиарный синдром, витилиго, синдром после инфаркта миокарда (кардиотомический синдром), гиперчувствительность типа IV, гранулемы, вызванные внутриклеточными организмами, болезнь Вильсона, гемохроматоз, дефицит альфа-I-антитрипсина, диабетическая ретинопатия, тиреоидит Хашимото, оценку гипоталамо-гипофизарной-адренальной оси, тиреоидит, энцефаломиелит, хроническое легочное заболевание новорожденных, наследственный гематофагоцитарный лимфогистоцитоз, алопецию, лучевую терапию (например, включая, но, не ограничиваясь приведенным, астению, анемию, кахексию и т.п.), хроническую салицилатную интоксикацию, приступы апноэ во сне, ожирение, сердечную недостаточность и менингококкемию; острые и хронические заболевания после, например, трансплантации почек, сердца, печени, легкого, поджелудочной железы, костного мозга, кости, тонкой кишки, кожи, хряща и роговой оболочки; и хроническое заболевание «трансплантат против хозяина»; лейкемию, острую лимфобластную лейкемию (ALL), острую лейкемию, Т-клеточную, В-клеточную или FAB (по франко-

американской классификации) острую лимфоцитарную лейкемию, хроническую миелоцитарную лейкемию (ХМЛ), острую миелоидную лейкемию (ОМЛ), хроническую лимфоцитарную лейкемию (ХЛЛ), лейкемию волосатых клеток, миелодиспластический синдром (МДС), любую лимфому, заболевание Ходжкина, не-ходжкинскую лимфому, любую злокачественную лимфому, лимфому Буркитта, множественную миелому, саркому Капоши, почечно-клеточный рак, колоректальную карциному, карциному простаты, карциному поджелудочной железы, назофарингеальную карциному, злокачественный гистиоцитоз, паранеопластический синдром/злокачественную гиперкальцемию, солидные опухоли, аденокарциномы, саркомы, злокачественную меланому, гемангиому, метастатическое заболевание, резорбцию костей, связанную с раком, костную боль, связанную с раком; подавление раковых метастаз; улучшение раковой кахексии; кистозный фиброз, инсульт, реперфузионное поражение сердца, мозга, периферийных конечностей и других органов; ожоговые раны, травму/кровоизлияние, воздействие ионизирующего излучения, хронические язвы кожи; заболевания репродуктивных органов (например, расстройств овуляции, менструации и имплантации, преждевременные роды, преэклампсию, эндометриоз); острую или хроническую бактериальную инфекцию, острые или хронические паразитарные или инфекционные процессы, включая бактериальные, вирусные и грибковые инфекции, ВИЧ инфекцию/ВИЧ нейропатию, менингит, гепатит (А, В или С, или другой вирусный гепатит т.п.), септический артрит, перитонит, пневмонию, эпиглоттит, *e. coli* 0157:h7, гемолитический уретический синдром/тромботическую тромбоцитопеническую пурпуру, малярию, гемморагическую форму лихорадки Денге, лейшманиоз, проказу, синдром токсического шока, стрептококковый миозит, газовую гангрену, микобактерию туберкулеза, комплекс *Mycobacterium avium*, пневмония пневмоциста Каринии, воспалительное заболевание тазовых органов, орхит/эпидидимит, легионеллу, болезнь Лайма, грипп А, вирус Эпштейна-Барр, связанный с жизненно важными органами гемафагоцитарный синдром, вирусный энцефалит/асептический менингит, депрессию и т.п. Соответственно, данное изобретение представляет способ лечения расстройства, связанного с IL-6, включающий введение пациенту, который нуждается в этом, эффективного количества одного или более агентов связывания в соответствии с данным изобретением отдельно или в режиме комбинационной терапии с другим соответствующим медикаментом, известным из уровня техники или описанным в данной заявке.

[0253] В одном варианте исполнения, расстройством, связанным с IL-6, является депрессия - также, указанная в данной заявке, как глубокое депрессивное расстройство. Глубокое депрессивное расстройство (также известное, как и указанное, в данной заявке, как клиническая депрессия, глубокая депрессия, монополярная депрессия, или монополярное расстройство) представляет собой психическое расстройство, характеризующееся охватывающим все пониженным настроением, сопровождающимся низкой самооценкой и потерей интереса или удовольствия от активности, обычно приносящей удовольствие. Термин "глубокое депрессивное расстройство" был выбран Американской Психиатрической Ассоциацией для обозначения данного кластера симптомов как расстройства настроения в версии классификации от 1980 г. Диагностико-статистического руководства по психическим расстройствам (ДСР-III) и с тех пор стало широко используемым. Общий термин «депрессия» часто используют для обозначения данного расстройства, но он может быть также использован для ссылки на другие типы физиологической депрессии, более точная терминология является преимущественной для расстройства при клиническом и исследовательском применении. Глубокая депрессия

является состоянием, лишаящим трудоспособности. Она неблагоприятно влияет на членов семейства, работу и учебу, сон и пищевые привычки и общее состояние здоровья.

[0254] Депрессия часто сопутствует заболеваниям, включающим системное воспаление. Системное воспаление наблюдают у многих пациентов с депрессией, что
5 выражено повышенными уровнями биомаркеров воспаления в плазме. Дополнительно, активированные маршруты цитокиновых сигналов могут быть детектированы в крови и коинестимулирующего фактора пациентов с депрессией. Дополнительно, цитокины (IFN- α , IL-2) могут вызывать симптомы глубоких депрессивных расстройства у
10 медицински больных пациентов, не имеющих психиатрических заболеваний в анамнезе. Соответственно, данное изобретение представляет способ лечения депрессии, включающий введение пациенту, который нуждается в этом, эффективного количества одного или более агентов связывания в соответствии с данным изобретением отдельно
или в режиме комбинационной терапии с другим соответствующим медикаментом, известным из уровня техники, например, антидепрессантом, таким, как селективные
15 ингибиторы обратного захвата серотонина (СИПЗС), таким, как сертралин, эсциталопрам, флуоксетин, пароксетин и питалопрам; или описанным в данной заявке.

[0255] Агенты связывания в соответствии с данным изобретением также имеют анальгетические свойства. Как таковые, они пригодны в качестве анальгетиков для
лечения и/или профилактики боли, связанной с заболеваниями, приведенными в данной
20 заявке, а также хронической и острой боли, которая возникает в результате или связана с ранами, медицинскими процедурами, хирургическими вмешательствами, поражениями, травмой и т.д. Например, агенты связывания могут быть использованы в качестве
облегчителей боли - анальгетиков после хирургических вмешательств. Они могут быть
также применены для лечения или профилактики боли, связанной с анкилозирующим
25 спондилитом, воспалительным люмбаго, нейропатической болью, болезненной невомой, фибромиалгией, головными болями, например, хроническими головными болями и мигренями, панкреатитом, синдромами сдавливания спинномозгового нерва и не-
злокачественной скелетной болью, воспалительной остеоартритной болью, болью,
вызванной ревматоидным артритом, болью, вызванной раком, например, болью,
30 вызванной раком кости.

[0256] Агенты связывания в соответствии с данным изобретением также могут быть
использованы для лечения легочной гипертензии, связанной с несколькими
заболеваниями, такими, как, но, не ограничиваясь приведенным, ХОБЛ, склеродерма,
системная красная волчанка, синдромы Кроу-Фукаса, а также идиотипическая легочная
35 гипертензия. Повышенные IL-6 уровни были сообщены для пациентов с легочной гипертензией, связанной со многими такими состояниями (Savale, L. et al. *Respir. Res.* (2009) 10, 6 и ссылки, приведенные там; Steiner, M.K. et al. *Circ. Res.* (2009) 104(2) 236-244 и ссылки, приведенные там). IL-6-дефицитные мыши, которых подвергали гипоксии, показывали пониженное систолическое кровяное давление правого желудочка и
40 пониженную гипертрофию правого желудочка по сравнению с WT мышами, которых подвергали гипоксии (Savale, L. et al. *Respir. Res.* (2009) 10, 6 и ссылки, приведенные там). Дополнительно, у трансгенных мышей с чрезмерной экспрессией IL-6 развивалась повышенная гипертрофия правого желудочка и повышенное систолическое кровяное давление правого желудочка в условиях гипоксии по сравнению с нетрансгенными
45 контрольными мышами (Steiner, M.K. et al. *Circ. Res.* (2009) 104(2) 236-244 и ссылки, приведенные там) и экзогенно введенное IL-6 усиливает развитие легочной гипертензии у мышей, которых подвергали хронической гипоксии (Golembeski, S.M. et al. *Chest* (2005) 128(6 Suppl) 572S-573S).

[0257] Дополнительно, пациенты со стабильным ХОБЛ, имели повышенные уровни IL-6 в сыворотке по сравнению со здоровыми контрольными пациентами (Yanbaeva, D.G. et al. BMC Med Genet (2009) 10, 23; Savale, L. et al. Am. J. Respir. Crit Care Med. (2009) 179(7), 566-571; Eickhoff, P. et al. Am. J. Respir. Crit Care Med. (2008) 178(12) 1211-1218).

- 5 Повышенные уровни IL-6 были связаны с ухудшенной функцией легких у пациентов с ХОБЛ (R.E. et al. Chest (2008) 133(1) 19-25; Thorleifsson, S.J. et al. Respir. Med. (2009) 103 (10) 1548-1553). В нескольких исследованиях также сообщали про повышенные уровни IL-6 в мокроте и/или сыворотке при наступлении обострений ХОБЛ по сравнению с уровнями IL-6, которые измеряли при разрешении обострений или с уровнями IL-6, которые измеряли у пациентов со стабильным ХОБЛ (Valipour, A. et al. Clinical Science (2008) 115(7), 225-232; Groenewegen, K.H. et al. Respir. Med. (2007) 101(11) 2409-2415; Perera, W.R. et al. Eur. Respir. J. (2007) 29(3), 527-534). Повышенные уровни IL-6 также были связаны с более частыми обострениями (Bhowmik, A. et al. Thorax (2000) 55(2) 114-120). Лечение мышей с анти-IL-6 антителами или мышей с недостатком IL-6
- 15 продемонстрировало уменьшенное легочное воспаление в определенных животных моделях, например индуцированном озоном легочном воспалении и индуцированном блеомечином легочном воспалении и фиброзе (Saito, F. et al. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. (2008) 38(5) 566-571; Lang, J.E. et al. Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. (2008) 294(5) L1013-L1020; Johnston, R.A. et al. Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. (2005) 288(2) L390-
- 20 L397). Более высокие IL-6 уровни также были связаны с определенной сопутствующей заболеваемостью ХОБЛ, например, легочной гипертензией (Chaouat, A. et al. Chest (2009) 136(3) 678-687; Eddahibi, S. et al. Proceedings of the American Thoracic Society (2006) 3(6), 475-476).

- [0258] Свидетельства участия IL-6 в некоторых других заболеваниях хорошо понятны.
- 25 Данные, приведенные в данной заявке и в публикации РСТ № WO 2008/065378 дополнительно указывают на то, что агенты связывания в соответствии с данным изобретением могут быть применены для лечения таких расстройств, включая профилактическое лечение и уменьшение тяжести расстройств. Соответственно, данное изобретение представляет способ лечения или уменьшения тяжести как минимум одного
- 30 симптома любого из расстройств, указанных в данной заявке, включающий введение пациенту, который нуждается в этом, эффективное количество одного или более агентов связывания в соответствии с данным изобретением отдельно или в режиме комбинационной терапии с другим соответствующим медикаментом, известным из уровня техники или описанным в данной заявке, таким образом, что тяжесть как
- 35 минимум одного симптома любого из приведенных выше расстройств уменьшена.

- [0259] Таким образом, агенты связывания в соответствии с данным изобретением являются полезными в качестве терапевтических агентов при лечении заболеваний или расстройств, включающих IL-6 и/или IL-6Ra экспрессию и/или активность, в особенности aberrantную экспрессию/активность. Способ лечения может включать введение
- 40 эффективного количества агента связывания, в соответствии с данным изобретением пациенту, который нуждается в этом, где aberrantная экспрессия и/или активность IL-6 и/или IL-6Ra уменьшена. Способ лечения может включать (i) идентификацию пациента, демонстрирующего aberrantные уровни IL-6:IL-6Ra или активность, например, с использованием способов диагностики, описанных выше, и (ii) введение эффективного
- 45 количества агента связывания в соответствии с данным изобретением пациенту, где aberrantная экспрессия и/или активность IL-6Ra и/или IL-6 уменьшена. Эффективное количество в соответствии с данным изобретением представляет собой количество, которое уменьшает aberrantную экспрессию и/или активность IL-6 и/или IL-6Ra таким

образом, чтобы уменьшить или минимизировать тяжесть как минимум одного симптома заболевания или расстройства, которое лечат, но не обязательно лечение заболевания или расстройства.

[0260] Данное изобретение также представляет способ антагонизирования как минимум одного эффекта IL-6, включающий контактирование или введение эффективного количества одного или более агентов связывания в соответствии с данным изобретением таким образом, что указанный как минимум один эффект IL-6 антагонизирован. Эффекты IL-6, которые могут быть антагонизированы при помощи способов в соответствии с данным изобретением, включают IL-6 связывание с gp130 и эффекты ниже, которые возникают вследствие такого связывания.

[0261] Соответственно, дополнительные аспекты в соответствии с данным изобретением обеспечивают способы лечения, включающие введение агента связывания, фармацевтические композиции, содержащие такие агенты связывания, и применение таких агентов связывания при получении медикамента для введения, например в способе получения медикамента или фармацевтической композиции, содержащей композиции агента связывания с фармацевтически приемлемым эксципиентом. Фармацевтически приемлемый эксципиент может быть соединением или комбинацией соединений, введенными в фармацевтическую композицию, не вызывая вторичных реакций, позволяющим, например, облегчение введения активного соединения (соединений), повышение его срока действия и/или его эффективности в организме, повышение его растворимости в растворе или также улучшение его сохранности. Такие фармацевтически приемлемые основы хорошо известны и будут адаптированы специалистом в данной области в качестве функции природы и режима введения выбранного активного компонента (компонентов).

[0262] Агент связывания в соответствии с данным изобретением будет обычно введен в виде фармацевтической композиции, которая может содержать как минимум один компонент в дополнение к агенту связывания. Таким образом, фармацевтические композиции в соответствии с данным изобретением, могут содержать, в дополнение к активному ингредиенту, фармацевтически приемлемый эксципиент, носитель, буфер, стабилизатор или другие материалы, известные специалистам в данной области. Такие материалы должны быть нетоксичными и не должны препятствовать эффективности активного ингредиента. Точная природа носителя или другого материала будет зависеть от маршрута введения, который может быть пероральным, через вдыхание, интратрахеальным, местным, внутривенным или путем инъекции, как обсуждено ниже.

[0263] Данное изобретение относится к стерильным стабильным фармацевтическим композициям, содержащим антитело в соответствии с данным изобретением.

[0264] Данное изобретение представляет способы стабилизации антитела в соответствии с данным изобретением.

[0265] Данное изобретение дополнительно относится к способам получения стерильной стабильной композиции, содержащей антитело в соответствии с данным изобретением.

[0266] Все композиции антитела в соответствии с данным изобретением описанным в заявке вместе имеют название "композиции в соответствии с данным изобретением", "жидкие композиции в соответствии с данным изобретением", "высококонцентрированные стабильные жидкие композиции в соответствии с данным изобретением", "жидкие композиции антитела в соответствии с данным изобретением", "восстановленные жидкие композиции в соответствии с данным изобретением" или

"композиции антител в соответствии с данным изобретением

[0267] Фраза "фармацевтически приемлемый", как используют в данной заявке, означает утвержденный регулятивными органами федерального или государственного управления, или приведенный в Фармакопее США, Европейской фармакопее или другой в общем признанной фармакопее для применения у животных, и более конкретно у людей.

[0268] Термины "стабильность" и "стабильные", как используют в данной заявке в контексте жидкой композиции, содержащей антитело (включая его антительные фрагменты) в соответствии с данным изобретением, относится к сопротивлению антитела (включая его антительные фрагменты) в композиции к агрегации, распаду или фрагментации при данных условиях производства, получения, транспортировки и хранения. "Стабильные" композиции в соответствии с данным изобретением сохраняют биологическую активность при данных условиях производства, получения, транспортировки и хранения. Стабильность указанного антитела (включая его антительные фрагменты) может быть оценена в степенях агрегации, распада или фрагментации, согласно измерениям ВЭХ, обращеннофазной хроматографии, статического рассеяния света (СРС), инфракрасной спектроскопии с Фурье-преобразованием (ФТ-ИК), циркулярного дихроизма (ЦД), методов разворачивания мочевины, собственной флуоресценции триптофана, дифференциальной сканирующей калориметрии, и/или методов связывания АНС, по сравнению с реперной композицией. Например, реперная композиция может быть реперным стандартом, замороженным при -70°C, состоящим из 10 мг/мл антитела (включая его антительные фрагменты) в гистидине, рН 6,0-6,5 и необязательно одним или более эксципиентами, где реперная композиция регулярно дает один мономерный пик (например, $\geq 97\%$ площади) при помощи ВЭХ. Общая стабильность композиции, содержащей антитело (включая его антительные фрагменты) может быть оценена при помощи различных иммунологических анализов, включая, например, ELISA и радиоиммунологическое исследование с использованием выделенных молекул антигена.

[0269] Фраза "низкий к детектируемым уровням агрегации", которую используют в данной заявке, относится к пробам, содержащим не более, чем приблизительно 5%, не более чем приблизительно 4%, не более чем приблизительно 3%, не более чем приблизительно 2%, не более чем приблизительно 1% и не более чем приблизительно 0,5% агрегации по массе белка согласно измерениям методами высокоэффективной эксклюзионной хроматографии (ВЭХ) или статического рассеяния света (СРС).

[0270] Термин "низкий к детектируемым уровням фрагментации", которую используют в данной заявке, относится к пробам, содержащим равное или большее количество, чем приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 98% или приблизительно 99% общего содержания белка, например, в одном пике, как определено при помощи ВЭХ или обращеннофазной эохроматографии, или в двух пиках (например, тяжелой и легкой цепи) (или в виде множества пиков, поскольку они являются субъединицами) при помощи восстановленного капиллярного гель-электрофореза (pКГЭ), представляющего нераспавшиеся антитела или его нераспавшийся фрагмент и не содержащего другие одинарные пики, имеющие более чем приблизительно 5%, более чем приблизительно 4%, более чем приблизительно 3%, более чем приблизительно 2%, более чем приблизительно 1%, или более чем приблизительно 0,5% общего содержания белка в каждом. Термин "восстановленный капиллярный гель-электрофорез", которую используют в данной заявке, относится к капиллярному гель-электрофорезу в условиях,

достаточных для восстановления дисульфидных связей в антителе.

[0271] Данное изобретение относится к стабильным высококонцентрированным композициям антитела в соответствии с данным изобретением. В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением является жидкой композицией. В другом варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением является лиофилизованной композицией. В дополнительном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением является восстановленной жидкой композицией.

[0272] В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением является стабильной жидкой композицией. В одном варианте исполнения, жидкая композиция в соответствии с данным изобретением является водной композицией. В конкретном варианте исполнения, жидкая композиция в соответствии с данным изобретением является жидкой композицией, в которой жидкий носитель является дистиллированной водой.

[0273] В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением является стерильной.

[0274] В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением является гомогенной.

[0275] В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением является изотонической.

[0276] Данное изобретение охватывает стабильные жидкие композиции, содержащие одно рассматриваемое антитело (включая их антительные фрагменты), например, антитело, которое специфично связывается с IL-6. Данное изобретение также охватывает стабильные жидкие композиции, содержащие два или более рассматриваемых антител (включая их антительные фрагменты), например, антитела которые специфично связывают IL-6 полипептид(ы).

[0277] В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит как минимум приблизительно 1 мг/мл, как минимум приблизительно 5 мг/мл, как минимум приблизительно 10 мг/мл, как минимум приблизительно 20 мг/мл, как минимум приблизительно 30 мг/мл, как минимум приблизительно 40 мг/мл, как минимум приблизительно 50 мг/мл, как минимум приблизительно 60 мг/мл, как минимум приблизительно 70 мг/мл, как минимум приблизительно 80 мг/мл, как минимум приблизительно 90 мг/мл, как минимум приблизительно 100 мг/мл, как минимум приблизительно 110 мг/мл, как минимум приблизительно 120 мг/мл, как минимум приблизительно 130 мг/мл, как минимум приблизительно 140 мг/мл, как минимум приблизительно 150 мг/мл, как минимум приблизительно 160 мг/мл, как минимум приблизительно 170 мг/мл, как минимум приблизительно 180 мг/мл, как минимум приблизительно 190 мг/мл, как минимум приблизительно 200 мг/мл, как минимум приблизительно 250 мг/мл, или как минимум приблизительно 300 мг/мл анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением. В конкретном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит как минимум приблизительно 100 мг/мл анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением. В конкретном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит как минимум приблизительно 125 мг/мл анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением. В конкретном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит как минимум приблизительно 130 мг/мл анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением. В конкретном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением

мг/мл, как минимум 20 мг/мл, как минимум 30 мг/мл, как минимум 40 мг/мл, как минимум 50 мг/мл, как минимум 60 мг/мл, как минимум 70 мг/мл, как минимум 80 мг/мл, как минимум 90 мг/мл, как минимум 100 мг/мл, как минимум 110 мг/мл, как минимум 120 мг/мл, как минимум 130 мг/мл, как минимум 140 мг/мл, как минимум 150 мг/мл, как минимум 160 мг/мл, как минимум 170 мг/мл, как минимум 180 мг/мл, как минимум 190 мг/мл, как минимум 200 мг/мл, как минимум 250 мг/мл, или как минимум 300 мг/мл анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением. В конкретном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит как минимум 100 мг/мл анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением. В конкретном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит как минимум 125 мг/мл анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением. В конкретном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит как минимум 150 мг/мл анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением. В конкретном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит как минимум 175 мг/мл анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением. В конкретном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит как минимум 200 мг/мл анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением. В другом варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит от 1 мг/мл до 25 мг/мл, от 1 мг/мл до 200 мг/мл, от 25 мг/мл до 200 мг/мл, от 50 мг/мл до 200 мг/мл, от 75 мг/мл до 200 мг/мл, от 100 мг/мл до 200 мг/мл, от 125 мг/мл до 200 мг/мл, от 150 мг/мл до 200 мг/мл, от 25 мг/мл до 150 мг/мл, от 50 мг/мл до 150 мг/мл, от 75 мг/мл до 150 мг/мл, от 100 мг/мл до 150 мг/мл, от 125 мг/мл до 150 мг/мл, от 25 мг/мл до 125 мг/мл, от 50 мг/мл до 125 мг/мл, от 75 мг/мл до 125 мг/мл, от 100 мг/мл до 125 мг/мл, от 25 мг/мл до 100 мг/мл, от 50 мг/мл до 100 мг/мл, от 75 мг/мл до 100 мг/мл, от 25 мг/мл до 75 мг/мл, от 50 мг/мл до 75 мг/мл, или от 25 мг/мл до 50 мг/мл анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением. В конкретном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит от 90 мг/мл до 110 мг/мл анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением. В конкретном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит от 100 мг/мл до 210 мг/мл анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением. В дополнительном варианте исполнения, композиция описанная в данной заявке содержит 20 мг/мл, 30 мг/мл, 40 мг/мл, 50 мг/мл, 60 мг/мл, 70 мг/мл, 80 мг/мл, 90 мг/мл, 100 мг/мл, 110 мг/мл, 120 мг/мл, 130 мг/мл, 140 мг/мл, 150 мг/мл, 160 мг/мл, 170 мг/мл, 180 мг/мл, 190 мг/мл, 200 мг/мл, 250 мг/мл, или 300 мг/мл анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением. В конкретном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит 100 мг/мл анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением. В конкретном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит 125 мг/мл анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением. В конкретном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит 150 мг/мл анти-IL-6 антитела. В конкретном варианте исполнения, композиция содержит 175 мг/мл анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением. В конкретном варианте исполнения, композиция содержит 200 мг/мл анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением.

[0279] Необязательно, композиции в соответствии с данным изобретением могут дополнительно содержать традиционные эксципиенты и/или добавки, такие, как буферные агенты, сахараиды, соли и поверхностно-активные вещества. Дополнительно или альтернативно, композиции в соответствии с данным изобретением, могут содержать

традиционные эксципиенты и/или добавки, такие, как, но, не ограничиваясь приведенным, солюбилизаторы, разбавители, связывающие вещества, стабилизаторы, соли, липофильные растворители, аминокислоты, хелаторы, консерванты, или т.п.

[0280] В определенных вариантах исполнения, буферный агент выбирают из группы, состоящей из гистидина, цитрата, фосфата, глицина, ацетата. В других вариантах исполнения сахаридный эксципиент выбирают из группы, состоящей из трегалозы, сукрозы, маннитола, мальтозы и раффинозы. В еще одних вариантах исполнения поверхностно-активное вещество выбирают из группы, состоящей из полисорбата 20, полисорбата 40, полисорбата 80 и Плурионик F68. В еще одних вариантах исполнения соль выбирают из группы, состоящей из NaCl, KCl, MgCl₂ и CaCl₂.

[0281] Необязательно, композиции в соответствии с данным изобретением могут дополнительно содержать другие обычные вспомогательные компоненты, такие как, но, не ограничиваясь приведенным, приемлемые эксципиенты, полиолы, солюбилизаторы, разбавители, связывающие вещества, стабилизаторы, липофильные растворители, хелаторы, консерванты, или т.п.

[0282] Композиции в соответствии с данным изобретением содержат буферный или регулирующий pH агент для обеспечения улучшенного контроля значения pH. В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением имеет значение pH, составляющее от приблизительно 3,0 до приблизительно 9,0, от приблизительно 4,0 до приблизительно 8,0, от приблизительно 5,0 до приблизительно 8,0, от приблизительно 5,0 до приблизительно 7,0, от приблизительно 5,0 до приблизительно 6,5, от приблизительно 5,5 до приблизительно 8,0, от приблизительно 5,5 до приблизительно 7,0, или от приблизительно 5,5 до приблизительно 6,5. В дополнительном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением имеет значение pH, составляющее приблизительно 3,0, приблизительно 3,5, приблизительно 4,0, приблизительно 4,5, приблизительно 5,0, приблизительно 5,1, приблизительно 5,2, приблизительно 5,3, приблизительно 5,4, приблизительно 5,5, приблизительно 5,6, приблизительно 5,7, приблизительно 5,8, приблизительно 5,9, приблизительно 6,0, приблизительно 6,1, приблизительно 6,2, приблизительно 6,3, приблизительно 6,4, приблизительно 6,5, приблизительно 6,6, приблизительно 6,7, приблизительно 6,8, приблизительно 6,9, приблизительно 7,0, приблизительно 7,5, приблизительно 8,0, приблизительно 8,5, или приблизительно 9,0. В конкретном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением имеет значение pH, составляющее приблизительно 6,0.

[0283] Композиции в соответствии с данным изобретением содержат буферный или регулирующий pH агент для обеспечения улучшенного контроля значения pH. В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением имеет значение pH, составляющее от 3,0 до 9,0, от 4,0 до 8,0, от 5,0 до 8,0, от 5,0 до 7,0, от 5,0 до 6,5, от 5,5 до 8,0, от 5,5 до 7,0, или от 5,5 до 6,5. В дополнительном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением имеет значение pH, составляющее 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, или 9,0. В конкретном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением имеет значение pH, составляющее 6,0. Специалист в данной области поймет, что значение pH композиции в общем, не должно быть равным изоэлектрической точке конкретного антигена (включая его антигенный фрагмент) для применения в композиции.

[0284] Типично, буферный агент является солью, полученной из органической или неорганической кислоты или основания. Репрезентативные буферные агенты включают,

не ограничиваясь приведенным, соли органических кислот, такие, как соли лимонной кислоты, аскорбиновой кислоты, глюконовой кислоты, карбоновой кислоты, винной кислоты, янтарной кислоты, уксусной кислоты или фталевой кислоты; Трис, трометамин гидрохлорид, или фосфатные буферы. Дополнительно, аминокислотные компоненты могут также функционировать в качестве буферных агентов. Репрезентативные аминокислотные компоненты, которые могут быть использованы в композиции в соответствии с данным изобретением в качестве буферных агентов, включают, не ограничиваясь приведенным, глицин и гистидин. В определенных вариантах исполнения, буферный агент выбирают из группы, состоящей из гистидина, цитрата, фосфата, глицина, ацетата. В конкретном варианте исполнения, буферный агент является гистидином. В другом конкретном варианте исполнения, буферный агент является цитратом. Чистота буферного агента должны быть как минимум 98%, или как минимум 99%, или как минимум 99,5%. Как используют в данной заявке, термин "чистота" в контексте гистидина относится к химической чистоте гистидина, как понимают в данной области, например, как описано в The Merck Index, 13th ed., O'Neil et al. ed. (Merck & Co., 2001).

[0285] Буферные агенты типично используют при концентрациях от приблизительно 1 мМ до приблизительно 200 мМ или любом диапазоне или значении в данном диапазоне, в зависимости от желательной ионной силы и необходимой буферной емкости.

Обычные концентрации традиционных буферных агентов, которые применяют в парентеральных композициях, можно найти в: Pharmaceutical Dosage Form: Parenteral Medications, Volume 1, 2nd Edition, Chapter 5, p. 194, De Luca and Boylan, "Formulation Small Volume Parenterals", Таблица 5: Commonly used additives in Parenteral Products. В одном варианте исполнения, буферный агент имеет концентрацию, составляющую

приблизительно 1 мМ, или приблизительно 5 мМ, или приблизительно 10 мМ, или приблизительно 15 мМ, или приблизительно 20 мМ, или приблизительно 25 мМ, или приблизительно 30 мМ, или приблизительно 35 мМ, или приблизительно 40 мМ, или приблизительно 45 мМ, или приблизительно 50 мМ, или приблизительно 60 мМ, или приблизительно 70 мМ, или приблизительно 80 мМ, или приблизительно 90 мМ, или приблизительно 100 мМ. В одном варианте исполнения, буферный агент имеет концентрацию, составляющую 1 мМ, или 5 мМ, или 10 мМ, или 15 мМ, или 20 мМ, или 25 мМ, или 30 мМ, или 35 мМ, или 40 мМ, или 45 мМ, или 50 мМ, или 60 мМ, или 70 мМ, или 80 мМ, или 90 мМ, или 100 мМ. В конкретном варианте исполнения, буферный агент имеет концентрацию, составляющую приблизительно от 5 мМ до приблизительно 50 мМ. В другом конкретном варианте исполнения, буферный агент имеет концентрацию, составляющую от 5 мМ до 20 мМ.

[0286] В дополнительном варианте исполнения, буферный агент имеет концентрацию, составляющую 1 мМ, или 5 мМ, или 10 мМ, или 15 мМ, или 20 мМ, или 25 мМ, или 30 мМ, или 35 мМ, или 40 мМ, или 45 мМ, или 50 мМ, или 60 мМ, или 70 мМ, или 80 мМ, или 90 мМ, или 100 мМ. В одном варианте исполнения, буферный агент имеет концентрацию, составляющую 1 мМ, или 5 мМ, или 10 мМ, или 15 мМ, или 20 мМ, или 25 мМ, или 30 мМ, или 35 мМ, или 40 мМ, или 45 мМ, или 50 мМ, или 60 мМ, или 70 мМ, или 80 мМ, или 90 мМ, или 100 мМ. В конкретном варианте исполнения, буферный агент имеет концентрацию, составляющую от 5 мМ до 50 мМ. В другом конкретном варианте исполнения, буферный агент имеет концентрацию, составляющую от 5 мМ до 20 мМ.

[0287] В определенных вариантах исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит буферный агент. В одном варианте исполнения, указанный

буферный агент выбирают из группы, состоящей из гистидина, цитрата, фосфата, глицина, ацетата. В конкретном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит гистидин в качестве буферного агента.

[0288] В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит как минимум приблизительно 1 мМ, как минимум приблизительно 5 мМ, как минимум приблизительно 10 мМ, как минимум приблизительно 20 мМ, как минимум приблизительно 30 мМ, как минимум приблизительно 40 мМ, как минимум приблизительно 50 мМ, как минимум приблизительно 75 мМ, как минимум приблизительно 100 мМ, как минимум приблизительно 150 мМ, или как минимум приблизительно 200 мМ гистидина. В другом варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит от приблизительно 1 мМ до приблизительно 200 мМ, от приблизительно 1 мМ до приблизительно 150 мМ, от приблизительно 1 мМ до приблизительно 100 мМ, от приблизительно 1 мМ до приблизительно 75 мМ, от приблизительно 10 мМ до приблизительно 200 мМ, от приблизительно 10 мМ до приблизительно 150 мМ, от приблизительно 10 мМ до приблизительно 100 мМ, от приблизительно 10 мМ до приблизительно 75 мМ, от приблизительно 10 мМ до приблизительно 50 мМ, от приблизительно 10 мМ до приблизительно 40 мМ, от приблизительно 10 мМ до приблизительно 30 мМ, от приблизительно 20 мМ до приблизительно 75 мМ, от приблизительно 20 мМ до приблизительно 50 мМ, от приблизительно 20 мМ до приблизительно 40 мМ, или от приблизительно 20 мМ до приблизительно 30 мМ гистидина. В дополнительном варианте исполнения в соответствии с данным изобретением содержит приблизительно 1 мМ, приблизительно 5 мМ, приблизительно 10 мМ, приблизительно 20 мМ, приблизительно 25 мМ, приблизительно 30 мМ, приблизительно 35 мМ, приблизительно 40 мМ, приблизительно 45 мМ, приблизительно 50 мМ, приблизительно 60 мМ, приблизительно 70 мМ, приблизительно 80 мМ, приблизительно 90 мМ, приблизительно 100 мМ, приблизительно 150 мМ, или приблизительно 200 мМ гистидина. В конкретном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит приблизительно 10 мМ гистидина.

[0289] В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит как минимум 1 мМ, как минимум 5 мМ, как минимум 10 мМ, как минимум 20 мМ, как минимум 30 мМ, как минимум 40 мМ, как минимум 50 мМ, как минимум 75 мМ, как минимум 100 мМ, как минимум 150 мМ, или как минимум 200 мМ гистидина. В другом варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит от 1 мМ до 200 мМ, от 1 мМ до 150 мМ, от 1 мМ до 100 мМ, от 1 мМ до 75 мМ, от 10 мМ до 200 мМ, от 10 мМ до 150 мМ, от 10 мМ до 100 мМ, от 10 мМ до 75 мМ, от 10 мМ до 50 мМ, от 10 мМ до 40 мМ, от 10 мМ до 30 мМ, от 20 мМ до 75 мМ, от 20 мМ до 50 мМ, от 20 мМ до 40 мМ, или от 20 мМ до 30 мМ гистидина. В дополнительном варианте исполнения в соответствии с данным изобретением включает 1 мМ, 5 мМ, 10 мМ, 20 мМ, 25 мМ, 30 мМ, 35 мМ, 40 мМ, 45 мМ, 50 мМ, 60 мМ, 70 мМ, 80 мМ, 90 мМ, 100 мМ, 150 мМ, или 200 мМ гистидина. В конкретном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит 10 мМ гистидина.

[0290] В определенных вариантах исполнения, композиции в соответствии с данным изобретением содержать углеводный эксципиент. Углеводные эксципиенты могут действовать, например, в качестве агентов, увеличивающих вязкость, стабилизаторов, объемобразующих агентов, солюбилизующих агентов, и/или т.п. Углеводные эксципиенты в общем присутствуют при от приблизительно 1% до приблизительно 99%

по массе или объему. В одном варианте исполнения, углеводный эксципиент присутствует при приблизительно от 0,1% до приблизительно 20%. В другом варианте исполнения, углеводный эксципиент присутствует при приблизительно от 0,1% до приблизительно 15%. В конкретном варианте исполнения, углеводный эксципиент присутствует при

5 приблизительно от 0,1% до приблизительно 5%, или приблизительно от 1% до приблизительно 20%, или приблизительно от 5% до приблизительно 15%, или приблизительно от 8% до приблизительно 10%, или приблизительно от 10% до приблизительно 15%, или приблизительно от 15% до приблизительно 20%. В другом конкретном варианте исполнения, углеводный эксципиент присутствует при от 0,1%

10 до 20%, или от 5% до 15%, или от 8% до 10%, или от 10% до 15%, или от 15% до 20%. В еще одном конкретном варианте исполнения, углеводный эксципиент присутствует при от приблизительно 0,1% до приблизительно 5%. В еще одном конкретном варианте исполнения, углеводный эксципиент присутствует при от приблизительно 5% до приблизительно 10%. В еще одних конкретных вариантах исполнения, углеводный

15 эксципиент присутствует при от приблизительно 15% до приблизительно 20%. В еще одних конкретных вариантах исполнения, углеводный эксципиент присутствует при 1%, или при 1,5%, или при 2%, или при 2,5%, или при 3%, или при 4%, или при 5%, или при 10%, или при 15%, или при 20%.

[0291] В определенных вариантах исполнения, композиции в соответствии с данным изобретением содержать углеводный эксципиент. Углеводные эксципиенты могут

20 действовать, например, в качестве агентов, увеличивающих вязкость, стабилизаторов, объемообразующих агентов, солюбилизующих агентов, и/или т.п. Углеводные эксципиенты в общем присутствуют при от 1% до 99% по массе или объему. В одном варианте исполнения, углеводный эксципиент присутствует при от 0,1% до 20%. В

25 другом варианте исполнения, углеводный эксципиент присутствует при от 0,1% до 15%. В конкретном варианте исполнения, углеводный эксципиент присутствует при от 0,1% до 5%, или от 1% до 20%, или от 5% до 15%, или от 8% до 10%, или от 10% до 15%, или от 15% до 20%. В другом конкретном варианте исполнения, углеводный эксципиент присутствует при от 0,1% до 20%, или от 5% до 15%, или от 8% до 10%, или от 10% до

30 15%, или от 15% до 20%. В еще одном конкретном варианте исполнения, углеводный эксципиент присутствует при от 0,1% до 5%. В еще одном конкретном варианте исполнения, углеводный эксципиент присутствует при от 5% до 10%. В еще одних конкретных вариантах исполнения, углеводный эксципиент присутствует при от 15% до 20%. В еще одних конкретных вариантах исполнения, углеводный эксципиент

35 присутствует при 1%, или при 1,5%, или при 2%, или при 2,5%, или при 3%, или при 4%, или при 5%, или при 10%, или при 15%, или при 20%.

[0292] Углеводные эксципиенты, приемлемые для применения в композициях в соответствии с данным изобретением включают, например, моносахариды, такие, как

40 фруктоза, мальтоза, галактоза, глюкоза, D-манноза, сорбоза и т.п.; дисахариды, такие, как лактоза, сукроза, трегалоза, целлибиоза и т.п.; полисахариды, такие, как раффиноза, мелезитоза, мальтодекстрины, декстраны, крахмалы и т.п.; альдитолов, таких, как маннитол, ксилитол, мальтитол, лактитол, ксилитол сорбитол (глюцитол) и т.п. В одном варианте исполнения, углеводные эксципиенты для применения в данном изобретении выбирают из группы, состоящей из сукрозы, трегалозы, лактозы, маннитола и

45 раффинозы. В конкретном варианте исполнения, углеводный эксципиент представляет собой трегалозу. В другом конкретном варианте исполнения, углеводный эксципиент представляет собой маннитол. В еще одних конкретных вариантах исполнения, углеводный эксципиент представляет собой сукрозу. В еще одном конкретном варианте

исполнения, углеводный эксципиент представляет собой раффинозу. Чистота углеводного эксципиента должна составлять как минимум 98%, или как минимум 99%, или как минимум 99,5%.

[0293] В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит как минимум приблизительно 1%, как минимум приблизительно 2%, как минимум приблизительно 4%, как минимум приблизительно 8%, как минимум приблизительно 20%, как минимум приблизительно 30%, или как минимум приблизительно 40% трегалозы. В другом варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит от приблизительно 1% до приблизительно 40%, от приблизительно 1% до приблизительно 30%, от приблизительно 1% до приблизительно 20%, от приблизительно 2% до приблизительно 40%, от приблизительно 2% до приблизительно 30%, от приблизительно 2% до приблизительно 20%, от приблизительно 4% до приблизительно 40%, от приблизительно 4% до приблизительно 30%, или от приблизительно 4% до приблизительно 20% трегалозы. В дополнительном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит приблизительно 1%, приблизительно 2%, приблизительно 4%, приблизительно 8%, приблизительно 20%, приблизительно 30%, или приблизительно 40% трегалозы. В конкретном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит приблизительно 4% трегалозы.

[0294] В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит как минимум 1%, как минимум 2%, как минимум 4%, как минимум 8%, как минимум 20%, как минимум 30%, или как минимум 40% трегалозы. В другом варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит от 1% до 40%, от 1% до 30%, от 1% до 20%, от 2% до 40%, от 2% до 30%, от 2% до 20%, от 4% до 40%, от 4% до 30%, или от 4% до 20% трегалозы. В дополнительном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит 1%, 2%, 4%, 8%, 20%, 30%, или 40% трегалозы.

[0295] В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит эксципиент. В конкретном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит как минимум один эксципиент выбранный из группы, состоящей из: сахара, соли, поверхностно-активного вещества, аминокислоты, полиола, хелатирующего агента, эмульгатора и консерванта. В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит соль. В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит соль выбранных из группы, состоящей из: NaCl, KCl, CaCl₂, and MgCl₂. В конкретном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит NaCl.

[0296] В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит как минимум приблизительно 10 mM, как минимум приблизительно 25 mM, как минимум приблизительно 50 mM, как минимум приблизительно 75 mM, как минимум приблизительно 80 mM, как минимум приблизительно 100 mM, как минимум приблизительно 125 mM, как минимум приблизительно 150 mM, как минимум приблизительно 175 mM, как минимум приблизительно 200 mM, или как минимум приблизительно 300 mM хлорида натрия. В дополнительном варианте исполнения, композиция описанного в данной заявке содержит от приблизительно 10 mM до приблизительно 300 mM, от приблизительно 10 mM до приблизительно 200 mM, от приблизительно 10 mM до приблизительно 175 mM, от приблизительно 10 mM до приблизительно 150 mM, от приблизительно 25 mM до

приблизительно 300 мМ, от приблизительно 25 мМ до приблизительно 200 мМ, от приблизительно 25 мМ до приблизительно 175 мМ, от приблизительно 25 мМ до приблизительно 150 мМ, от приблизительно 50 мМ до приблизительно 300 мМ, от приблизительно 50 мМ до приблизительно 200 мМ, от приблизительно 50 мМ до приблизительно 175 мМ, от приблизительно 50 мМ до приблизительно 150 мМ, от приблизительно 75 мМ до приблизительно 300 мМ, от приблизительно 75 мМ до приблизительно 200 мМ, от приблизительно 75 мМ до приблизительно 175 мМ, от приблизительно 75 мМ до приблизительно 150 мМ, от приблизительно 100 мМ до приблизительно 300 мМ, от приблизительно 100 мМ до приблизительно 200 мМ, от приблизительно 100 мМ до приблизительно 175 мМ, или от приблизительно 100 мМ до приблизительно 150 мМ хлорида натрия. В дополнительном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит приблизительно 10 мМ. приблизительно 25 мМ, приблизительно 50 мМ, приблизительно 75 мМ, приблизительно 80 мМ, приблизительно 100 мМ, приблизительно 125 мМ, приблизительно 150 мМ, приблизительно 175 мМ, приблизительно 200 мМ, или приблизительно 300 мМ хлорида натрия.

[0297] В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит как минимум 10 мМ, как минимум 25 мМ, как минимум 50 мМ, как минимум 75 мМ, как минимум 80 мМ, как минимум 100 мМ, как минимум 125 мМ, как минимум 150 мМ, как минимум 175 мМ, как минимум 200 мМ, или как минимум 300 мМ хлорида натрия. В дополнительном варианте исполнения, композиция описанная в данной заявке содержит от 10 мМ до 300 мМ, от 10 мМ до 200 мМ, от 10 мМ до 175 мМ, от 10 мМ до 150 мМ, от 25 мМ до 300 мМ, от 25 мМ до 200 мМ, от 25 мМ до 175 мМ, от 25 мМ до 150 мМ, от 50 мМ до 300 мМ, от 50 мМ до 200 мМ, от 50 мМ до 175 мМ, от 50 мМ до 150 мМ, от 75 мМ до 300 мМ, от 75 мМ до 200 мМ, от 75 мМ до 175 мМ, от 75 мМ до 150 мМ, от 100 мМ до 300 мМ, от 100 мМ до 200 мМ, от 100 мМ до 175 мМ, или от 100 мМ до 150 мМ хлорид натрия. В дополнительном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит 10 мМ. 25 мМ, 50 мМ, 75 мМ, 80 мМ, 100 мМ, 125 мМ, 150 мМ, 175 мМ, 200 мМ, или 300 мМ хлорида натрия.

[0298] В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит аминокислоту. В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит соль аминокислоты. В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из лизина, аргинина и гистидина. В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит как минимум приблизительно 25 мМ аминокислоты, как минимум приблизительно 50 мМ аминокислоты, как минимум приблизительно 100 мМ аминокислоты, как минимум приблизительно 150 мМ аминокислоты, как минимум приблизительно 200 мМ аминокислоты, как минимум приблизительно 250 мМ аминокислоты, как минимум приблизительно 300 мМ аминокислоты, как минимум приблизительно 350 мМ аминокислоты, или как минимум приблизительно 400 мМ аминокислоты. В другом варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит от приблизительно 25 мМ до приблизительно 250 мМ, от приблизительно 25 мМ до приблизительно 300 мМ, от приблизительно 25 мМ до приблизительно 350 мМ, от приблизительно 25 мМ до приблизительно 400 мМ, от приблизительно 50 мМ до приблизительно 250 мМ, от приблизительно 50 мМ до приблизительно 300 мМ, от приблизительно 50 мМ до приблизительно 350 мМ, от приблизительно 50 мМ до

которое используют в данной заявке, относится к органическим веществам, имеющим амфифильные структуры; а именно, они состоят из групп с различными тенденциями к растворимости, типично жирорастворимой углеводородной цепи и водорастворимой ионной группы. Поверхностно-активные вещества могут быть классифицированы, в зависимости от заряда поверхностно-активного фрагмента, на анионные, катионные и неионные поверхностно-активные вещества. Поверхностно-активные вещества часто используют в качестве увлажняющих, эмульгирующих, солюбилизующих и диспергирующих агентов для различных фармацевтических композиций и препаратов из биологических материалов. Фармацевтически приемлемые поверхностно-активные вещества, такие, как полисорбаты (например, полисорбаты 20 или 80); полиоксамеры (например, полоксамер 188); тритон; натрий октил гликозид; лаурил-, миристил-, линолеил-, или стеарил-сульфобетаин; лаурил-, миристил-, линолеил- или стеарил-саркозин; линолеил-, миристил-, или цетил-бетаин; лауроамидопропил-, кокамидопропил-, линолеамидопропил-, миристамидопропил-, пальмидопропил-, или изостеарамидопропил-бетаин (например, лауроамидопропил); миристамидопропил-, пальмидопропил-, или изостеарамидопропил-диметиламин; натрий метил кокоил-, или динарий метил олеил таурат; и серия MONAQUA™ (Mona Industries, Inc., Paterson, N.J.), полиэтиленгликоль, полипропилгликоль и сополимеры этилена и пропиленгликоля (например, Плуроники, PF68 etc), могут быть необязательно добавлены в композиции в соответствии с данным изобретением для уменьшения агрегации. Поверхностно-активные вещества являются в особенности полезными, если помпа или пластиковый контейнер используется для введения композиция. Присутствие фармацевтически приемлемого поверхностно-активного вещества уменьшает склонность к агрегации белков. В конкретном варианте исполнения, композиции в соответствии с данным изобретением содержит полисорбат, который находится в концентрации в диапазоне от приблизительно 0,001% до приблизительно 1%, или от приблизительно 0,001% до приблизительно 0,1%, или от приблизительно 0,01% до приблизительно 0,1%. В других конкретных вариантах исполнения, композиции в соответствии с данным изобретением содержит полисорбат, который имеет концентрацию, составляющую 0,001%, или 0,002%, или 0,003%, или 0,004%, или 0,005%, или 0,006%, или 0,007%, или 0,008%, или 0,009%, или 0,01%, или 0,015%, или 0,02%. В другом конкретном варианте исполнения, полисорбат является полисорбатов-80. В конкретном варианте исполнения, композиции в соответствии с данным изобретением содержит полисорбат, который находится при концентрации в диапазоне от 0,001% до 1%, или 0,001% до 0,1%, или 0,01% до 0,1%. В других конкретных вариантах исполнения, композиции в соответствии с данным изобретением содержит полисорбат, который имеет концентрацию, составляющую 0,001%, или 0,002%, или 0,003%, или 0,004%, или 0,005%, или 0,006%, или 0,007%, или 0,008%, или 0,009%, или 0,01%, или 0,015%, или 0,02%. В другом конкретном варианте исполнения, полисорбат является полисорбатов-80.

[0301] В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит поверхностно-активное вещество. В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит Полисорбат 20, Полисорбат 40, Полисорбат 60, или Полисорбат 80. В конкретном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит Полисорбат 80.

[0302] В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит как минимум приблизительно 0,001%, как минимум приблизительно 0,002%, как минимум приблизительно 0,005%, как минимум приблизительно 0,01%, как минимум приблизительно 0,02%, как минимум

приблизительно 0,05%, как минимум приблизительно 0,1%, как минимум приблизительно 0,2%, или как минимум приблизительно 0,5% Полисорбат 80. В другом варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит от приблизительно 0,001% до приблизительно 0,5%, от приблизительно 0,001% до приблизительно 0,2%, от приблизительно 0,001% до приблизительно 0,1%, от приблизительно 0,001% до приблизительно 0,05%, от приблизительно 0,002% до приблизительно 0,5%, от приблизительно 0,002% до приблизительно 0,2%, от приблизительно 0,002% до приблизительно 0,1%, от приблизительно 0,002% до приблизительно 0,05%, от приблизительно 0,005% до приблизительно 0,5%, от приблизительно 0,005% до приблизительно 0,2%, от приблизительно 0,005% до приблизительно 0,1%, от приблизительно 0,005% до приблизительно 0,05%, от приблизительно 0,01% до приблизительно 0,5%, от приблизительно 0,01% до приблизительно 0,2%, от приблизительно 0,01% до приблизительно 0,1%, или от приблизительно 0,01% до приблизительно 0,05% Полисорбат 80. В дополнительном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит приблизительно 0,001%, приблизительно 0,002%, приблизительно 0,005%, приблизительно 0,01%, приблизительно 0,02%, приблизительно 0,05%, приблизительно 0,1%, приблизительно 0,2%, до приблизительно 0,5% Полисорбат 80. В конкретном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит приблизительно 0,02% Полисорбат 80. В конкретном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит приблизительно 0,04% Полисорбат 80. В конкретном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит приблизительно 0,05% Полисорбат 80.

[0303] В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит как минимум 0,001%, как минимум 0,002%, как минимум 0,005%, как минимум 0,01%, как минимум 0,02%, как минимум 0,05%, как минимум 0,1%, как минимум 0,2%, или как минимум 0,5% Полисорбат 80. В другом варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит от 0,001% до 0,5%, от 0,001% до 0,2%, от 0,001% до 0,1%, от 0,001% до 0,05%, от 0,002% до 0,5%, от 0,002% до 0,2%, от 0,002% до 0,1%, от 0,002% до 0,05%, от 0,005% до 0,5%, от 0,005% до 0,2%, от 0,005% до 0,1%, от 0,005% до 0,05%, от 0,01% до 0,5%, от 0,01% до 0,2%, от 0,01% до 0,1%, или от 0,01% до 0,05% Полисорбата 80. В дополнительном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит 0,001%, 0,002%, 0,005%, 0,01%, 0,02%, 0,05%, 0,1%, 0,2% и 0,5% Полисорбата 80. В конкретном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит 0,02% Полисорбата 80. В конкретном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит 0,04% Полисорбата 80. В конкретном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит 0,05% Полисорбата 80.

[0304] Необязательно, композиции в соответствии с данным изобретением дополнительно содержат другие традиционные эксципиенты и/или добавки, включая, но не ограничиваясь приведенным, разбавители, связывающие вещества, стабилизаторы, липофильные растворители, консерванты, адъюванты, или т.п. Фармацевтически приемлемые эксципиенты и/или добавки могут быть использованы в композиции в соответствии с данным изобретением. Традиционно используемые эксципиенты/добавки, такие, как фармацевтически приемлемые хелаторы (например, но, не ограничиваясь приведенным, ЭДТК, ДТБК или ЭГТК) могут необязательно быть добавлены в композиции в соответствии с данным изобретением для уменьшения агрегации. Такие

добавки являются в особенности полезными, если помпа или пластиковый контейнер используется для введения композиции.

[0305] Консерванты, такие, как фенол, м-крезол, п-крезол, о-крезол, хлоркрезол, бензиловый спирт, фенилртутьнитрит, феноксиэтанол, формальдегид, хлорбутанол, хлорид магния например, но, не ограничиваясь приведенным, гексагидрат, алкилпарабен (метил, этил, пропил, бутил и т.п.), бензалконий хлорид, бензэтоний хлорид, натрий дегидроацетат и тимерозал, или их смеси, могут быть необязательно добавлены к композиции в соответствии с данным изобретением в любой приемлемой концентрации, такой, как от приблизительно 0,001% до приблизительно 5%, или в любом диапазоне или значении в данном диапазоне. Концентрация консерванта, который используют в композиции в соответствии с данным изобретением, является концентрацией, достаточной для получения бактериального эффекта. Такие концентрации зависят от выбранного консерванта и легко определяются специалистом в данной области.

[0306] Другие описанные эксципиенты/добавки, которые могут быть использованы в композиции в соответствии с данным изобретением включают, например, ароматизирующие вещества, противомикробные агенты, подсластители, антиоксиданты, антистатики, липиды, такие, как фосфолипиды или жирные кислоты, стероиды, такие, как холестерин, белковые эксципиенты, такие, как сывороточный альбумин (человеческий сывороточный альбумин (ЧСА), рекомбинантный человеческий альбумин (гНА)), желатин, казеин, солеобразующие противоионы, такие, как натрий и т.п. Такие дополнительно известные фармацевтические эксципиенты и/или добавки, приемлемые для применения в композициях в соответствии с данным изобретением известны в данной области, например, как приведено в "Remington: The Science & Practice of Pharmacy", 21st ed., Lippincott Williams & Wilkins, (2005), и в "Physician's Desk Reference", 60th ed., Medical Economics, Montvale, N.J. (2005). Могут быть стандартно выбраны фармацевтически приемлемые носители, приемлемые для режима введения, растворимости и/или стабильности Fc вариантного белка, а также хорошо известны из уровня техники или описаны в данной заявке.

[0307] Специалисту в данной области будет понятно, что композиция в соответствии с данным изобретением может быть изотонической с человеческой кровью, то есть композиция в соответствии с данным изобретением имеет в существенной степени то же самое осмотическое давление, что и человеческая кровь. Такие изотонические композиции будут, в общем, иметь осмотическое давление от приблизительно 250 миллиосмоль до приблизительно 350 миллиосмоль. Изотоничность может быть измерена путем, например, использования осмометра давления паров или замораживания льдом. Тоничность композиция регулируют путем применения модификаторов тоничности. "Модификаторы тоничности" являются такими фармацевтически приемлемыми инертными веществами, которые могут быть добавлены в композицию для обеспечения тоничности композиции. Модификаторы тоничности, приемлемые для применения в данном изобретении, включают, не ограничиваясь приведенным, сахараиды, соли и аминокислоты.

[0308] В определенных вариантах исполнения, композиции в соответствии с данным изобретением, имеют осмотическое давление от приблизительно 100 миллиосмоль до приблизительно 1200 миллиосмоль, или от приблизительно 200 миллиосмоль до приблизительно 1000 миллиосмоль, или от приблизительно 200 миллиосмоль до приблизительно 800 миллиосмоль, или от приблизительно 200 миллиосмоль до приблизительно 600 миллиосмоль, или от приблизительно 250 миллиосмоль до приблизительно 500 миллиосмоль, или от приблизительно 250 миллиосмоль до

приблизительно 400 миллиосмоль, или от приблизительно 250 миллиосмоль до приблизительно 350 миллиосмоль.

[0309] В определенных вариантах исполнения, композиции в соответствии с данным изобретением, имеют осмотическое давление от 100 миллиосмоль до 1200 миллиосмоль, или от 200 миллиосмоль до 1000 миллиосмоль, или от 200 миллиосмоль до 800 миллиосмоль, или от 200 миллиосмоль до 600 миллиосмоль, или от 250 миллиосмоль до 500 миллиосмоль, или от 250 миллиосмоль до 400 миллиосмоль, или от 250 миллиосмоль до 350 миллиосмоль.

[0310] Концентрацию любого одного или любой комбинации различных компонентов композиции в соответствии с данным изобретением регулируют для достижения желаемой тоничности конечной композиции. Например, соотношение углеводного эксципиента и антитела может быть отрегулировано в соответствии со способами, известными из уровня техники (например, патент США №6,685,940). В определенных вариантах исполнения, молярное соотношение углеводного эксципиента и антитела может составлять от приблизительно 100 моль до приблизительно 1000 моль углеводного эксципиента к приблизительно 1 моль антитела, или от приблизительно 200 моль до приблизительно 6000 моль углеводного эксципиента к приблизительно 1 моль антитела, или от приблизительно 100 моль до приблизительно 510 моль углеводного эксципиента к приблизительно 1 моль антитела, или от приблизительно 100 моль до приблизительно 600 моль углеводного эксципиента к приблизительно 1 моль антитела.

[0311] Концентрацию любого одного или любой комбинации различных компонентов композиции в соответствии с данным изобретением регулируют для достижения желаемой тоничности конечной композиции. Например, соотношение углеводного эксципиента и антитела может быть отрегулировано в соответствии со способами, известными из уровня техники (например, патент США №6,685,940). В определенных вариантах исполнения, молярное соотношение углеводного эксципиента и антитела может составлять от 100 моль до 1000 моль углеводного эксципиента к 1 моль антитела, или от 200 моль до 6000 моль углеводного эксципиента к 1 моль антитела, или от 100 моль до 510 моль углеводного эксципиента к 1 моль антитела, или от 100 моль до 600 моль углеводного эксципиента к 1 моль антитела.

[0312] Желаемая изотоничность конечной композиции может быть также достигнута путем регулирования концентрации соли композиции. Соли, которые являются фармацевтически приемлемыми и пригодными для данного изобретения в качестве модификаторов тоничности включают, не ограничиваясь приведенным, хлорид натрия, сукцинат натрия, сульфат натрия, хлорид калия, хлорид магния, сульфат магния и хлорид кальция. В конкретных вариантах исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержат NaCl, MgCl₂, и/или CaCl₂. В одном варианте исполнения, концентрация NaCl составляет приблизительно от 75 mM до приблизительно 150 mM. В другом варианте исполнения, концентрация MgCl₂ составляет приблизительно от 1 mM до приблизительно 100 mM. Аминокислоты, которые являются фармацевтически приемлемыми и пригодными для данного изобретения в качестве модификаторов тоничности, включают, не ограничиваясь приведенным, пролин, аланин, L-аргинин, аспарагин, L-аспартамовую кислоту, глицин, серин, лизин и гистидин.

[0313] В одном варианте исполнения композиции в соответствии с данным изобретением являются апирогенными композициями, которые в существенной степени не содержат эндотоксины и/или родственные пирогенные вещества. Эндотоксины включают токсины, которые заключены в микроорганизмах и высвобождаются только при разрушении или смерти микроорганизмов. Пирогенные вещества также включают

вызывающие лихорадку термостабильные вещества (гликопротеины) из внешней мембраны бактерий и других микроорганизмов. Оба из этих веществ могут вызвать лихорадку, пониженное давление и шок при введении людям. Из-за возможного вредного влияния, даже малые количества эндотоксинов должны быть удалены из

5 внутривенно введенных фармацевтических растворов лекарственных средств. Управление по продовольствию и лекарственным средствам ("FDA") установило верхний предел в 5 эндотоксических единиц (ЭЕ) на дозу на килограмм массы тела на один одночасовой период для внутривенных применений лекарственных средств (The United States Pharmacopeial Convention, Pharmacopeial Forum 26 (1):223 (2000)). Если

10 терапевтические белки вводят в количествах, составляющих несколько сот или тысяч миллиграмм на килограмм массы тела, что может быть в случае антител, даже остаточные количества вредных и опасных эндотоксинов должны быть удалены. В некоторых конкретных вариантах исполнения, уровни эндотоксинов и пирогенов в композиции составляют менее чем 10 ЭЕ/мг, или менее чем 5 ЭЕ/мг, или менее чем 1

15 ЭЕ/мг, или менее чем 0,1 ЭЕ/мг, или менее чем 0,01 ЭЕ/мг, или менее чем 0,001 ЭЕ/мг.

[0314] При использовании для введения *in vivo*, композиции в соответствии с данным изобретением должны быть стерильными. Композиции в соответствии с данным изобретением могут быть стерилизованы при помощи различных способов стерилизации, включая стерильную фильтрацию, излучение и т.д. В одном варианте исполнения,

20 композицию антитела стерилизуют на предварительно простерилизованном фильтре в 0,22 микрон. Стерильные композиции для инъекций могут быть составлены в композицию в соответствии с традиционной фармацевтической практикой, как описано в "Remington: The Science & Practice of Pharmacy", 21st ed., Lippincott Williams & Wilkins, (2005). Композиции, содержащие антитела, такие, как описано в данной заявке, обычно

25 будут хранить в лиофилизированной форме или в растворе. Описано, что стерильные композиции, содержащие антитела, помещены в контейнер, имеющий стерильный порт доступа, например, пакет для внутривенного раствора или ампулу, имеющую наконечник, который позволяет извлечение композиции, такой, как пробка, протыкаемая иглой для подкожных введений. В одном варианте исполнения, композиция в

30 соответствии с данным изобретением обеспечены в предварительно наполненном шприце.

[0315] В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением является лиофилизированной композицией. Термин "лиофилизированная" или "высушенная сублимацией" включает состояние вещества, которое подвергали

35 процедуре высушивания, такой, как лиофилизация, где было удалено как минимум 50% влаги.

[0316] Фраза "объемообразующий агент" включает соединение, которое является фармацевтически приемлемой и добавляет объем в лиофилизированную лепешку. Объемообразующие агенты, известные в данной области, включают, например,

40 углеводы, в том числе простые сахара, такие, как декстроза, рибоза, фруктозы и т.п.; спиртовые сахара, такие, как маннитол, инозитол и сорбитол, дисахариды, включая трегалозу, сукрозу и лактозу, встречающиеся в природе полимеры, такие, как крахмал, декстраны, хитозан, гиалуронат, белки (например, желатин и сывороточный альбумин), гликоген и синтетические мономеры и полимеры.

45 [0317] "Лиопротектант" представляет собой молекулу, которая при сочетании с рассматриваемым белком, в значительной степени предотвращает или уменьшает химическую и/или физическую нестабильность белка после лиофилизации и последующего хранения. Лиопротектанты включают, не ограничиваясь приведенным,

сахара и соответствующие им сахарные спирты; аминокислоту, такую, как глутамат мононатрия или гистидин; метиламин, такой, как бетаин; лиотропную соль, такую, как сульфат магния; полиол, такой, как трехводные или более высокомолекулярные сахарные спирты, например, глицерин, декстран, эритритол, глицерол, арабитол, ксилитол, сорбитол и маннитола; пропиленгликоль; полиэтиленгликоль; Плюроники™; и их комбинации. Дополнительные примеры лиопротектантов включают, не ограничиваясь приведенным, глицерин и желатин, и сахара меллибиозу, мелезитозу, раффинозу, маннотриозу и стахиозу. Примеры восстанавливающих сахаров включают, не ограничиваясь приведенным, глюкозу, мальтозу, лактозу, мальтулозу, изо-мальтулозу и лактулозу. Примеры невосстанавливающих сахаров включают, не ограничиваясь приведенным, невосстанавливающие гликозиды, полигидроксидные соединения, выбранные из сахарных спиртов и других полиспиртов с неразветвленной цепью. Примеры сахарных спиртов включают, не ограничиваясь приведенным, моногликозиды, соединения, полученные восстановлением дисахарида, такие, как лактоза, мальтоза, лактулоза и мальтулоза. Гликозидная боковая группа может быть гликозидной или галактозидной. Дополнительные примеры сахарных спиртов включают, не ограничиваясь приведенным, глюцитол, мальтитол, лактитол и изо-мальтулозу. В конкретных вариантах исполнения, трегалозу или сукрозу используют в качестве лиопротектантов.

[0318] Лиопротектант добавляют в предварительно лиофилизированную композицию в "лиозащитном количестве", что означает, что после лиофилизации белка в присутствии лиозащитного количества лиопротектанта, белок в существенной степени сохраняет свою физическую и химическую стабильность и целостность после лиофилизации и хранения.

[0319] В одном варианте исполнения, молярное соотношение лиопротектанта (например, трегалозы) и молекул анти-IL-6 антитела композиции в соответствии с данным изобретением составляет как минимум приблизительно 10, как минимум приблизительно 50, как минимум приблизительно 100, как минимум приблизительно 200, или как минимум приблизительно 300. В другом варианте исполнения, молярное соотношение лиопротектанта (например, трегалозы) и молекул анти-IL-6 антитела композиции в соответствии с данным изобретением составляет приблизительно 1, составляет приблизительно 2, приблизительно 5, приблизительно 10, приблизительно 50, приблизительно 100, приблизительно 200, или приблизительно 300.

[0320] "Восстановленной" композицией является композиция, которая была получена путем растворения лиофилизованной композиции антитела в таком разбавителе, что антитело диспергируется в восстановленной композиции. Восстановленная композиция приемлема для введения (например, парентерального введения) пациенту, который подлежит лечению рассматриваемым белком и, в определенных вариантах исполнения в соответствии с данным изобретением, может быть приемлема для внутривенного введения.

[0321] Рассматриваемый "разбавитель" в данной заявке представляет собой разбавитель, который фармацевтически приемлем (безопасен и нетоксичен для введения человеку) и является полезным для получения жидкой композиции, такой, как композиция, восстановленная после лиофилизации. В некоторых вариантах исполнения, разбавители включают, не ограничиваясь приведенным, стерильную воду, бактериостатическую воду для инъекций (БВДИ), pH буферный раствор (например, фосфатно-буферный раствор), стерильный солевой раствор, раствор Рингера или раствор декстрозы. В альтернативном варианте исполнения, разбавители могут включать водные растворы солей и/или буферов.

[0322] В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением является лиофилизованной композицией, содержащей IL-6 антитело в соответствии с данным изобретением, где как минимум приблизительно 90%, как минимум приблизительно 95%, как минимум приблизительно 97%, как минимум приблизительно 98%, или как минимум приблизительно 99% указанного антитела может быть восстановлено из ампулы после встряхивания указанной ампулы в течение 4 часов при скорости 400 встряхиваний в минуту, где указанную ампулу наполняют наполовину ее объема указанной композицией. В другом варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением является лиофилизованной композицией, содержащей IL-6 антитело в соответствии с данным изобретением, где как минимум приблизительно 90%, как минимум приблизительно 95%, как минимум приблизительно 97%, как минимум приблизительно 98%, или как минимум приблизительно 99% указанного антитела может быть восстановлено из ампулы после того, как композицию подвергают трем циклам замораживания/оттаивания, где указанную ампулу наполняют наполовину ее объема указанной композицией. В дополнительном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением является лиофилизованной композицией, содержащей IL-6 антитело в соответствии с данным изобретением, где как минимум приблизительно 90%, как минимум приблизительно 95%, как минимум приблизительно 97%, как минимум приблизительно 98%, или как минимум приблизительно 99% указанного антитела может быть восстановлено путем восстановления лиофилизованной лепешки, полученной из указанной композиции.

[0323] В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением является лиофилизованной композицией, содержащей IL-6, где как минимум приблизительно 90%, как минимум приблизительно 95%, как минимум приблизительно 97%, как минимум приблизительно 98%, или как минимум приблизительно 99% указанного антитела может быть восстановлено из ампулы после встряхивания указанной ампулы в течение 4 часов при скорости 400 встряхиваний в минуту, где указанную ампулу наполняют наполовину ее объема указанной композицией. В другом варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением является лиофилизованной композицией, содержащей IL-6 антитело в соответствии с данным изобретением, где как минимум приблизительно 90%, как минимум приблизительно 95%, как минимум приблизительно 97%, как минимум приблизительно 98%, или как минимум приблизительно 99% указанного антитела может быть восстановлено из ампулы после того, как композицию подвергают трем циклам замораживания/оттаивания, где указанную ампулу наполняют наполовину ее объема указанной композицией. В дополнительном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением является лиофилизованной композицией, содержащей IL-6 антитело в соответствии с данным изобретением, где как минимум приблизительно 90%, как минимум приблизительно 95%, как минимум приблизительно 97%, как минимум приблизительно 98%, или как минимум приблизительно 99% указанного антитела может быть восстановлено путем восстановления лиофилизованной лепешки, полученной из указанной композиции.

[0324] В одном варианте исполнения, лиофилизованная композиция в соответствии с данным изобретением содержит молекулы анти-IL-6 антитела, где как минимум приблизительно 90%, как минимум приблизительно 95%, как минимум приблизительно 97%, как минимум приблизительно 98%, или как минимум приблизительно 99% указанного антитела восстанавливают путем восстановления указанной лиофилизованной композиции при хранении при приблизительно 40°C в течение как

приблизительно 4 месяцев, приблизительно 5 месяцев, или приблизительно 6 месяцев.

[0327] В одном варианте исполнения, лиофилизованная композиция в соответствии с данным изобретением содержит молекулы анти-IL-6 антитела, где как минимум приблизительно 90%, как минимум приблизительно 95%, как минимум приблизительно 97%, как минимум приблизительно 98%, или как минимум приблизительно 99% указанного антитела получают путем восстановления указанной лиофилизованной композиции при хранении при приблизительно 5°C в течение приблизительно 1 месяца, приблизительно 2 месяцев, приблизительно 3 месяцев, приблизительно 4 месяцев, приблизительно 5 месяцев, приблизительно 6 месяцев, приблизительно 7 месяцев, приблизительно 8 месяцев, приблизительно 9 месяцев, приблизительно 10 месяцев, приблизительно 11 месяцев, или приблизительно 12 месяцев. В одном варианте исполнения, лиофилизованная композиция в соответствии с данным изобретением содержит молекулы анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением, где как минимум приблизительно 90%, как минимум приблизительно 95%, как минимум приблизительно 97%, как минимум приблизительно 98%, или как минимум приблизительно 99% указанного антитела получают путем восстановления указанной лиофилизованной композиции при хранении при приблизительно 5°C в течение приблизительно 1 года, приблизительно 2 лет, приблизительно 3 лет, приблизительно 4 лет, или приблизительно 5 лет.

[0328] В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением представляет собой восстановленную композицию. В определенных вариантах исполнения, восстановленную жидкую композицию в соответствии с данным изобретением получают из лиофилизованной композиции, описанной в данной заявке.

[0329] В одном варианте исполнения, восстановленная жидкая композицию в соответствии с данным изобретением содержит анти-IL-6 антитело при той же концентрации, что и предварительно лиофилизованная жидкая композиция.

[0330] В одном варианте исполнения, восстановленная жидкая композиция в соответствии с данным изобретением содержит анти-IL-6 антитело при более высокой концентрации, чем предварительно лиофилизованная жидкая композиция. В конкретных вариантах исполнения, восстановленная жидкая композиция содержит приблизительно в 2 раза, приблизительно 3 раза, приблизительно 4 раза, приблизительно 5 раз, приблизительно 6 раз, приблизительно 7 раз, приблизительно 8 раз, приблизительно 9 раз, приблизительно 10 раз, приблизительно 15 раз, приблизительно 20 раз, приблизительно 30 раз, приблизительно 40 раз более высокую концентрацию анти-IL-6 антитела, чем предварительно лиофилизованная жидкая композиция.

[0331] В одном варианте исполнения, восстановленная жидкая композиция в соответствии с данным изобретением содержит анти-IL-6 антитело при более низкой концентрации, чем предварительно лиофилизованная жидкая композиция. В конкретных вариантах исполнения, восстановленная жидкая композиция содержит приблизительно 2 раза, приблизительно 3 раза, приблизительно 4 раза, приблизительно 5 раз, приблизительно 6 раз, приблизительно 7 раз, приблизительно 8 раз, приблизительно 9 раз, приблизительно 10 раз, приблизительно 15 раз, приблизительно 20 раз, приблизительно 30 раз, приблизительно 40 раз более низкую концентрацию анти-IL-6 антитела, чем предварительно лиофилизованная жидкая композиция.

[0332] В одном варианте исполнения, восстановленная жидкая композиция в соответствии с данным изобретением является водной композицией. В конкретном варианте исполнения, восстановленная жидкая композиция в соответствии с данным изобретением является водной композицией, где водный носитель является

дистиллированной водой.

[0333] В одном варианте исполнения, восстановленная композиция в соответствии с данным изобретением является стерильной.

5 [0334] В одном варианте исполнения, восстановленная композиция в соответствии с данным изобретением является гомогенной.

[0335] В одном варианте исполнения, восстановленная композиция в соответствии с данным изобретением является изотонической. В одном варианте исполнения, восстановленная композиция в соответствии с данным изобретением является гипотонической. В одном варианте исполнения, восстановленная композиция в соответствии с данным изобретением является гипертонической.

[0336] В определенных вариантах исполнения, восстановленные композиции в соответствии с данным изобретением имеют (или содержат как гранулированную фракцию) профиль частиц менее чем приблизительно 3,4 E + 5 частиц/мл диаметра 2-4 мкм, менее чем приблизительно 4,0 E + 4 частиц/мл диаметра 4-10 мкм, менее чем
15 приблизительно 4,2 E + 3 частиц/мл диаметра 10-20 мкм, менее чем приблизительно 5,0 E + 2 частиц/мл диаметра 20-30 мкм, менее чем приблизительно 7,5 E + 1 частиц/мл диаметра 30-40 мкм и менее чем приблизительно 9,4 частиц/мл диаметра 40-60 мкм как определено при помощи счетчика частиц. В определенных вариантах исполнения, восстановленные композиции в соответствии с данным изобретением не содержат
20 детектируемых частиц более 40 мкм, или более 30 мкм.

[0337] В определенных вариантах исполнения, после хранения в течение приблизительно 1 часа, приблизительно 2 часов, приблизительно 3 часов, приблизительно 4 часов, приблизительно 5 часов, приблизительно 6 часов, приблизительно 7 часов, приблизительно 8 часов, приблизительно 9 часов,
25 приблизительно 12 часов, приблизительно 15 часов, приблизительно 18 часов, или приблизительно 24 часов восстановленные жидкие композиции в соответствии с данным изобретением содержат (или как гранулированную фракцию) профиль частиц менее чем приблизительно 3,4 E + 5 частиц/мл диаметра 2-4 мкм, менее чем приблизительно 4,0 E + 4 частиц/мл диаметра 4-10 мкм, менее чем приблизительно 4,2 E + 3 частиц/мл
30 диаметра 10-20 мкм, менее чем приблизительно 5,0 E + 2 частиц/мл диаметра 20-30 мкм, менее чем приблизительно 7,5 E + 1 частиц/мл диаметра 30-40 мкм и менее чем приблизительно 9,4 частиц/мл диаметра 40-60 мкм как определено при помощи счетчика частиц. В определенных вариантах исполнения, жидкие композиции в соответствии с данным изобретением не содержат детектируемых частиц более 40 мкм, или более 30
35 мкм.

[0338] В конкретных вариантах исполнения, фармацевтические композиции включают, не ограничиваясь приведенным:

- (a) стерильную жидкую композицию, состоящую из 100 мг/мл антитела, 25 mM гистидина, 1,6 mM глицина при pH 6,0;
- 40 (b) стерильную жидкую композицию, состоящую из 100 мг/мл антитела и 25 mM гистидина при pH 6,0;
- (c) стерильную жидкую композицию, состоящую из 5 мг/мл антитела, 20 mM лимонной кислоты, 100 mM NaCl, 1,5% маннитола, 50 1 ДТПК (диэтилтриаминпентауксусной кислоты) и 0,02% PS80 при pH 6,0;
- 45 (d) стерильную жидкую композицию, состоящую из 100 мг/мл антитела, 25 mM гистидина, 8% трегалозы и 0,02% PS80 при pH 6,0;
- (e) стерильную жидкую композицию, состоящую из 20 мг/мл антитела, 10 mM His, 2,35% (мас./об.) лизина-HCl и 0,02% PS-80 (мас./об.) при pH 6,0;

(f) стерильную жидкую композицию, состоящую из 5 мг/мл антитела, 10 мМ буфера цитрата натрия, NaCl (0,15М) и Tween 80 (0,02%) при pH 6,0;

(g) стерильную жидкую композицию, состоящую из 100 мг/мл антитела, 10 мМ гистидина и 150 мМ NaCl при pH 6,0.

5 [0339] В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением стабилизирует анти-IL-6 антитело в соответствии с данным изобретением. В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением предотвращает агрегацию анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением. В другом варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением
10 предотвращает фрагментацию анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением.

[0340] В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением является стабильной при хранении приблизительно при 40°C в течение как минимум приблизительно 1 недели, как минимум приблизительно 2 недель, как
15 минимум приблизительно 3 недель, или как минимум приблизительно 4 недель. В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением является стабильной при хранении при приблизительно 40°C в течение как минимум приблизительно 1 месяца, как минимум приблизительно 2 месяцев, как минимум приблизительно 3 месяцев, как минимум приблизительно 4 месяцев, как минимум
20 приблизительно 5 месяцев, или как минимум приблизительно 6 месяцев. В конкретном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением является стабильной после хранения в предварительно наполненном шприце.

[0341] В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением является стабильной при хранении приблизительно при 25°C в течение как минимум приблизительно 1 недели, как минимум приблизительно 2 недель, как
25 минимум приблизительно 3 недель, или как минимум приблизительно 4 недель. В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением является стабильной при хранении при приблизительно 25°C в течение как минимум приблизительно 1 месяца, как минимум приблизительно 2 месяцев, как минимум
30 приблизительно 3 месяцев, как минимум приблизительно 4 месяцев, как минимум приблизительно 5 месяцев, или как минимум приблизительно 6 месяцев. В конкретном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением является стабильной после хранения в предварительно наполненном шприце.

[0342] В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением является стабильной при хранении приблизительно при 5°C в течение как минимум приблизительно 1 месяца, как минимум приблизительно 2 месяцев, как
35 минимум приблизительно 3 месяцев, как минимум приблизительно 4 месяцев, как минимум приблизительно 5 месяцев, как минимум приблизительно 6 месяцев, как минимум приблизительно 7 месяцев, как минимум приблизительно 8 месяцев, как минимум приблизительно 9 месяцев, как минимум приблизительно 10 месяцев, как минимум приблизительно 11 месяцев, или как минимум приблизительно 12 месяцев. В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением является стабильной при хранении приблизительно при 5°C в течение как минимум
40 приблизительно 1 года, как минимум приблизительно 2 лет, как минимум приблизительно 3 лет, как минимум приблизительно 4 лет, как минимум приблизительно 5 лет, как минимум приблизительно 6 лет, как минимум приблизительно 7 лет, как минимум приблизительно 8 лет, как минимум приблизительно 9 лет, как минимум приблизительно 10 лет, как минимум приблизительно 11 лет, или как минимум

приблизительно 12 лет. В конкретном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением является стабильной после хранения в предварительно наполненном шприце.

[0343] В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением является стабильной при хранении приблизительно при 40°C в течение приблизительно 1 недели, приблизительно 2 недель, приблизительно 3 недель, или приблизительно 4 недель. В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением является стабильной при хранении приблизительно при 40°C в течение приблизительно 1 месяца, приблизительно 2 месяцев, приблизительно 3 месяцев, приблизительно 4 месяцев, приблизительно 5 месяцев, или приблизительно 6 месяцев. В конкретном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением является стабильной после хранения в предварительно наполненном шприце.

[0344] В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением является стабильной при хранении приблизительно при 25°C в течение приблизительно 1 недели, приблизительно 2 недель, приблизительно 3 недель, или приблизительно 4 недель. В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением является стабильной при хранении приблизительно при 25°C в течение приблизительно 1 месяца, приблизительно 2 месяцев, приблизительно 3 месяцев, приблизительно 4 месяцев, приблизительно 5 месяцев, или приблизительно 6 месяцев. В конкретном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением является стабильной после хранения в предварительно наполненном шприце.

[0345] В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением является стабильной при хранении при приблизительно 5°C в течение приблизительно 1 месяца, приблизительно 2 месяцев, приблизительно 3 месяцев, приблизительно 4 месяцев, приблизительно 5 месяцев, или приблизительно 6 месяцев, приблизительно 7 месяцев, приблизительно 8 месяцев, приблизительно 9 месяцев, приблизительно 10 месяцев, приблизительно 11 месяцев, или приблизительно 12 месяцев. В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением является стабильной при хранении при приблизительно 5°C в течение приблизительно 1 года, приблизительно 2 лет, приблизительно 3 лет, приблизительно 4 лет, приблизительно 5 лет, приблизительно 6 лет, приблизительно 7 лет, приблизительно 8 лет, приблизительно 9 лет, приблизительно 10 лет, приблизительно 11 лет, или приблизительно 12 лет. В конкретном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением является стабильной после хранения в предварительно наполненном шприце.

[0346] Данное изобретение представляет стабильные композиции, содержащие анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением. Стабильность указанного антитела может быть оценена при помощи степеней агрегации, распада или фрагментации, согласно измерениям ВЭЭХ, обратнофазной хроматографии, статического рассеяния света (СРС), инфракрасной спектроскопии с Фурье-преобразованием (ФТ-ИК), циркулярного дихроизма (ЦД), методов разворачивания мочевины, собственной флуоресценции триптофана, дифференциальной сканирующей калориметрии, и/или АНС методов связывания, по сравнению с реперной композицией, содержащей реперное антитело. Например, реперная композиция может быть реперным стандартом, замороженным при -70°C, состоящим из 10 мг/мл реперного антитела антитело (включая его антителный фрагмент) (например, но, не ограничиваясь приведенным, антитело, содержащее 16С4 переменный участок и Fc участок, имеющий комплексные N-гликозид-связанные сахарные цепи, в которых фукоза не связана с N-

ацетилглюкозамином на восстанавливающем конце в сахарной цепи) в 10 мМ гистидина (рН 6,0), содержащий 75 мМ NaCl и 4% трегалозы, где реперная композиция регулярно дает один мономерный пик (например, $\geq 95\%$ площади) при помощи ВЭХ. В

определенных вариантах исполнения, реперная композиция идентична композиции, стабильность которой анализируют; реперная композиция может храниться замороженной при -70°C во время анализа стабильности для сохранения реперной композиции в ее исходном состоянии. Например, реперный стандарт для анализа какой-либо потери активности связывания IL-6 антигена в композиции, которую хранят при 40°C , может быть идентичен композиции, которую хранят при -70°C в течение 30 дней.

Общая стабильность композиции, содержащей антитело (включая его антителный фрагмент) может быть также оценена при помощи различных иммунологических анализов, включая, например, ELISA и радиоиммунологическое исследование с использованием выделенных молекул антигенов. Дополнительно, стабильность композиции, содержащей антитело, может быть оценена при помощи различных анализов, разработанных для измерения функциональных характеристик антитела, например, анализов, разработанных для измерения аффинности связывания антигена, активности *in vitro* антитело-зависимой клеточно-обусловленной цитотоксичности, активности истощения *in vivo*, *in vitro* анализа ЦДС, анализов ингибирования, анализов клеточной пролиферации и т.д.

[0347] В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит анти-IL-6 антитело в соответствии с данным изобретением, имеющее IL-6 активность связывания как минимум 50%, как минимум 60%, как минимум 70%, как минимум 80%, как минимум 90%, как минимум 95%, или как минимум 99% IL-6 активности связывания реперного антитела, где указанную композицию хранили при приблизительно 40°C в течение как минимум приблизительно 1 недели, как минимум приблизительно 2 недель, как минимум приблизительно 3 недель, или как минимум приблизительно 4 недели. В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит анти-IL-6 антитело в соответствии с данным изобретением, имеющее IL-6 активность связывания, составляющую как минимум на 50%, как минимум 60%, как минимум 70%, как минимум 80%, как минимум 90%, как минимум 95%, или как минимум 99% IL-6 активности связывания реперного антитела, где указанную композицию хранили при приблизительно 40°C , в течение как минимум приблизительно 1 месяца, приблизительно 2 месяцев, приблизительно 3 месяцев, приблизительно 4 месяцев, приблизительно 5 месяцев, приблизительно 6 месяцев. В конкретном варианте исполнения, композицию в соответствии с данным изобретением хранят в предварительно наполненном шприце. В конкретном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит анти-IL-6 антитело в соответствии с данным изобретением, имеющее пролонгированный период полувыведения.

[0348] В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит анти-IL-6 антитело, которое имеет IL-6 активность связывания, составляющую как минимум 50%, как минимум 60%, как минимум 70%, как минимум 80%, как минимум 90%, как минимум 95%, или как минимум 99% IL-6 активности связывания реперного антитела, где указанную композицию хранили при приблизительно 25°C в течение как минимум приблизительно 1 недели, как минимум приблизительно 2 недель, как минимум приблизительно 3 недель, или как минимум приблизительно 4 недели. В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит анти-IL-6 антитело, которое имеет IL-6 активность

связывания, составляющую как минимум 50%, как минимум 60%, как минимум 70%, как минимум 80%, как минимум 90%, как минимум 95%, или как минимум 99% IL-6 активности связывания реперного антитела, где указанную композицию хранили при приблизительно 25°C в течение как минимум приблизительно 1 месяца, приблизительно 2 месяцев, приблизительно 3 месяцев, приблизительно 4 месяцев, приблизительно 5 месяцев, приблизительно 6 месяцев. В конкретном варианте исполнения, композицию в соответствии с данным изобретением хранят в предварительно наполненном шприце. В конкретном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит анти-IL-6 антитело в соответствии с данным изобретением, имеющее пролонгированный период полувыведения.

[0349] В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит анти-IL-6 антитело, которое имеет IL-6 активность связывания, составляющую как минимум 50%, как минимум 60%, как минимум 70%, как минимум 80%, как минимум 90%, как минимум 95%, или как минимум 99% IL-6 активности связывания реперного антитела, где указанную композицию хранили при приблизительно 5°C в течение как минимум приблизительно 1 месяца, как минимум приблизительно 2 месяца, как минимум приблизительно 3 месяца, как минимум приблизительно 4 месяца, как минимум приблизительно 5 месяцев, как минимум приблизительно 6 месяцев, как минимум приблизительно 7 месяцев, как минимум приблизительно 8 месяцев, как минимум приблизительно 9 месяцев, как минимум приблизительно 10 месяцев, как минимум приблизительно 11 месяцев, или как минимум приблизительно 12 месяцев. В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит анти-IL-6 антитело, которое имеет IL-6 активность связывания, составляющую как минимум 50%, как минимум 60%, как минимум 70%, как минимум 80%, как минимум 90%, как минимум 95%, или как минимум 99% IL-6 активности связывания реперного антитела, где указанную композицию хранили при приблизительно 5°C в течение как минимум приблизительно 1 года, как минимум приблизительно 2 лет, как минимум приблизительно 3 лет, как минимум приблизительно 4 лет, как минимум приблизительно 5 лет, как минимум приблизительно 6 лет, как минимум приблизительно 7 лет, как минимум приблизительно 8 лет, как минимум приблизительно 9 лет, как минимум приблизительно 10 лет, как минимум приблизительно 11 лет, или как минимум приблизительно 12 лет. В конкретном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит анти-IL-6 антитело, имеющее пролонгированный период полувыведения.

[0350] В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит анти-IL-6 антитело, которое имеет IL-6 активность связывания, составляющую как минимум 50%, как минимум 60%, как минимум 70%, как минимум 80%, как минимум 90%, как минимум 95%, или как минимум 99% IL-6 активности связывания реперного антитела, где указанную композицию хранили при приблизительно 40°C в течение приблизительно 1 недели, приблизительно 2 недель, приблизительно 3 недель, или приблизительно 4 недели. В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит анти-IL-6 антител, которое имеет IL-6 активность связывания, составляющую как минимум 50%, как минимум 60%, как минимум 70%, как минимум 80%, как минимум 90%, как минимум 95%, или как минимум 99% IL-6 активности связывания реперного антитела, где указанную композицию хранили при приблизительно 40°C в течение приблизительно 1 месяца, приблизительно 2 месяца, приблизительно 3 месяца, приблизительно 4 месяца, приблизительно 5 месяца, или приблизительно 6 месяца. В конкретном варианте

исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит анти-IL-6 антитело, имеющее пролонгированный период полувыведения.

[0351] В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит анти-IL-6 антитело, которое имеет IL-6 активность связывания, составляющую как минимум 50%, как минимум 60%, как минимум 70%, как минимум 80%, как минимум 90%, как минимум 95%, или как минимум 99% IL-6 активности связывания реперного антитела, где указанную композицию хранили при приблизительно 25°C в течение приблизительно 1 недели, приблизительно 2 недель, приблизительно 3 недель, или приблизительно 4 недели. В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит анти-IL-6 антитело, которое имеет IL-6 активность связывания, составляющую как минимум 50%, как минимум 60%, как минимум 70%, как минимум 80%, как минимум 90%, как минимум 95%, или как минимум 99% IL-6 активности связывания реперного антитела, где указанную композицию хранили при приблизительно 25°C в течение приблизительно 1 месяца, приблизительно 2 месяца, приблизительно 3 месяца, приблизительно 4 месяца, приблизительно 5 месяцев, или приблизительно 6 месяцев. В конкретном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит анти-IL-6 антитело, имеющее пролонгированный период полувыведения.

[0352] В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит анти-IL-6 антитело, которое имеет IL-6 активность связывания, составляющую как минимум 50%, как минимум 60%, как минимум 70%, как минимум 80%, как минимум 90%, как минимум 95%, или как минимум 99% IL-6 активности связывания реперного антитела, где указанную композицию хранили при приблизительно 5°C в течение приблизительно 1 месяца, приблизительно 2 месяцев, приблизительно 3 месяцев, приблизительно 4 месяцев, приблизительно 5 месяцев, приблизительно 6 месяцев, приблизительно 7 месяцев, приблизительно 8 месяцев, приблизительно 9 месяцев, приблизительно 10 месяцев, приблизительно 11 месяцев, или приблизительно 12 месяцев. В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит анти-IL-6 антитело, которое имеет IL-6 активность связывания, составляющую как минимум 50%, как минимум 60%, как минимум 70%, как минимум 80%, как минимум 90%, как минимум 95%, или как минимум 99% IL-6 активности связывания реперного антитела, где указанную композицию хранили при приблизительно 5°C в течение приблизительно 1 года, приблизительно 2 лет, приблизительно 3 лет, приблизительно 4 лет, приблизительно 5 лет, приблизительно 6 лет, приблизительно 7 лет, приблизительно 8 лет, приблизительно 9 лет, приблизительно 10 лет, приблизительно 11 лет, или приблизительно 12 лет. В конкретном варианте исполнения, композицию в соответствии с данным изобретением хранят в предварительно наполненном шприце. В конкретном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит анти-IL-6 антитело, имеющее пролонгированный период полувыведения.

[0353] В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит анти-IL-6 антитело, где антитело теряет не более чем 50%, не более чем 40%, не более чем 30%, не более чем 20%, не более чем 10%, не более чем 5%, или не более чем 1% его IL-6 активности связывания во время хранения композиции при приблизительно 40°C в течение как минимум приблизительно 1 недели, как минимум приблизительно 2 недель, как минимум приблизительно 3 недель, или как минимум приблизительно 4 недель. В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит анти-IL-6, где антитело теряет не более чем 50%, не

или не более чем 1% его IL-6 активности связывания во время хранения композиции при приблизительно 5°C в течение приблизительно 1 месяца, приблизительно 2 месяцев, приблизительно 3 месяцев, приблизительно 4 месяцев, приблизительно 5 месяцев, приблизительно 6 месяцев, приблизительно 7 месяцев, приблизительно 8 месяцев, приблизительно 9 месяцев, приблизительно 10 месяцев, приблизительно 11 месяцев, или приблизительно 12 месяцев. В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит анти-IL-6 антитело в соответствии с данным изобретением, где антитело теряет не более чем 50%, не более чем 40%, не более чем 30%, не более чем 20%, не более чем 10%, не более чем 5%, или не более чем 1% его IL-6 активности связывания во время хранения композиции при приблизительно 5°C в течение приблизительно 1 года, приблизительно 2 лет, приблизительно 3 лет, приблизительно 4 лет, приблизительно 5 лет, приблизительно 6 лет, приблизительно 7 лет, приблизительно 8 лет, приблизительно 9 лет, приблизительно 10 лет, приблизительно 11 лет, или приблизительно 12 лет. В конкретном варианте исполнения, композицию в соответствии с данным изобретением хранят в предварительно наполненном шприце. В конкретном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит анти-IL-6 антитело, имеющее пролонгированный период полувыведения.

[0360] В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит анти-IL-6 антитело, где менее чем 1%, менее чем 2%, менее чем 3%, менее чем 4%, менее чем 5%, менее чем 7% или менее чем 10% указанного антитела образует агрегат, что определено при помощи ВЭЭХ при хранении при приблизительно 40°C в течение как минимум приблизительно 1 недели, как минимум приблизительно 2 недель, как минимум приблизительно 3 недель, или как минимум приблизительно 4 недель. В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит анти-IL-6 антитело, где менее чем 1%, менее чем 2%, менее чем 3%, менее чем 4%, менее чем 5%, менее чем 7% или менее чем 10% указанного антитела образует агрегат, как определено при помощи ВЭЭХ при хранении при приблизительно 40°C в течение как минимум приблизительно 1 месяца, приблизительно 2 месяцев, приблизительно 3 месяцев, приблизительно 4 месяцев, приблизительно 5 месяцев, приблизительно 6 месяцев. В конкретном варианте исполнения, композицию в соответствии с данным изобретением хранят в предварительно наполненном шприце. В конкретном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит анти-IL-6 антитело, имеющее пролонгированный период полувыведения.

[0361] В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит анти-IL-6 антитело, где менее чем 1%, менее чем 2%, менее чем 3%, менее чем 4%, менее чем 5%, менее чем 7% или менее чем 10% указанного антитела образует агрегат, что определено при помощи ВЭЭХ при хранении при приблизительно 25°C в течение как минимум приблизительно 1 недели, как минимум приблизительно 2 недель, как минимум приблизительно 3 недель, или как минимум приблизительно 4 недель. В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит анти-IL-6 антитело, где менее чем 1%, менее чем 2%, менее чем 3%, менее чем 4%, менее чем 5%, менее чем 7% или менее чем 10% указанного антитела образует агрегат, что определено при помощи ВЭЭХ при хранении при приблизительно 25°C в течение, как минимум приблизительно 1 месяца, приблизительно 2 месяцев, приблизительно 3 месяцев, приблизительно 4 месяцев, приблизительно 5 месяцев, приблизительно 6 месяцев. В конкретном варианте исполнения, композицию в соответствии с данным изобретением хранят в предварительно наполненном шприце. В конкретном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением

хранении при приблизительно 25°C в течение приблизительно 1 месяц, приблизительно 2 месяцев, приблизительно 3 месяцев, приблизительно 4 месяцев, приблизительно 5 месяцев, или приблизительно 6 месяцев. В конкретном варианте исполнения, композицию в соответствии с данным изобретением хранят в предварительно наполненном шприце.

5 В конкретном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит анти-IL-6 антитело, имеющее пролонгированный период полувыведения.

[0365] В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит анти-IL-6 антитело, где менее чем 1%, менее чем 2%, менее чем 3%, менее чем 4%, менее чем 5%, менее чем 7% или менее чем 10% указанного антитела образует агрегат, что определено при помощи ВЭХ при хранении при приблизительно 5°C в течение приблизительно 1 месяца, приблизительно 2 месяцев, приблизительно 3 месяцев, приблизительно 4 месяцев, приблизительно 5 месяцев, приблизительно 6 месяцев, приблизительно 7 месяцев, приблизительно 8 месяцев, приблизительно 9 месяцев, приблизительно 10 месяцев, приблизительно 11 месяцев, или приблизительно 12 месяцев.

15 В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит анти-IL-6 антитело, где менее, чем 1%, менее чем 2%, менее чем 3%, менее чем 4%, менее чем 5%, менее чем 7% или менее чем 10% указанного антитела образует агрегат как определено при помощи ВЭХ при хранении при приблизительно 5°C в течение приблизительно 1 года, приблизительно 2 лет, приблизительно 3 лет,

20 приблизительно 4 лет, приблизительно 5 лет, приблизительно 6 лет, приблизительно 7 лет, приблизительно 8 лет, приблизительно 9 лет, приблизительно 10 лет, приблизительно 11 лет, или приблизительно 12 лет. В конкретном варианте исполнения, композицию в соответствии с данным изобретением хранят в предварительно наполненном шприце. В конкретном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением

25 содержит анти-IL-6 антитело, имеющее пролонгированный период полувыведения.

[0366] В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит анти-IL-6 антитело, где менее чем 1%, менее чем 2%, менее чем 3%, менее чем 4%, менее чем 5%, менее, чем 7% или менее, чем 10% указанного антитела фрагментируется, что определено при помощи обращенно-фазной ВЭЖХ или ЭХ при хранении при приблизительно 40°C в течение, как минимум приблизительно 1 недели, как минимум приблизительно 2 недель, как минимум приблизительно 3 недель, или как минимум приблизительно 4 недель. В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит анти-IL-6 антитело, где менее чем 1%, менее чем 2%, менее чем 3%, менее чем 4%, менее чем 5%, менее чем 7% или менее чем 10% указанного антитела фрагментируется, что определено при помощи обращенно-фазной ВЭЖХ или ЭХ при хранении при приблизительно 40°C в течение, как минимум приблизительно 1 месяца, приблизительно 2 месяцев, приблизительно 3 месяцев, приблизительно 4 месяцев, приблизительно 5 месяцев, приблизительно 6 месяцев. В конкретном варианте исполнения, композицию в соответствии с данным изобретением хранят в предварительно наполненном шприце. В конкретном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит анти-IL-6 антитело, имеющее пролонгированный период полувыведения.

[0367] В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит анти-IL-6 антитело, где менее чем 1%, менее чем 2%, менее чем 3%, менее чем 4%, менее чем 5%, менее чем 7% или менее чем 10% указанного антитела фрагментируется, что определено при помощи обращенно-фазной ВЭЖХ или ЭХ при хранении при приблизительно 25°C в течение, как минимум приблизительно 1 недели, как минимум приблизительно 2 недель, как минимум приблизительно 3 недель, или как

минимум приблизительно 4 недели. В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит анти-IL-6 антитело, где менее чем 1%, менее чем 2%, менее чем 3%, менее чем 4%, менее чем 5%, менее чем 7% или менее чем 10% указанного антитела фрагментируется, что определено при помощи обращенно-фазной ВЭЖХ или ЭХ при хранении при приблизительно 25°C в течение, как минимум приблизительно 1 месяца, приблизительно 2 месяцев, приблизительно 3 месяцев, приблизительно 4 месяцев, приблизительно 5 месяцев, приблизительно 6 месяцев. В конкретном варианте исполнения, композицию в соответствии с данным изобретением хранят в предварительно наполненном шприце. В конкретном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит анти-IL-6 антитело, имеющее пролонгированный период полувыведения.

[0368] В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит анти-IL-6 антитело, где менее чем 1%, менее чем 2%, менее чем 3%, менее чем 4%, менее чем 5%, менее чем 7% или менее чем 10% указанного антитела фрагментируется, что определено при помощи обращенно-фазной ВЭЖХ или ЭХ при хранении при приблизительно 5°C в течение, как минимум приблизительно 1 месяц, как минимум приблизительно 2 месяца, как минимум приблизительно 3 месяца, как минимум приблизительно 4 месяца, как минимум приблизительно 5 месяцев, как минимум приблизительно 6 месяцев, как минимум приблизительно 7 месяцев, как минимум приблизительно 8 месяцев, как минимум приблизительно 9 месяцев, как минимум приблизительно 10 месяцев, как минимум приблизительно 11 месяцев, или как минимум приблизительно 12 месяцев. В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит анти-IL-6 антитело, где менее чем 1%, менее чем 2%, менее чем 3%, менее чем 4%, менее чем 5%, менее чем 7% или менее чем 10% указанного антитела фрагментируется, что определено при помощи обращенно-фазной ВЭЖХ или ЭХ при хранении при приблизительно 5°C в течение, как минимум приблизительно 1 года, как минимум приблизительно 2 лет, как минимум приблизительно 3 лет, как минимум приблизительно 4 лет, как минимум приблизительно 5 лет, как минимум приблизительно 6 лет, как минимум приблизительно 7 лет, как минимум приблизительно 8 лет, как минимум приблизительно 9 лет, как минимум приблизительно 10 лет, как минимум приблизительно 11 лет, или как минимум приблизительно 12 лет. В конкретном варианте исполнения, композицию в соответствии с данным изобретением хранят в предварительно наполненном шприце. В конкретном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит анти-IL-6 антитело, имеющее пролонгированный период полувыведения.

[0369] В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит анти-IL-6 антитело, где менее чем 1%, менее чем 2%, менее чем 3%, менее чем 4%, менее чем 5%, менее чем 7% или менее чем 10% указанного антитела фрагментируется, что определено при помощи обращенно-фазной ВЭЖХ или ЭХ при хранении при приблизительно 40°C в течение приблизительно 1 недели, приблизительно 2 недель, приблизительно 3 недель, или приблизительно 4 недель. В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит анти-IL-6 антитело, где менее чем 1%, менее чем 2%, менее чем 3%, менее чем 4%, менее чем 5%, менее чем 7% или менее чем 10% указанного антитела фрагментируется, что определено при помощи обращенно-фазной ВЭЖХ или ЭХ при хранении при приблизительно 40°C в течение приблизительно 1 месяц, приблизительно 2 месяца, приблизительно 3 месяца, приблизительно 4 месяца, приблизительно 5 месяцев, или приблизительно 6 месяцев. В конкретном варианте исполнения, композицию в соответствии с данным изобретением

хранят в предварительно наполненном шприце. В конкретном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит анти-IL-6 антитело, имеющее пролонгированный период полувыведения.

[0370] В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит анти-IL-6 антитело, где менее чем 1%, менее чем 2%, менее чем 3%, менее чем 4%, менее чем 5%, менее чем 7% или менее чем 10% указанного антитела фрагментируется, что определено при помощи обращенно-фазной ВЭЖХ или ЭХ при хранении при приблизительно 25°C в течение приблизительно 1 недели, приблизительно 2 недель, приблизительно 3 недель, или приблизительно 4 недель. В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит анти-IL-6 антитело, где менее чем 1%, менее чем 2%, менее чем 3%, менее чем 4%, менее чем 5%, менее чем 7% или менее чем 10% указанного антитела фрагментируется, что определено при помощи обращенно-фазной ВЭЖХ или ЭХ при хранении при приблизительно 25°C в течение приблизительно 1 месяца, приблизительно 2 месяца, приблизительно 3 месяца, приблизительно 4 месяца, приблизительно 5 месяцев, или приблизительно 6 месяцев. В конкретном варианте исполнения, композицию в соответствии с данным изобретением хранят в предварительно наполненном шприце. В конкретном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит анти-IL-6 антитело, имеющее пролонгированный период полувыведения.

[0371] В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит анти-IL-6 антитело, где менее чем 1%, менее чем 2%, менее чем 3%, менее чем 4%, менее чем 5%, менее чем 7% или менее чем 10% указанного антитела фрагментируется, что определено при помощи обращенно-фазной ВЭЖХ или ЭХ при хранении при приблизительно 5°C в течение приблизительно 1 месяца, приблизительно 2 месяцев, приблизительно 3 месяцев, приблизительно 4 месяцев, приблизительно 5 месяцев, приблизительно 6 месяцев, приблизительно 7 месяцев, приблизительно 8 месяцев, приблизительно 9 месяцев, приблизительно 10 месяцев, приблизительно 11 месяцев, или приблизительно 12 месяцев. В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит анти-IL-6 антитело, где менее чем 1%, менее чем 2%, менее чем 3%, менее чем 4%, менее чем 5%, менее чем 7% или менее чем 10% указанного антитела фрагментируется, что определено при помощи обращенно-фазной ВЭЖХ или ЭХ при хранении при приблизительно 5°C в течение приблизительно 1 года, приблизительно 2 лет, приблизительно 3 лет, приблизительно 4 лет, приблизительно 5 лет, приблизительно 6 лет, приблизительно 7 лет, приблизительно 8 лет, приблизительно 9 лет, приблизительно 10 лет, приблизительно 11 лет, или приблизительно 12 лет. В конкретном варианте исполнения, композицию в соответствии с данным изобретением хранят в предварительно наполненном шприце. В конкретном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит анти-IL-6 антитело, имеющее пролонгированный период полувыведения.

[0372] В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением является прозрачной и бесцветной, что определено при помощи визуального исследования при хранении приблизительно при 40°C в течение, как минимум приблизительно 1 недели, как минимум приблизительно 2 недель, как минимум приблизительно 3 недель, или как минимум приблизительно 4 недель. В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением является прозрачной и бесцветной, что определено при помощи визуального исследования при хранении приблизительно при 40°C в течение, как минимум приблизительно 1 месяца, приблизительно 2 месяцев, приблизительно 3 месяцев, приблизительно 4 месяцев,

приблизительно 5 месяцев, приблизительно 6 месяцев. В конкретном варианте исполнения, композицию в соответствии с данным изобретением хранят в предварительно наполненном шприце. В конкретном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит анти-IL-6 антитело, имеющее

5 пролонгированный период полувыведения.

[0373] В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением является прозрачной и бесцветной, что определено при помощи визуального исследования при хранении приблизительно при 25°C в течение, как минимум приблизительно 1 недели, как минимум приблизительно 2 недель, как минимум

10 приблизительно 3 недель, или как минимум приблизительно 4 недель. В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением является прозрачной и бесцветной, что определено при помощи визуального исследования при хранении приблизительно при 25°C в течение, как минимум приблизительно 1 месяца, приблизительно 2 месяцев, приблизительно 3 месяцев, приблизительно 4 месяцев,

15 приблизительно 5 месяцев, приблизительно 6 месяцев. В конкретном варианте исполнения, композицию в соответствии с данным изобретением хранят в предварительно наполненном шприце. В конкретном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит анти-IL-6 антитело, имеющее пролонгированный период полувыведения.

[0374] В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением является прозрачной и бесцветной, что определено при помощи визуального исследования при хранении приблизительно при 5°C в течение, как минимум приблизительно 1 месяц, как минимум приблизительно 2 месяца, как минимум

20 приблизительно 3 месяца, как минимум приблизительно 4 месяца, как минимум приблизительно 5 месяцев, как минимум приблизительно 6 месяцев, как минимум приблизительно 7 месяцев, как минимум приблизительно 8 месяцев, как минимум

25 приблизительно 9 месяцев, как минимум приблизительно 10 месяцев, как минимум приблизительно 11 месяцев, или как минимум приблизительно 12 месяцев. В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением является

30 прозрачной и бесцветной, что определено при помощи визуального исследования при хранении при приблизительно 5°C в течение, как минимум приблизительно 1 года, как минимум приблизительно 2 лет, как минимум приблизительно 3 лет, как минимум

35 приблизительно 4 лет, как минимум приблизительно 5 лет, как минимум приблизительно 6 лет, как минимум приблизительно 7 лет, как минимум приблизительно 8 лет, как минимум приблизительно 9 лет, как минимум приблизительно 10 лет, как минимум

40 приблизительно 11 лет, или как минимум приблизительно 12 лет. В конкретном варианте исполнения, композицию в соответствии с данным изобретением хранят в предварительно наполненном шприце. В конкретном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит анти-IL-6 антитело, имеющее пролонгированный период полувыведения.

[0375] В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением является прозрачной и бесцветной, что определено при помощи визуального исследования при хранении приблизительно при 40°C в течение

45 приблизительно 1 недели, приблизительно 2 недель, приблизительно 3 недель, или приблизительно 4 недели. В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением является прозрачной и бесцветной, что определено при помощи визуального исследования при хранении приблизительно при 40°C в течение

приблизительно 1 месяц, приблизительно 2 месяца, приблизительно 3 месяца,

приблизительно 4 месяца, приблизительно 5 месяца, или приблизительно 6 месяцев. В конкретном варианте исполнения, композицию в соответствии с данным изобретением хранят в предварительно наполненном шприце. В конкретном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит анти-IL-6 антитело, имеющее пролонгированный период полувыведения.

[0376] В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением является прозрачной и бесцветной, что определено при помощи визуального исследования при хранении приблизительно при 25°C в течение приблизительно 1 недели, приблизительно 2 недель, приблизительно 3 недель, или приблизительно 4 недель. В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением является прозрачной и бесцветной, что определено при помощи визуального исследования при хранении приблизительно при 25°C в течение приблизительно 1 месяца, приблизительно 2 месяца, приблизительно 3 месяца, приблизительно 4 месяца, приблизительно 5 месяцев, или приблизительно 6 месяцев. В конкретном варианте исполнения, композицию в соответствии с данным изобретением хранят в предварительно наполненном шприце. В конкретном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит анти-IL-6 антитело, имеющее пролонгированный период полувыведения.

[0377] В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением является прозрачной и бесцветной, что определено при помощи визуального исследования при хранении приблизительно при 5°C в течение приблизительно 1 месяца, приблизительно 2 месяцев, приблизительно 3 месяцев, приблизительно 4 месяцев, приблизительно 5 месяцев, приблизительно 6 месяцев, приблизительно 7 месяцев, приблизительно 8 месяцев, приблизительно 9 месяцев, приблизительно 10 месяцев, приблизительно 11 месяцев, или приблизительно 12 месяцев. В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением является прозрачной и бесцветной, что определено при помощи визуального исследования при хранении приблизительно при 5°C в течение приблизительно 1 года, приблизительно 2 лет, приблизительно 3 лет, приблизительно 4 лет, приблизительно 5 лет, приблизительно 6 лет, приблизительно 7 лет, приблизительно 8 лет, приблизительно 9 лет, приблизительно 10 лет, приблизительно 11 лет, или приблизительно 12 лет. В конкретном варианте исполнения, композицию в соответствии с данным изобретением хранят в предварительно наполненном шприце. В конкретном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит анти-IL-6 антитело, имеющее пролонгированный период полувыведения.

[0378] В определенных вариантах исполнения, композиции в соответствии с данным изобретением сохраняют улучшенные профили агрегации после хранения, например, в течение пролонгированных периодов (например, но, не ограничиваясь приведенным, до 1 недели, 1 месяца, 6 месяцев, 1 года, 2 лет, 3 лет или 5 лет) при комнатной температуре или 4°C или в течение периодов (таких, как, но не ограничиваясь приведенным, до 1 недели, 2 недель, 3 недель, 1 месяца, 2 месяцев, 3 месяцев, или 6 месяцев) при повышенных температурах, например, 38°C-42°C. В определенных вариантах исполнения, композиции сохраняют улучшенные профили агрегации после хранения при воздействии света или хранении в темноте в условиях различной влажности, включая, но, не ограничиваясь приведенным, относительную влажность вплоть до 10%, или вплоть до 20%, или вплоть до 30%, или вплоть до 40%, или вплоть до 50%, или вплоть до 60%, или вплоть до 70%, или вплоть до 80%, или вплоть до 90%, или вплоть до 100%. В данной области будет понятно, что термин условия "окружающей среды" в общем, относится к температурам,

составляющим приблизительно 20°C при относительной влажности от 10% до 60% при воздействии света. Аналогично, температуры от приблизительно 2°C до приблизительно 8°C при относительной влажности менее чем приблизительно 10%, вместе называют "4°C" или "5°C", температуры от приблизительно 23°C до приблизительно 27°C при относительной влажности приблизительно 60% вместе называют "25°C" и температуры от приблизительно 38°C до приблизительно 42°C при относительной влажности приблизительно 75% вместе называют "40°C." В конкретном варианте исполнения, композицию в соответствии с данным изобретением хранят в предварительно наполненном шприце.

[0379] В определенных вариантах исполнения, после хранения при 4°C в течение как минимум один месяц, композиции в соответствии с данным изобретением имеют (или содержат в виде агрегированной фракции) профиль частиц менее чем приблизительно 3,4 E + 5 частиц/мл диаметра 2-4 мкм, менее чем приблизительно 4,0 E + 4 частиц/мл диаметра 4-10 мкм, менее чем приблизительно 4,2 E + 3 частиц/мл диаметра 10-20 мкм, менее чем приблизительно 5,0 E + 2 частиц/мл диаметра 20-30 мкм, менее чем приблизительно 7,5 E + 1 частиц/мл диаметра 30-40 мкм и менее чем приблизительно 9,4 частиц/мл диаметра 40-60 мкм, как определено при помощи счетчика частиц. В определенных вариантах исполнения, композиции в соответствии с данным изобретением не содержат детектируемых частиц более 40 мкм, или более 30 мкм. В конкретном варианте исполнения, композицию в соответствии с данным изобретением хранят в предварительно наполненном шприце.

[0380] В данной области известны многочисленные способы, известные для определения степени агрегации, и/или типов и/или размеров агрегатов, присутствующих в белковой композиции (например, композиции антитела в соответствии с данным изобретением), включая, но не ограничиваясь приведенным, эксклюзионную хроматографию (ЭХ), высокоэффективную эксклюзионную хроматографию (ВЭЭХ), статическое рассеяние света (СРС), инфракрасную спектроскопию с Фурье-преобразованием (ФТ-ИК), циркулярный дихроизм (ЦД), методы разворачивания белков, индуцированные мочевиной, собственную флуоресценцию триптофана, дифференциальную сканирующую калориметрию и способы связывания белков 1-анилино-8-нафталинсульфоновой кислотой (АНС). Например, эксклюзионная хроматография (ЭХ) может быть выполнена для разделения молекул, исходя из их размеров, путем прохождения молекул через колонку, упакованную соответствующей смолой, где большие молекулы (например, агрегаты) будут элюировать перед меньшими молекулами (например, мономерами). Молекулы, в общем, детектируют по УФ поглощению при 280 нМ и они могут быть собраны для дополнительной характеристики. Для ЭХ анализа (ВЭ-ЭХ) часто используют колонки для жидкой хроматографии высокого давления. Конкретные ЭХ способы подробно описаны в разделе под названием "Примеры" ниже. Альтернативно, может быть использовано аналитическое ультрацентрифугирование (АУЦ). АУЦ является ортогональной методикой, которая определяет коэффициенты седиментации (о которых сообщено в Svedberg, S) макромолекул в жидкой пробе. Аналогично ЭХ, АУЦ может разделять и детектировать фрагменты/агрегаты антител от мономеров и дополнительно способно предоставлять информацию про молекулярную массу. Агрегация белков в композиции может быть также охарактеризована анализом при помощи счетчика частиц Культера или при помощи измерений мутности с использованием нефелометра. Мутность является мерой количества, на которое частицы в растворе рассеивают свет и, таким образом, могут быть использованы в качестве общего индикатора агрегации белка. Дополнительно,

не восстанавливающий электрофорез в полиакриламидном геле (PAGE) или капиллярный гель-электрофорез (КГЭ) могут быть использованы для характеристики состояния агрегации и/или фрагментации антитела или его фрагмента в композиции в соответствии с данным изобретением.

5 [0381] В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением предназначена для парентерального введения. В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением является композицией для инъекций. В конкретных вариантах исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением приемлема для внутривенной, внутримышечной,
10 интраартериальной, интратекальной, интракапсулярной, интраорбитальной, интракардиальной, интрадермальной, интраперитонеальной, перинеуральной, транстрахеальной, подкожной, субкутикулярной, внутрисуставной, субкапсулярной, субарахноидальной, интраспинальной, эпидуральной и надчревной инъекции или инфузии. В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением предназначена для внутривенного, подкожного, или внутримышечного введения. В конкретном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит анти-IL-6 антитело, где указанная композиция предназначена для подкожной инъекции. В конкретном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит анти-IL-6 антитело, где указанная композиция предназначена для внутривенной инъекции. В конкретном варианте исполнения, композицию в соответствии с данным изобретением хранят в предварительно наполненном шприце. В конкретном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит анти-IL-6 антитело, имеющее пролонгированный период полувыведения.

25 [0382] В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением предназначена для внутривенного введения, где указанная композиция содержит приблизительно от 1 мг/мл до приблизительно 60 мг/мл, приблизительно от 1 мг/мл до приблизительно 50 мг/мл, приблизительно от 1 мг/мл до приблизительно 40 мг/мл, приблизительно от 10 мг/мл до приблизительно 60 мг/мл, приблизительно от 10 мг/мл до приблизительно 50 мг/мл, приблизительно от 10 мг/мл до приблизительно 40 мг/мл, приблизительно от 20 мг/мл до приблизительно 60 мг/мл, приблизительно от 20 мг/мл до приблизительно 50 мг/мл, приблизительно от 20 мг/мл до приблизительно 40 мг/мл, приблизительно от 30 мг/мл до приблизительно 60 мг/мл, приблизительно от 30 мг/мл до приблизительно 50 мг/мл, или приблизительно от 30 мг/мл до приблизительно 40 мг/мл анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением. В конкретном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит анти-IL-6 антитело в соответствии с данным изобретением, имеющее пролонгированный период полувыведения.

[0383] В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением предназначена для перинеурального или интратекального введения, где композиция содержит от приблизительно 0,01 мкг/мл до приблизительно 50 мкг/мл, от приблизительно 0,05 мкг/мл до приблизительно 45 мкг/мл, от приблизительно 0,1 мкг/мл до приблизительно 30 мкг/мл, от приблизительно 0,15 мкг/мл до приблизительно 25 мкг/мл, от приблизительно 0,2 мкг/мл до приблизительно 20 мкг/мл, от
45 приблизительно 0,25 мкг/мл до приблизительно 17,5 мкг/мл, от приблизительно 0,5 мкг/мл до приблизительно 15 мкг/мл, от приблизительно 0,75 мкг/мл до приблизительно 12,5 мкг/мл, от приблизительно 0,6 мкг/мл до приблизительно 10 мкг/мл, от приблизительно 1,0 мкг/мл до приблизительно 8 мкг/мл, от приблизительно 1,25 мкг/

мл до приблизительно 7,5 мкг/мл, или от приблизительно 1,5 мкг/мл до приблизительно 6 мкг/мл анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением. В конкретном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит анти-IL-6 антитело, имеющее пролонгированный период полувыведения.

5 [0384] В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением предназначена для подкожного введения, где указанная композиция содержит от приблизительно 1 мг/мл до приблизительно 100 мг/мл, от приблизительно 1 мг/мл до приблизительно 150 мг/мл, от приблизительно 1 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл, от приблизительно 25 мг/мл до приблизительно 100 мг/мл, от приблизительно 25 мг/мл до приблизительно 150 мг/мл, от приблизительно 25 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл, от приблизительно 50 мг/мл до приблизительно 100 мг/мл, от приблизительно 50 мг/мл до приблизительно 150 мг/мл, от приблизительно 50 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл, от приблизительно 75 мг/мл до приблизительно 100 мг/мл, от приблизительно 75 мг/мл до приблизительно 150 мг/мл или от приблизительно 75 мг/мл до 15
приблизительно 200 мг/мл анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением. В конкретном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением обеспечена в предварительно наполненном шприце. В конкретном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит анти-IL-6, имеющее пролонгированный период полувыведения.

20 [0385] В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением предназначена для аэрозольного введения.

[0386] Данное изобретение также представляет фармацевтическую стандартную лекарственную форму, приемлемую для парентерального введения человеку, которая содержит композицию анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением в 25 приемлемом контейнере. В одном варианте исполнения, фармацевтическая стандартная лекарственная форма в соответствии с данным изобретением содержит внутривенно, подкожно, или внутримышечно доставленную композицию анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением. В другом варианте исполнения, фармацевтическая стандартная лекарственная форма в соответствии с данным изобретением одержит 30 аэрозольно доставленную композицию анти-IL-6 антитела. В конкретном варианте исполнения, фармацевтическая стандартная лекарственная форма в соответствии с данным изобретением содержит подкожно доставленную композицию анти-IL-6 антитела. В другом варианте исполнения, фармацевтическая стандартная лекарственная форма в соответствии с данным изобретением одержит аэрозольно доставленную 35 композицию анти-IL-6 антитела. В дополнительном варианте исполнения, фармацевтическая стандартная лекарственная форма в соответствии с данным изобретением содержит интраназально введенную композицию анти-IL-6 антитела. В одном варианте исполнения, приемлемый контейнер представляет собой предварительно наполненный шприц. В конкретном варианте исполнения, композиция в соответствии с 40 данным изобретением содержит анти-IL-6 антитело, имеющее пролонгированный период полувыведения.

[0387] В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением обеспечена герметичным контейнером. В конкретном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением обеспечена в 45 предварительно наполненном шприце. В конкретном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением содержит анти-IL-6 антитело, имеющее пролонгированный период полувыведения.

[0388] Данное изобретение дополнительно представляет набор, содержащий

композицию анти-IL-6 антитела в соответствии с данным изобретением. Данное изобретение представляет фармацевтическую упаковку или набор, содержащий один или более контейнеров, наполненных жидкой композицией или лиофилизированной композицией в соответствии с данным изобретением. В одном варианте исполнения, контейнер, наполненный жидкой композицией в соответствии с данным изобретением, является предварительно наполненным шприцем. В конкретном варианте исполнения, композиции в соответствии с данным изобретением содержат антитела (включая их антительные фрагменты), рекомбинантно гибридные или химически конъюгированные с другим фрагментом, включая, но, не ограничиваясь приведенным, гетерологический белок, гетерологический полипептид, гетерологический пептид, большую молекулу, малую молекулу, маркерную последовательность, диагностический или детектируемый агент, терапевтическую группу, лекарственную группу, ион радиоактивного металла, второе антитело и твердую подложку. В конкретном варианте исполнения, композиции в соответствии с данным изобретением составляют в ампулах для стандартных лекарственных доз в виде стерильной жидкости. Композиции в соответствии с данным изобретением могут быть поставлены в боросиликатных янтарных ампулах 3 cc USP типа I (West Pharmaceutical Services - Part No. 6800-0675) с целевым объемом 1,2 мл. Необязательно вложенной в такой контейнер (такие контейнеры) может быть уведомление в форме, предписанной государственным органом, регулирующим производство, применение или продажу фармацевтических или биологических продуктов, где уведомление содержит утверждение органом производства, применения или продажи для введения человеку. В другом варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением может быть поставлена в предварительно наполненном шприце.

[0389] В одном варианте исполнения, контейнер, наполненный жидкой композицией в соответствии с данным изобретением, представляет собой предварительно наполненный шприц. Любой предварительно наполненный шприц, известный специалисту в данной области, может быть использован в комбинации с жидкой композицией в соответствии с данным изобретением. Предварительно наполненные шприцы, которые могут быть использованы, описаны в публикациях, но не ограничиваясь приведенным, РСТ публикациях WO 05032627, WO 08094984, WO 9945985, WO 03077976, US Patents US 6792743, US 5607400, US 5893842, US 7081107, US 7041087, US 5989227, US 6807797, US 6142976, US 5899889, патентных публикациях США US20070161961 A1, US 20050075611 A1, US 20070092487 A1, US 20040267194 A1, US 20060129108 A1. Предварительно наполненные шприцы могут быть выполнены из различных материалов. В одном варианте исполнения предварительно наполненный шприц является стеклянным шприцом. В другом варианте исполнения предварительно наполненный шприц является пластиковым шприцом. Специалист в данной области поймет, что характер и/или количество материалов, которые используют при производстве шприца, могут влиять на белковую композицию, которую хранят в шприце. Например, понятно, что смазки на силиконовой основе, осажденные на внутренней поверхности камеры шприца, могут влиять на образование частиц в белковой композиции. В одном варианте исполнения, предварительно наполненный шприц содержит смазку на силиконовой основе. В одном варианте исполнения, предварительно наполненный шприц содержит запеченный силикон. В другом варианте исполнения, предварительно наполненный шприц не содержит смазок на силиконовой основе. Специалист в данной области также поймет, что небольшие количества загрязняющих элементов, которые вытекают в композицию из цилиндра

шприца, защитного колпачка шприца, плунжера или стопера, могут также влиять на стабильность композиции. Например, понятно, что вольфрам, введенный во время процесса производства, может неблагоприятно влиять на стабильность композиции. В одном варианте исполнения, предварительно наполненный шприц может содержать вольфрам на уровне выше 500 ppb. В другом варианте исполнения, предварительно наполненный шприц является шприцем с низким содержанием вольфрама. В другом варианте исполнения, предварительно наполненный шприц может содержать вольфрам на уровне от приблизительно 500 ppb до приблизительно 10 ppb, от приблизительно 400 ppb до приблизительно 10 ppb, от приблизительно 300 ppb до приблизительно 10 ppb, от приблизительно 200 ppb до приблизительно 10 ppb, от приблизительно 100 ppb до приблизительно 10 ppb, от приблизительно 50 ppb до приблизительно 10 ppb, от приблизительно 25 ppb до приблизительно 10 ppb.

[0390] Готовые изделия

[0391] Данное изобретение также охватывает готовый упакованный и меченый фармацевтический продукт. Данное готовое изделие включает соответствующую стандартную лекарственную форму в соответствующем сосуде или контейнере, таком, как стеклянная ампула, предварительно наполненный шприц или другой контейнер, который герметично закрыт. В одном варианте исполнения, стандартная лекарственная форма обеспечена как стерильный раствор, не содержащий частиц, содержащий анти-IL-6 антитело, приемлемый для парентерального введения. В другом варианте исполнения, стандартная лекарственная форма обеспечена как стерильный лиофилизированный порошок, содержащий анти-IL-6 антитело, которое приемлемо для восстановления.

[0392] В одном варианте исполнения, стандартная лекарственная форма приемлема для внутривенной, внутримышечной, интраназальной, пероральной, местной или подкожной доставки. Таким образом, данное изобретение охватывает стерильные растворы, приемлемые для каждого маршрута доставки. Данное изобретение дополнительно охватывает стерильные лиофилизированные порошки, приемлемые для восстановления.

[0393] Как и с любым фармацевтическим продуктом, упаковочный материал разработан для защиты стабильности продукта во время хранения и перевозки. Дополнительно, продукты в соответствии с данным изобретением включают инструкции по применению или другой информационный материал, где приведена информация для терапевта, технического персонала или пациента о том, как соответствующим образом препятствовать или лечить рассматриваемое заболевание или расстройство. Иными словами, готовое изделие включает инструктивные средства, в которых указан или предложен режим дозирования, включая, но, не ограничиваясь приведенным, фактические дозы, процедуры мониторинга и другую информацию о мониторинге.

[0394] Конкретно, данное изобретение представляет готовое изделие, содержащее упаковочный материал, такой, как коробка, бутылка, пробирка, ампула, контейнер, предварительно наполненный шприц, распылитель, инсуффлятор, пакет для внутривенного (i.v.) введения, оболочку и т.п.; и как минимум одну стандартную лекарственную форму фармацевтического агента, которая содержится в указанном упаковочном материале, где указанный фармацевтический агент содержит жидкую композицию, содержащую антитело. Упаковочный материал включает инструктивные средства с указаниями того, каким образом указанное антитело может быть использовано для профилактики, лечения и/или контроля одного или более симптомов, связанных с заболеванием или расстройством.

[0395] Фармацевтические композиции для перорального введения, такие, как например, одинарные молекулы домена антитела (например, "нанободи™") и т.д., также предусмотрены в данном изобретении. Такие пероральные композиции могут быть в виде таблетки, капсулы, порошка, жидкой или полутвердой формы. Таблетка
 5 может содержать твердый носитель, такой, как желатин или адьювант. Жидкие фармацевтические композиции, в общем, содержат жидкий носитель, такой, как воду, нефть, животное или растительное масла, минеральное масло или синтетическое масло. Могут быть включены физиологический солевой раствор, декстроза или другой раствор дисахарида или гликоли, такие, как этиленгликоль, пропиленгликоль или
 10 полиэтиленгликоль.

[0396] Для внутривенного введения, или введения в место заболевания, активный ингредиент будет находиться в форме парентерально приемлемого водного раствора, который не содержит пирогенов и имеет приемлемое значение pH, изотоничность и стабильность. Специалисты в данной области легко смогут получить приемлемые
 15 растворы при помощи, например, изотонических основ, таких, как инъекция хлорида натрия, инъекция раствора Рингера, инъекция молочнокислого раствора Рингера. Консерванты, стабилизаторы, буферы, антиоксиданты и/или другие добавки могут быть применены при необходимости, включая такие буферы, как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, такие, как аскорбиновая кислота и
 20 метионин; консерванты (такие, как октадецилдиметилбензиламмоний хлорид; гексаметоний хлорид; бензалконий хлорид; бензэтоний хлорид; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкил парабены, такие, как метил или пропилпарабен; катехол; резорцинол; циклогексанол; 3'-пентанол; и м-крезол); низкомолекулярные полипептиды; белки, такие, как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины;
 25 гидрофильные полимеры, такие, как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие, как глицин, глутамин, аспарагины, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелаторы, такие, как ЭДТК; сахара, такие, как сукроза, маннитол, трегалоза или сорбитол; солеобразующие противоионы, такие, как натрий; металлокомплексы (например, комплексы Zn-белок);
 30 и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие, как TWEEN™, ПЛЮРОНИКИ™ или полиэтиленгликоль (ПЭГ).

[0397] Агенты связывания в соответствии с данным изобретением могут быть составлены в жидкой, полутвердой или твердой формах в зависимости от физико-химических свойств молекулы и маршрута введения. Композиции могут содержать
 35 эксципиенты, или комбинации эксципиентов, например: сахара, аминокислоты и поверхностно-активные вещества. Жидкие композиции могут содержать широкий диапазон концентраций и pH антител. Твердые композиции могут быть получены путем лиофилизации, высушивания распылением, или высушиванием при помощи технологий сверхкритических жидкостей, например. Компоненты связывания композиции будут
 40 зависеть от предполагаемого маршрута доставки: например, композиции для легочной доставки могут состоять из частиц с физическими свойствами, обеспечивающими проникновение глубоко в легкие после вдыхания; местные композиции (для лечения рубцов, например кожных рубцов) могут включать агенты, модифицирующие вязкость, что удлиняет время, в течение которого лекарственное средство остается на месте
 45 действия. Агент связывания может быть получен с носителем, который будет защищать агент связывания от быстрого высвобождения, например композиция контролируемого высвобождения, включая импланты, трансдермальные пластыри и микроинкапсулированные системы доставки. Могут быть использованы биоразлагаемые

биосовместимые полимеры, например, этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфир и полимолочная кислота. Многие способы для получения такой композиции известны специалистам в данной области (Robinson, J.R. ed., (1978) Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, Marcel Dekker, Inc., New York).

[0398] Лечение может быть обеспечено перорально (так, как например молекулы одного домена антитела (например, "нанободи™")) путем инъекции (например, подкожно, внутрисуставно, внутривенно, интраперитонеально, интрааретриально, или внутримышечно), путем вдыхания, интратрахеально, или интравезикулярным маршрутом (установкой в мочевого пузырь), или местно (например, интраокулярно, интраназально, ректально, в раны, на кожу). Лечение может быть проведено путем импульсной инфузии, в частности уменьшающимися дозами агента связывания.

Маршрут введения может быть определен физиологическими характеристиками лечения, конкретными соображениями о болезни или требованиями оптимизировать эффективность или минимизировать побочные эффекты. Одним конкретным маршрутом введения является внутривенный. Другим маршрутом введения фармацевтических композиций в соответствии с данным изобретением является подкожный.

Предусмотрено, что лечение не будет ограничено использованием в клинике. Поэтому, подкожная инъекция с использованием устройства, не содержащего иглы, также является преимущественной.

[0399] Композиция может быть введена отдельно или в комбинации с другим лечением, одновременно или последовательно, в зависимости от состояния, подлежащего лечению.

[0400] Агент связывания в соответствии с данным изобретением может быть использован как часть комбинационной терапии в соединении с дополнительным медицинским компонентом. Комбинационное лечение может быть использовано для обеспечения значительного синергетического эффекта, в частности, комбинация агента связывания в соответствии с данным изобретением с одним или более лекарственными средствами. Агент связывания в соответствии с данным изобретением может быть введен параллельно или последовательно или в виде комбинированного препарата с другим терапевтическим агентом или агентами, для лечения одного или более состояний, перечисленных в данной заявке.

[0401] Агент связывания в соответствии с данным изобретением может быть использован в качестве химиосенсибилизатора, в соответствии, с чем он может повышать цитотоксическую эффективность цитотоксических агентов и может таким образом быть обеспечен для введения в комбинации с одним или более цитотоксическими агентами, одновременно или последовательно. Агент связывания может быть также использован как радиосенсибилизатор, в соответствии с чем он может повышать эффективность излучения и может таким образом быть использован для введения в комбинации с излучением, одновременно или последовательно.

[0402] Агент связывания в соответствии с данным изобретением может быть обеспечен в комбинации или с добавлением одного или более следующих агентов:

- цитокина или агониста или антагониста цитокиновой функции (например, агента, который действует на цитокиновые сигнальные маршруты, такого, как модулятор или системы - супрессоры цитокиновых сигналов), таких, как альфа-, бета-и/или гамма-интерферон; инсулиноподобный фактор роста типа I (IGF-1), его рецепторы, связанные с белками связывания; интерлейкины (IL), например, один или более из IL-1 - до -33, и/или антагонист или ингибитор интерлейкина, такой, как анакинра; ингибиторы

рецепторов членов семейства интерлейкинов или ингибиторы конкретных подъединиц таких рецепторов, ингибитор фактора некрозов опухолей альфа (TNF- α), например, анти-TNF моноклональные антитела (например, инфликсимаб, адалимумаб и/или ЦДР-870) и/или антагонист TNF рецептора, например, молекула иммуноглобулина (например, этанерцепт) и/или низкомолекулярный агент, например, пентоксифиллин;

- модулятора В клеток, например, моноклонального антитела, направленного на В-лимфоциты (например, ЦД20 (ритуксимаб) или MRA-aIL16R) или Т-лимфоциты (например, CTLA4-Ig, HuMax II-15 или абатацепт);

- модулятора, который ингибирует активность остеокластов, например антитело к RANKL;

- модулятора хемокина или функции рецепторов хемокина, такого, как антагонист CCR1, CCR2, CCR2A, CCR2B, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CCR10 и CCR11 (для C-C семейства); CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4 и CXCR5 и CXCR6 (для C-X-C семейства) и CX₃CR1 для C-X₃-C семейства;

- ингибитора матриксных металлопротеиназ (MMPs), т.е. одного или более стромелизинов, коллагеназ и желатиназ, а также аггреканы, в особенности коллагеназы-1 (MMP-1), коллагеназы-2 (MMP-8), коллагеназы-3 (MMP-13), стромелизина-1 (MMP-3), стромелизина-2 (MMP-10) и/или стромелизина-3 (MMP-11) и/или MMP-9 и/или MMP-12, например, агента, такого, как доксициклин;

- ингибитора нейтрализации лейкотриенов, ингибитора 5-липоксигеназы (5-LO) или антагониста 5-липоксигеназа активирующего белка (FLAP), таких, как зилейтон; АВТ-761; фенлейтон; тепоксалин; Абботт-79175; Абботт-85761; N-(5-замещенные)-тиофен-2-сульфонамиды; 2,6-ди-трет-бутилфенолгидразоны; метокситетрагидропираны, такие, как Зенека ZD-2138; соединение SB-210661; пиридинил-замещенное 2-цианонафталиновое соединение, такое, как L-739,010; 2-цианохинолиновое соединение, такое, как L-746,530; индольное и/или хиноловое соединение, такие, как МК-591, МК-886 и/или BAYx1005;

- антагониста рецептора лейкотриенов (LT) B₄, LTC₄, LTD₄ и LTE₄, выбранного из группы, состоящей из фенотиазин-3-1-ов, таких, как L-651,392; амидиносоединений, таких, как CGS-25019с; бензоксаламинов, таких, как онтазолост;

бензолкарбоксимидаминов, таких, как BIII 284/260; и соединений, таких, как зафирлукаст, аблукаст, монтелукаст, пранлукаст, верлукаст (МК-679), RG-12525, Ro-245913, иралукаст (CGP 45715A) и BAYx7195;

- ингибитора фосфодиэстеразы (PDE), такого, как метилксантин, например, теофиллин и/или аминофиллин; и/или селективного ингибитора PDE изоэнзима, например, ингибитора PDE4 и/или ингибитора изоформного PDE4D и/или ингибитора PDE5;

- антагониста рецептора гистамина типа 1, такого, как цетиризин, лоратадин, деслоратадин, фексофенадин, акривастин, терфенадин, астемизол, азеластин, левокабастин, хлорфенирамин, прометазин, циклизин, и/или мизоластин (в общем, применяют перорально, местно или парентерально);

- ингибитора протонной помпы (такого, как омепразол) или антагониста гастропротекторного гистаминного рецептора 2 типа;

- антагониста гистаминного рецептора 4 типа;

- сосудосуживающего симпатомиметического агента - агониста альфа-1/альфа-2 адренорецептора, такого, как пропилгекседрин, фенилэфрин, фенилпропаноламин, эфедрин, превдоэфедрин, нафазолин гидрохлорид, оксиметазолин гидрохлорид, тетрагидрозолин гидрохлорид, ксилометазолин гидрохлорид, трамазолин гидрохлорид и этилнорэпинефрин гидрохлорид;

- антихолинергического агента, например, мускаринового рецептора (M1, M2 и M3)

антагонист, такого, как атропин, гиоскин, гликопирролат, ипратропий бромид, тиотропий бромид, окситропий бромид, пирензепин и телензепин;

- агониста бета-адренорецептора (включая бета-рецептор подтипов 1-4), такого, как изопреналин, сальбутамол, формотерол, сальметерол, тербуталин, орципреналин, битолтерол мезилат и/или пирбутерол, например, его хиральный энантиомер;

- хромона, например, натрий хромогликата и/или недохромил натрия;

- глюкокортикоида, такого, как флунизолит, триамхинолон ацетонид, беклометазон дипропионат, будезонид, флутиказон пропионат, циклезонид, и/или мометазон фуруат;

- агента, модулирующего ядерные гормональные рецепторы, например, рецептора, активируемого пролифератором пероксисом (PPAR);

- иммуноглобулина (Ig) или Ig препарата или антагониста или антитела, модулирующего Ig функцию, такого, как анти-IgE (например, омализумаба);

- другого системного или местного противовоспалительного агента, например, талидомида или его производного, ретиноида, дитранола и/или кальцитриола;

- комбинации аминосалицилатов и сульфамида, например, сульфасалазина, месалазина, бальсалазида и ольсалазина; и иммуномодулирующих агентов, таких, как тиопурины; и кортикостероидов, таких, как будезонид;

- антибактериального агента, например, производного пенициллина, тетрациклина, макролида, бета-лактама, фторхинолона, метронидазола и/или аминогликозида для ингаляций; и/или противовирусного агента, например, ацикловира, фамцикловира, вал ацикловира, ганцикловира, цидофовира; амантадина, ремантадина; рибавирина;

занамавира и/или озельтамавира, ингибитора протеаз, такого, как индинавир, нельфинавир, ритонавир и/или саквинавир; нуклеозидного ингибитора обратной транскриптазы, такого, как диданозин, ламивудин, ставудин, зальцитабин, зидовудин;

нуклеозидного ингибитора обратной транскриптазы, такого, как нвирапин, эфавиренц;

- сердечно-сосудистого агента, такого, как блокатор кальциевых каналов, блокатор бета-адренорецепторов, ингибитор ангиотензин-превращающего фермента (ACE), антагонист ангиотензин-2 рецептора; агента, снижающего уровень липидов, такого, как статин и/или фибрат; модулятора морфологии эритроцитов, такого, как

пентоксифиллин; тромболитика и/или антикоагулянта, например, ингибитора агрегации тромбоцитов;

- агента, действующего на ЦНС, такого, как антидепрессант (такого, как сертралин), лекарственного средства от болезни Паркинсона (такого, как депренил, L-допа, ропинирол, прамипексол; ингибитора МАОВ, такого, как селегин и расгилин;

ингибитора comP, такого, как тасмар; А-2 ингибитора, ингибитора обратного захвата допамина, антагониста N-метил-D-аспартата, агониста никотина, агониста допамина и/или ингибитора нейрональной синтазы оксида азота) и лекарственного средства против болезни Альцгеймера, такого, как донепезил, ривастигмин, такрин, ингибитор COX-2, пропентофиллин или метрифонат;

- агента для лечения острой и хронической боли, например, анальгетика для центральной или периферической нервной системы, такого, как опиоидный аналог или производное, карбамазепин, фенитоин, натрий вальпроат, амитриптилина или другого антидепрессанта, парацетамола или нестероидного противовоспалительного агента;

- парентерально или местно применяемого (включая ингаляцию) местного анестетика, такого, как лидокаин или его аналог;

- средства от остеопороза, например, гормонального средства, такого, как ралоксифен, или бифосфонат, например, алендронат;

- (i) ингибитора триптазы; (ii) антагониста фактора активации тромбоцитов (PAF);

(iii) ингибитора интерлейкин-превращающего фермента (ICE); (iv) ингибитора инозинмонофосфатдегидрогеназы; (v) ингибитора адгезии молекул, включая антагонист VLA-4; (vi) а катепсина; (vii) ингибитора киназ, например, ингибитора тирозинкиназ (например Btk, Itk, Jak3 MAP примеры ингибиторов могут включать гефитиниб, иматиниб мезилат), серин / треонин киназы (например, ингибитора MAP киназы, такой, как p38, c-Jun-N-терминальной киназы, протеин киназы A, B и C и IKK), или киназы, задействованной в регуляции клеточного цикла (например, циклин зависимой киназы); (viii) ингибитора глюкоза-6 фосфат дегидрогеназы; (ix) антагониста кинин-В₁ - и/или В₂ - рецептора; (x) противоподагрического средства, например, колхицина; (xi) ингибитора ксантин оксидазы, например, аллопуринола; (xii) средства, способствующего выведению мочевой кислоты, например, пробенецида, сальфинпиразона, и/или бензбромарона; (xiii) стимулятора секреции гормона роста; (xiv) трансформирующего фактора роста (TGFβ); (xv) тромбоцитарного фактора роста (PDGF); (xvi) фактора роста фибробластов, например, основного фактора роста фибробластов (bFGF); (xvii) гранулоцитарно-моноцитарного колониестимулирующего фактора (ГМКСФ); (xviii) капсаицинового крема; (xix) антагониста тахикининового NK₁ и/или NK₃ рецептора, например NKP-608C, SB-233412 (тальнетан) и/или D-4418; (xx) ингибитора эластазы, например, UT-77 и/или ZD-0892; (xxi) ингибитора TNF-альфа превращающего фермента (TACE); (xxii) ингибитора индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS) или (xxiii) хемоаттрактантной рецептор-гомологичной молекулы, которая экспрессируется на TH2 клетках (например, CRTH2 антагонист); (xxiv) ингибитора P38 (xxv) агента, модулирующего функцию Толл-подобных рецепторов (TLR) и (xxvi) агента, модулирующего активность пуриnergических рецепторов, например P2X7; (xxvii) ингибитора фактора активации транскриптазы, например NFκB, API, и/или STATS (сигнального трансдуктора и активатора транскрипции).

[0403] Ингибитор может быть специфичным или может быть смешанным ингибитором, например, ингибитором, направленным на более чем одну молекулу (например, рецепторы) или молекулярные классы, указанные выше.

[0404] Агент связывания может быть также использован в комбинации с химиотерапевтическим агентом или другим ингибитором тирозинкиназ при совместном введении или в форме иммуноконъюгата. Фрагменты указанного антитела могут быть также использованы в биспецифичных антителах, полученных путем рекомбинантных механизмов или биохимическим сочетанием с последующей ассоциацией специфичности описанного выше антитела со специфичностью другого антитела, способного к распознаванию других молекул, задействованных в активности, для чего ассоциировано IL-6.

[0405] Для лечения воспалительного заболевания, агент связывания в соответствии с данным изобретением может быть скомбинирован с одним или более агентами, такими, как нестероидные противовоспалительные агенты (в данной заявке НСПВА), включая неселективные ингибиторы цикло-оксигеназы (COX)-1/COX-2, которые применяют местно или системно, например, пироксикам, диклофенак, пропионовые кислоты, такие, как напроксен, флупирофен, фенопрофен, кетопрофен и ибупрофен, фенаматы, такие, как мефенаминовая кислота, индометацин, сулиндак, азапропазон, пиразолоны, такие, как фенилбутазон, салицилаты, такие, как аспирин); селективные ингибиторы COX-2 (такие, как мелоксикам, целекоксиб, рофекоксиб, вальдекоксиб, лумарококсиб, парекоксиб и эторикоксиб); доноры оксида азота - ингибиторы циклооксигеназы (CINODs); глюкокортикостероиды (введенные местным, пероральным,

внутримышечным, внутривенным или внутрисуставными маршрутами); метотрексат, лефлуномид; гидроксихлорхин, d-пеницилламин, ауранофин или другие парентеральные или пероральные препараты золота; анальгетики; диацереин; внутрисуставные лекарственные средства, такие, как производные гиалуроновой кислоты; и пищевые добавки, такие, как глюкозамин.

[0406] Агент связывания в соответствии с данным изобретением может быть также использован в комбинации с существующим терапевтическим агентом для лечения рака. Приемлемые агенты для использования в комбинации включают:

(i) антипролиферативные/antineoplastические лекарственные средства и их комбинации, используемые в медицинской онкологии, такие, как Гливек (иматиниб мезилат), алкилирующие агенты (например, цис-платин, карбоплатин, циклофосфамид, азотистый иприт, мельфалан, хлорамбуцил, бусульфан и нитрозомочевины); антиметаболиты (например, антифолаты, такие, как фторпиримидины, такие, как 5-фторурацил и тегафур, ралтитрексед, метотрексат, цитозин арабинозид, гидроксимочевина, гемцитабин и паклитаксел); противоопухолевые антибиотики (например антрациклины, такие, как адриамицин, блеомицин, доксорубин, дауномицин, эпирубинин, идарубинин, митомицин-С, дактиномицин и митрамицин); антимитотические агенты (например алкалоиды барвинка, такие, как винкристин, винбластин, виндезин и винорельбин и таксоиды, такие, как таксол и таксотер); и ингибиторы топоизомеразы (например эпиподофилотокисины, такие, как этопозид и тенипозид, амсакрин, топотекан и камптотецины);

(ii) цитостатические агенты, такие, как антиэстрогены (например, тамоксифен, торемифен, ралоксифен, дролоксифен и йодоксифен), down-регуляторы рецепторов эстрогена (например, фулвестрант), антиандрогены (например бикалутимид, флутамид, нилутамид и ципротерон ацетат), антагонисты лютеинизирующего релизинг-гормона (ЛГ-РГ) или агонисты ЛГ-РГ (например гозерелин, лейпрорелин и бузерелин), прогестрогены (например мегестрол ацетат), ингибиторы ароматазы (например анастрозол, летрозол, воразол и экземестан) и ингибиторы 5 α -редуктазы, например, финастерид;

(iii) Агенты, ингибирующие инвазию раковых клеток (например, ингибиторы металлопротеиназы, такие, как маримастат и ингибиторы функции рецептора активатора плазминогена урокиназного типа);

(iv) ингибиторы функции фактора роста, например, такие ингибиторы включают антитела фактора роста, антитела рецептора фактора роста (например, анти-erbB2 антитело транстузумаб и анти-erbB1 антитело цетуксимаб [C225]), ингибиторы фарнезилтрансферазы, ингибиторы тирозинкиназы и ингибиторы серин/треонин киназы, например, ингибиторы семейства эпидермального фактора роста (например EGFR семейства ингибиторов тирозинкиназы, такие, как N-(3-хлор-4-фторфенил)-7-метокси-6-(3-морфолинопропокси) хиназолин-4-амин (гефитиниб, AZD1839), N-(3-этинилфенил)-6,7-бис(2-метоксиэтокси) хиназолин-4-амин (эрлотиниб, OSI-774) и 6-акриламидо-N-(3-хлор-4-фторфенил)-7-(3-морфолинопропокси) хиназолин-4-амин (CI 1033)), например, ингибиторы семейства тромбоцитарного фактора роста и, например, ингибиторы семейства гепатоцитарного фактора роста;

(v) антиангиогенные агенты, такие, как ингибиторы эффекта сосудистого эндотелиального фактора роста (например, антитело фактора роста анти-сосудистых эндотелиальных клеток бевацизумаб, соединения, такие, которые описаны в международных патентных заявках WO 97/22596, WO 97/30035, WO 97/32856 и WO 98/13354, каждая из которых включена в данную заявку полностью путем ссылки) и

соединения, которые действуют по другим механизмам (например, линомид, ингибиторы интегринавой $\alpha v \beta 3$ функции и ангиостатин);

(vi) агенты, повреждающие сосуды, такие, как комбретастантин А4 и соединения, описанные в международных патентных заявках WO 99/02166, WO 00/40529, WO 00/41669, WO 01/92224, WO 02/04434 и WO 02/08213 (каждая из которых включена в данную заявку полностью путем ссылки);

(vii) антисмысловые лекарственные средства, например, направленные на мишени, перечисленные выше, например, ISIS 2503, анти-ras антисмысловые агенты;

(viii) подходы генной терапии, включая, например, подходы для замены аберрантных генов, таких, как аберрантный p53 или аберрантный BRCA1 или BRCA2, подходы ГНФПЛТ (генно-направленная ферментная пролекарственная терапия), например, использующие цитозин деаминазу, тимидин киназу или бактериальный нитроредуктазный фермент и подходы для повышения переносимости пациентами химиотерапии или лучевой терапии, например, генная терапия для мультилекарственной резистентности; и

(ix) иммунотерапевтические подходы, включая, например ex vivo и in vivo подходы для повышения иммуногенности опухолевых клеток пациента, например, трансфекция цитокинами, такими, как интерлейкин 2, интерлейкин 4 или гранулоцитарно-моноцитарный колониестимулирующий фактор, подходы для уменьшения Т-клеточной толерантности, подходы с применением трансфектированных иммунных клеток, таких, как цитокин-трансфектированные дендритные клетки, подходы с применением цитокин-трансфектированных клеточных опухолевых линий и подходы с применением анти-идиопатических антител.

[0407] Агент связывания в соответствии с данным изобретением и один или более из приведенных выше дополнительных медицинских компонентов могут быть использованы при получении медикамента. Медикамент может быть для отдельного или комбинированного введения субъекту и соответственно может содержать агент связывания и дополнительный компонент в виде комбинированного препарата или отдельных препаратов. Отдельные препараты могут быть использованы для облегчения последовательного или одновременного введения и позволяют введение компонентов различными маршрутами, например, пероральное и парентеральное введение.

[0408] В соответствии с данным изобретением, обеспеченная композиция может быть введена млекопитающим. Введение обычно осуществляют в "терапевтически эффективном количестве", этого достаточно, чтобы проявить благоприятное воздействие на пациента. Такое благоприятное воздействие может быть как минимум улучшением одного симптома. Фактическое введенное количество и скорость и период введения будут зависеть от природы и тяжести того, что лечат, конкретного млекопитающего, которого лечат, клинического состояния отдельного пациента, причины расстройства, места доставки композиции, типа агента связывания, способа введения, режима введения и других факторов, известных практикующим врачам. За назначение лечения, например, решения о дозировке и т.д., несут ответственность врачи широкого профиля и другие врачи и оно может зависеть от тяжести симптомов и/или прогрессирования заболевания, которое лечат. Соответствующие дозы антител хорошо известны из уровня техники (Ledermann J.A. et al. (1991) Int. J. Cancer 47: 659-664; Bagshawe K.D. et al. (1991) Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals 4: 915-922). Могут быть использованы конкретные дозировки, указанные в данной заявке, или в Physician's Desk Reference (2003) как соответствующие типу медикамента, который вводят. Терапевтически эффективное количество или приемлемая дозы агента связывания в соответствии с

данным изобретением может быть определена путем сравнения его активности *in vitro* и *in vivo* в животной модели. Способы экстраполяции эффективных дозировок у мышей и других тестовых животных на людей известны. Точная доза будет зависеть от ряда факторов, включая то, предназначено ли антитело для диагностики, профилактики или для лечения, размера и расположения площади, подлежащей лечению, точного характера антитела (например, целое антитело, фрагмент или диабоди) и природы любой детектируемой метки или другой молекулы, присоединенной к антителу. Типичная доза антитела будет находиться в диапазоне от 100 мкг до 1 г для системных применений и от 1 мкг до 1 мг для местных применений. Может быть введена начально более высокая доза нагрузки, с последующей одной или более низкими дозами. Типично, антитело будет целым антителом, например, IgG1 изотипом. Это доза для эффективного лечения взрослого пациента, которая может быть пропорционально отрегулирована для детей и младенцев и также отрегулирована для других форматов антител в пропорции к молекулярной массе. Лечение может быть повторено ежедневно, два раза в неделю, еженедельно или ежемесячно, на усмотрение терапевта. Лечение может быть проведено каждые две - четыре недели для подкожного введения и каждые четыре - восемь недель для внутривенного введения. Лечение может быть периодическим, и период введения составляет приблизительно две недели или более, например, приблизительно три недели или более, приблизительно четыре недели или более, или приблизительно раз в месяц. Лечение может быть произведено до, и/или после хирургии, и/или может быть введено или применено непосредственно на анатомическое место хирургического лечения.

[0409] IL-6 агенты связывания в соответствии с данным изобретением могут предложить другие преимущества в терминах дозировки и требований к введению, по сравнению с антителами к sIL-6Ra. Как отмечено во всей нашей заявке, уровни IL-6 в крови значительно более низкие, чем уровни в крови sIL-6Ra при заболевании. Соответственно, использование IL-6 агента связывания, в отличие от анти-IL-6R агента связывания, имеет значительные преимущества, состоящие в том, что количество лекарственного средства для производства каждой дозы для пациентов может быть меньшим. Также если доза анти-IL6 терапевтического средства является более низкой, то могут быть значительные преимущества, состоящие в том, что низкая доза способствует подкожным инъекциям, а также внутривенным (i.v.) инъекциям. Специалистам в данной области хорошо известно, что подкожная дозировка может быть ограничена количеством компонента связывания, например, молекулой антитела, необходимой на одну дозу. Это вызвано тем, что подкожные инъекции ограничены объемом, который может быть впрыснут в одном месте на коже. Типично используют объемы подкожных инъекций 1,2 мл или менее. Поскольку могут составляться более сложные, композиции, то агент связывания для подкожной инъекции при концентрациях более 50 мг/мл, в дозах более 100 мг посредством данного маршрута обычно требует множественных инъекций, что более дискомфортно для пациента.

[0410] Более низкая доза анти-IL-6 лекарственных средств может также требовать более низкой дозы "нагрузки" антитела для ингибирования всех системных IL-6 по сравнению с системными sIL-6Ra, поскольку оно имеет более высокую концентрацию.

[0411] Дополнительные полезные эффекты могут быть связаны с направляющим IL-6, скорее, чем с IL-6 рецептором, что представляет собой дополнительные преимущества агентов связывания в соответствии с данным изобретением по сравнению с агентами связывания для IL-6Ra.

[0412] Например, существуют данные в литературе, которые демонстрируют, что уровни в крови IL-6 являются значительно более низкими, чем уровни в крови sIL-6Ra

при заболевании (Desgeorges et al. (1997) J. Rheumatol 24:1510; Yokota et al. (2005) Arth & Rheum 52(3): 818-25). Поскольку уровни sIL-6R являются значительно более высокими, чем уровни IL-6, может требоваться большее количество анти-sIL-6R агента связывания для нейтрализации sIL-6Ra, по сравнению с количеством анти-IL-6 агента связывания, необходимого для нейтрализации IL-6. Следовательно, может быть необходима более низкая доза анти-лигандного агента связывания, по сравнению со случаями применения анти-рецепторного агента связывания.

[0413] Конъюгированный IL-6 лиганд, скорее, чем IL-6 рецептор, может уменьшать уровни IL-6 при заболевании, но продолжает позволять увеличение уровней IL-6 во время инфекции, когда IL-6 активирован как часть иммунного ответа.

[0414] Kawano et al. (Nature (1988) 332:83) показали, что IL-6 является эффективным фактором роста и показали, что миеломные клетки, свежесыведенные из пациентов, продуцировали IL-6 и экспрессировали его рецепторы. Дополнительно, анти-IL-6 антитело ингибирует рост *in vitro* миеломных клеток. Это непосредственно свидетельствует о том, что аутокринная петля задействована в онкогенезе человеческих миелом. После данного исследования, Van Zaanen et al. (J. Clin. Invest. (1996) 98:1441-1448) продемонстрировали, что продуцирование IL-6 у пациентов с множественной миеломой уменьшается при лечении анти-IL-6 лигандным антителом.

[0415] Ряд дополнительных исследований продемонстрировал, что IL-6 задействован в аутокринной петле обратной связи в других клеточных линиях, например, клетках гладких мышц (КГМ) (Klouché et al., (1999) J. Immunol. 163(8) 4583-9), U373-MG астроглиомных клетках (Oh et al., (2001) J. Immunol. 166: 2695-704), 3T3 адипоцитах (Fasshauer et al., (2003) Horm. Metab. Res. 35(3) 147-52), нейронах (Marz et al., (1998) Proc. Natl. Acad. Sci USA 95(6) 3251-6), эндотелиальных клетках (Modur et al., (1997) J. Clin. Invest. 100(1) 2752-6) и клетках саркомы Капоши (Murakami-Morl et al., (1996) Cell Growth Differ. 7(12) 1697-703). Ингибирование IL-6 при помощи анти-IL6 агента связывания при заболевании может, поэтому приводить к уменьшению базального болезненного продуцирования IL-6.

[0416] Дополнительно, анти-IL-6 агенты связывания связывают IL-6 в большем круге кровообращения, в отличие от агентов связывания с IL-6 рецептором, которому требуется проникнуть в ткани для занятия рецептора на поверхности клетки, задействованной в патологии заболевания, которое подлежит лечению.

[0417] Агенты связывания с IL-6 могут образовывать равновесие с IL-6 в большем круге кровообращения, приводя к возникновению градиентов через барьеры, например, синовиальную оболочку, которая действует как сетка при удалении активного IL-6 из сустава и образует инактивный комплекс с агентом связывания. Следствием этого является то, что IL-6 агент связывания может иметь более быстрое проявление и что режим дозирования может отличаться и быть, возможно, более легким для оптимизации, по сравнению с IL-6R агентом связывания.

[0418] Передача IL-6 сигнала опосредована IL-6 связыванием с IL-6R и комплексным связыванием с gp130. При условии, что IL-6 и IL-6Ra связывание имеет наномолярную аффинность (приблизительно 5 нМ) и что IL6:IL6R комплекс и gp130 связывание имеет пикомолярную аффинность, агент связывания, направляющий IL-6, сталкивается с более низкой конкуренцией за IL-6 связывание и поэтому может подавлять большую часть IL-6 сигналов. Хотя это может также применяться для агента связывания, направленного на растворимый IL-6Ra и профилактику образования комплекса IL-6: IL-6Ra, если IL-6Ra мембранно связан, то ввиду стерических ограничений, это может быть более сложным для анти-IL-6Ra связывать и ингибировать IL-6Ra, присутствующий

на оболочке.

[0419] Данное изобретение представляет способы профилактики, лечения и/или контроля расстройства, например, расстройства, связанного или характеризующегося аберрантной экспрессией и/или активностью IL-6, расстройства, связанного с аберрантной экспрессией и/или активностью IL-6 рецептора, аутоиммунного расстройства, воспалительного расстройства, пролиферативного расстройства, инфекции, или одного или более их симптомов путем введения субъекту эффективного количества композиций в соответствии с данным изобретением. Известны различные системы доставки, которые могут быть применены для введения композиции в соответствии с данным изобретением или профилактического или терапевтического агента. Способы введения композиций в соответствии с данным изобретением или терапии (например, профилактического или терапевтического агента) включают, не ограничиваясь приведенным, парентеральное введение (например, интрадермальное, внутримышечное, интраперитонеальное, внутривенное перинеуральное и подкожное), эпидуральное введение, местное введение и введение в слизистую оболочку (например, но, не ограничиваясь приведенным, интраназальный и пероральный маршруты). В конкретном варианте исполнения, композиции в соответствии с данным изобретением вводят внутримышечно, внутривенно, или подкожно. В одном варианте исполнения, композиции в соответствии с данным изобретением вводят подкожно. Композиция может быть введена любым удобным маршрутом, например путем инфузии или болюсной инъекции, путем поглощения через эпителиальные или кожно-слизистые слои (например, слизистую оболочку полости рта, ректальную и кишечную слизистую оболочку и т.д.) и может быть введена вместе с другими биологически активными агентами. Введение может быть системным или местным.

[0420] Данное изобретение также представляет то, что композиция в соответствии с данным изобретением упакована в герметично закрытый контейнер, такой, как ампула или саше, с указанием количества антитела (включая его антительные фрагменты). В одном варианте исполнения, композиция в соответствии с данным изобретением находится в герметично закрытом контейнере с указанием количества и концентрации антитела (включая его антительные фрагменты). В одном варианте исполнения, композицию в соответствии с данным изобретением поставляют в герметично закрытом контейнере и она содержит приблизительно 10 мг/мл, приблизительно 15 мг/мл, приблизительно 20 мг/мл, приблизительно 30 мг/мл, приблизительно 40 мг/мл, приблизительно 50 мг/мл, приблизительно 60 мг/мл, приблизительно 70 мг/мл, приблизительно 80 мг/мл, приблизительно 90 мг/мл, приблизительно 100 мг/мл, приблизительно 150 мг/мл, приблизительно 175 мг/мл, приблизительно 200 мг/мл, приблизительно 250 мг/мл, или приблизительно 300 мг/мл антитела (включая его антительные фрагменты) которое специфично связывается с IL-6, в количестве приблизительно 1 мл, приблизительно 2 мл, приблизительно 3 мл, приблизительно 4 мл, приблизительно 5 мл, 6 приблизительно мл, приблизительно 7 мл, приблизительно 8 мл, приблизительно 9 мл, приблизительно 10 мл, приблизительно 15 мл, или приблизительно 20 мл. В конкретном варианте исполнения в соответствии с данным изобретением, композицию поставляют в герметично закрытом контейнере и содержат как минимум приблизительно 15 мг/мл, как минимум приблизительно 20 мг/мл, как минимум приблизительно 25 мг/мл, как минимум приблизительно 50 мг/мл, как минимум приблизительно 100 мг/мл, как минимум приблизительно 150 мг/мл, как минимум приблизительно 175 мг/мл, как минимум приблизительно 200 мг/мл, как минимум приблизительно 250 мг/мл или как минимум приблизительно 300 мг/мл антитела

(включая его антительные фрагменты) которые специфично связываются с IL-6 (например, но, не ограничиваясь приведенным, Антитело 18E) для внутривенных инъекций и как минимум приблизительно 15 мг/мл, как минимум приблизительно 20 мг/мл, как минимум приблизительно 50 мг/мл, как минимум приблизительно 80 мг/мл, как минимум приблизительно 100 мг/мл, как минимум приблизительно 150 мг/мл, как минимум приблизительно 175 мг/мл, как минимум приблизительно 200 мг/мл, как минимум приблизительно 250 мг/мл или как минимум приблизительно 300 мг/мл антитела которое специфично связывается с IL-6 (например, но, не ограничиваясь приведенным, Антитело 18E) для повторного подкожного введения.

[0421] Количество композиции в соответствии с данным изобретением, которое будет эффективным для профилактики, лечения и/или контроля заболевания или расстройства, связанных или характеризующихся аберрантной экспрессией и/или активностью IL-6, заболевания или расстройства, связанных или характеризующихся аберрантной экспрессией и/или активностью IL-6 рецептора или его одного или более субъединиц, аутоиммунного заболевания, отторжения трансплантата, заболевания «трансплантат против хозяина», или одного или более их симптомов, может быть определено при помощи стандартных клинических методов, хорошо известных в данной области, или описанных в данной заявке. Точная доза для применения в композиции будет также зависеть от маршрута введения и серьезности воспалительного расстройства или аутоиммунного расстройства и должна быть определена на усмотрение практикующего врача и обстоятельств каждого из пациентов. Эффективные дозы могут быть экстраполированы из кривых доза-ответ, полученных из *in vitro* или из тестовых систем животных моделей.

[0422] Для композиций антител, охваченных данным изобретением, дозировка, введенная пациенту, может быть рассчитана с использованием массы пациента в килограммах (кг), умноженной на дозу для введения в мг/кг. Необходимый объем (в мл), который предназначен для приема, затем определяют путем взятия мг требуемой дозы, разделенной на концентрацию композиции антитела. Конечный рассчитанный необходимый объем будет получен путем объединения содержимого такого количества ампул, которое требуется для наполнения шприца (шприцов) для введения композиции антитела в соответствии с данным изобретением. Конечный рассчитанный необходимый объем будет получен путем объединения содержимого такого количества ампул, которое требуется для наполнения шприца (шприцов) для введения лекарственного средства. Максимальный объем в 2,0 мл композиции антитела может быть впрыснут на один сайт. Доза (в мл) может быть рассчитана при помощи следующей формулы: Доза (мл) = [масса добровольца](кг) × [доза] мг/кг ÷ 100 мг/мл композиции антитела. Антитела в соответствии с данным изобретением имеют пролонгированный период полувыведения в человеческом организме. Таким образом, часто являются возможными более низкие дозировки антитела в соответствии с данным изобретением и менее частое введение. Дополнительно, дозировка, объем и частота введения композиций в соответствии с данным изобретением могут быть уменьшены путем увеличения концентрации антител в композиции, увеличения аффинности и/или avidности антитела.

[0423] В конкретном варианте исполнения, дозировка, введенная пациенту, будет рассчитана с использованием массы пациента в килограммах (кг), умноженной на дозу для введения в мг/кг. Необходимый объем (в мл) для введения затем определяют путем взятия мг необходимой дозы, разделенной на концентрацию антитела (включая его антительные фрагменты) в композиции (100 мг/мл). Конечный рассчитанный необходимый объем будет получен путем объединения содержимого такого количества

ампул, которое требуется для наполнения шприца (шприцов) для введения лекарственного средства. Максимальный объем 2,0 мл антитела (включая его антительные фрагменты) в композиции будет впрыснут на одну точку.

[0424] В конкретном варианте исполнения, 0,1-20 мг/кг/неделя, 1-15 мг/кг/неделя, 2-8 мг/неделя, 3-7 мг/кг/неделя, или 4-6 мг/кг/неделя антитела (включая его антительные фрагменты), которое специфично связывается с IL-6 (например, но, не ограничиваясь приведенным, 1 Антитело 18E), в композиции в соответствии с данным изобретением вводят субъекту с воспалительным расстройством или аутоиммунным расстройством. В другом варианте исполнения, субъекту вводят одну или более доз профилактически или терапевтически эффективного количества композиции в соответствии с данным изобретением, где профилактически или терапевтически эффективное количество не совпадает для каждой дозы.

[0425] В одном варианте исполнения, композицию в соответствии с данным изобретением вводят в режиме дозирования, который сохраняет концентрацию в плазме антитела специфичной для IL-6 на желательном уровне (например, от приблизительно 0,1 до приблизительно 100 мкг/мл), что непрерывно блокирует активность IL-6. В конкретном варианте исполнения, концентрация в плазме антитела сохраняется приблизительно 0,2 мкг/мл, приблизительно 0,5 мкг/мл, приблизительно 1 мкг/мл, приблизительно 2 мкг/мл, приблизительно 3 мкг/мл, приблизительно 4 мкг/мл, приблизительно 5 мкг/мл, приблизительно 6 мкг/мл, приблизительно 7 мкг/мл, приблизительно 8 мкг/мл, приблизительно 9 мкг/мл, приблизительно 10 мкг/мл, приблизительно 15 мкг/мл, приблизительно 20 мкг/мл, приблизительно 25 мкг/мл, приблизительно 30 мкг/мл, приблизительно 35 мкг/мл, приблизительно 40 мкг/мл, приблизительно 45 мкг/мл или приблизительно 50 мкг/мл. Концентрация в плазме, которая является желательной у субъекта, будет варьировать в зависимости от нескольких факторов, включая, но, не ограничиваясь приведенным, природу заболевания или расстройства, тяжести заболевания или расстройства и состояния субъекта. Такие режимы дозирования являются особенно полезными при профилактике, лечении и/или контроле хронического заболевания или расстройства.

[0426] В конкретных вариантах исполнения, композицию в соответствии с данным изобретением, которое содержит конъюгированное антитело (включая его антительные фрагменты), специфичные к IL-6, вводят с перерывами. Как используют в данной заявке, "конъюгированное антитело или фрагмент антитела" относится к антителу (включая его антительные фрагменты), которое конъюгировано или гибридизовано с другим фрагментом, включая, но, не ограничиваясь приведенным, гетерологический пептид, полипептид, другое антитело (включая его антительные фрагменты), маркерную последовательность, диагностический агент, полимер, альбумин и твердую подложку.

[0427] В другом варианте исполнения, человеческому субъекту вводят одну или более доз профилактически или терапевтически эффективного количества антитела, которое специфично связывается с IL-6 (например, но не ограничиваясь приведенным, Антитело 18E) в композиции в соответствии с данным изобретением, где доза профилактически или терапевтически эффективного количества антитела в композиции в соответствии с данным изобретением, введенная указанному субъекту, увеличена на, например, приблизительно 0,01 мкг/кг, приблизительно 0,02 мкг/кг, приблизительно 0,04 мкг/кг, приблизительно 0,05 мкг/кг, приблизительно 0,06 мкг/кг, приблизительно 0,08 мкг/кг, приблизительно 0,1 мкг/кг, приблизительно 0,2 мкг/кг, приблизительно 0,25 мкг/кг, приблизительно 0,5 мкг/кг, приблизительно 0,75 мкг/кг, приблизительно 1 мкг/кг, приблизительно 1,5 мкг/кг, приблизительно 2 мкг/кг, приблизительно 4 мкг/кг,

приблизительно 5 мкг/кг, приблизительно 10 мкг/кг, приблизительно 15 мкг/кг, приблизительно 20 мкг/кг, приблизительно 25 мкг/кг, приблизительно 30 мкг/кг, приблизительно 35 мкг/кг, приблизительно 40 мкг/кг, приблизительно 45 мкг/кг, приблизительно 50 мкг/кг, приблизительно 55 мкг/кг, приблизительно 60 мкг/кг, приблизительно 65 мкг/кг, приблизительно 70 мкг/кг, приблизительно 75 мкг/кг, приблизительно 80 мкг/кг, приблизительно 85 мкг/кг, приблизительно 90 мкг/кг, приблизительно 95 мкг/кг, приблизительно 100 мкг/кг, или приблизительно 125 мкг/кг, в ходе лечения.

[0428] В другом варианте исполнения, субъекту (например, человеку) вводят одну или более доз профилактически или терапевтически эффективного количества антитела которое специфично связывается с IL-6 (например, но, не ограничиваясь приведенным, Антитело 18E) в композиции в соответствии с данным изобретением, где доза профилактически или терапевтически эффективного количества антитела в композиции в соответствии с данным изобретением, введенная указанному субъекту, уменьшена на, например, приблизительно 0,01 мкг/кг, приблизительно 0,02 мкг/кг, приблизительно 0,04 мкг/кг, приблизительно 0,05 мкг/кг, приблизительно 0,06 мкг/кг, приблизительно 0,08 мкг/кг, приблизительно 0,1 мкг/кг, приблизительно 0,2 мкг/кг, приблизительно 0,25 мкг/кг, приблизительно 0,5 мкг/кг, приблизительно 0,75 мкг/кг, приблизительно 1 мкг/кг, приблизительно 1,5 мкг/кг, приблизительно 2 мкг/кг, приблизительно 4 мкг/кг, приблизительно 5 мкг/кг, приблизительно 10 мкг/кг, приблизительно 15 мкг/кг, приблизительно 20 мкг/кг, приблизительно 25 мкг/кг, приблизительно 30 мкг/кг, приблизительно 35 мкг/кг, приблизительно 40 мкг/кг, приблизительно 45 мкг/кг, приблизительно 50 мкг/кг, приблизительно 55 мкг/кг, приблизительно 60 мкг/кг, приблизительно 65 мкг/кг, приблизительно 70 мкг/кг, приблизительно 75 мкг/кг, приблизительно 80 мкг/кг, приблизительно 85 мкг/кг, приблизительно 90 мкг/кг, приблизительно 95 мкг/кг, приблизительно 100 мкг/кг, или приблизительно 125 мкг/кг, в ходе лечения.

Период полувыведения антитела

[0429] В определенных вариантах исполнения, период полувыведения анти-IL-6 антитела композиций и способов в соответствии с данным изобретением составляет как минимум приблизительно 10 дней. В определенных вариантах исполнения, средний период полувыведения анти-IL-6 антитела композиций и способов в соответствии с данным изобретением составляет как минимум приблизительно 20-40 дней, 25-40 дней, 26-40 дней, 20-30 дней, 25-30 дней, 26-30 дней, или 26-29 дней. В еще одних дополнительных вариантах исполнения период полувыведения анти-ICOS антитела композиций и способов в соответствии с данным изобретением может составлять до приблизительно 50 дней. В определенных вариантах исполнения, периоды полувыведения антитела композиций и способов в соответствии с данным изобретением могут быть пролонгированы при помощи способов, известных из уровня техники. Такое пролонгирование может в свою очередь уменьшать количество и/или частоту дозировок композиций антител. Антитела с улучшенными *in vivo* периодами полувыведения и способы их получения описаны в патенте США №6,277,375; и международных публикациях №№ WO 98/23289 и WO 97/3461.

[0430] Циркуляция в сыворотке анти-IL-6 антитела *in vivo* может быть также пролонгирована при помощи присоединения молекул инертного полимера, такого, как высокомолекулярный полиэтиленгликоль (ПЭГ) к антителу с или без мультифункциональным линкером через сайт-специфичное конъюгирование ПЭГ и N-или C-конца антитела или посредством эпислон-амино групп, присутствующих на

лизильных остатках. Будет использована дериватизация линейного или разветвленного полимера, приводящая к минимальной потере биологической активности. Степень конъюгации может быть тщательно проконтролирована ДСН-PAGE и масс-спектрометрией для обеспечения надлежащей конъюгации молекул ПЭГ к антителу.

5 Непрореагировавший ПЭГ может быть отделен от конъюгатов антитело-ПЭГ при помощи эксклюзионной или ион-обменной хроматографии. ПЭГ-дериватизованные антитела могут быть проанализированы на предмет активности связывания, а также на эффективность *in vivo* при помощи способов, известных специалисту в данной области, например, при помощи иммуноанализов, описанных в данной заявке.

10 [0431] Дополнительно, антитела композиций и способов в соответствии с данным изобретением могут быть конъюгированы с альбумином для того, чтобы сделать антитело более стабильным *in vivo* или имеющим более длительный период полувыведения *in vivo*. Такие методы хорошо известны из уровня техники, см., например, международные публикации №№ WO 93/15199, WO 93/15200 и WO 01/77137; и
15 европейский патент № EP 413,622, все из которых включены в данную заявку путем ссылки.

[0432] Дополнительно, были описаны варианты Fc участки, которые придают пролонгированный период полувыведения *in vivo* антителу (см., патентную публикацию США №:US 2003/0190311 A1). Описано применение Fc вариантов с пролонгированным
20 периодом полувыведения *in vivo* в комбинации с композициями и способами в соответствии с данным изобретением. В одном варианте исполнения, анти-IL-6 антитело в соответствии с данным изобретением содержит вариантный Fc участок с пролонгированным периодом полувыведения *in vivo*. В дополнительном варианте исполнения, анти-IL-6 антитело в соответствии с данным изобретением содержит
25 вариантный Fc участок, содержащий как минимум одно замещение аминокислотным остатком, выбранное из группы, состоящей из: остатков 252, 254 и 256, где аминокислотные положения определены в соответствии с конвенцией ЕС. В конкретном варианте исполнения, анти-IL-6 антитело в соответствии с данным изобретением содержит вариантный Fc участок, содержащий как минимум одно аминокислотное
30 замещение, выбрано из группы, состоящей из: M252Y, S254T и T256E; где аминокислотные положения определены в соответствии с конвенцией ЕС. В дополнительном варианте исполнения, анти-IL-6 антитело в соответствии с данным изобретением содержит вариантный Fc участок, содержащий как минимум один аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из: Y в положении 252, T
35 в положении 254 и E в положении 256; где аминокислотные положения определены в соответствии с конвенцией ЕС.

Fc варианты

[0433] Данное изобретение представляет анти-IL-6 антитела, содержащие вариантный Fc участок. То есть, не встречающийся в природе Fc участок, например Fc участок,
40 содержащий один или более одного не встречающихся в природе аминокислотных остатков. Также вариантами Fc участками в соответствии с данным изобретением охвачены Fc участки, содержащие аминокислотные делеции, добавления и/или модификации.

[0434] Будет понятно, что Fc участок, как используют в данной заявке, включает
45 полипептиды, содержащие константный участок антитела, за исключением иммуноглобулинового домена первого константного участка. Таким образом Fc относится к последним двум иммуноглобулиновым доменам константного участка IgA, IgD и IgG, и последним трем иммуноглобулиновым доменам константного участка

IgE и IgM, и гибкому шарнирному N-концу к данным доменам. Для IgA и IgM Fc может включать J цепь. Для IgG, Fc содержит иммуноглобулиновые домены Сгамма2 и Сгамма3 (C γ 2 и C γ 3) и шарнир от Сгамма1 (C γ 1) и Сгамма2 (C γ 2). Хотя границы Fc участка могут варьироваться, человеческий IgG Fc участок тяжелой цепи обычно определяют как содержащий остатки C226 и P230 к его карбокси-концу, где нумерация произведена в соответствии с индексом ЕС, как в Kabat et al. (1991, NIH публикация 91-3242, National Technical Information Service, Springfield, VA). "EU индекс, как приведено в Kabat" относится к нумерации остатков человеческого IgG1 EU антитела, как описано в Kabat et al. выше. Fc может относиться к данному участку при выделении, или данному участку в контексте антитела, фрагмента антитела, или Fc гибридного белка. Fc вариантный белок может быть антителом, Fc гибридом, или любым белком или белковым доменом, содержащим Fc, включая, но, не ограничиваясь приведенным, белки, содержащие варианты Fc участки, которые представляют собой не встречающиеся в природе варианты Fc. Примечание: полиморфизмы наблюдали в ряде Fc положений, включая, но, не ограничиваясь приведенным, Kabat 270, 272, 312, 315, 356 и 358, и, таким образом, существуют небольшие различия между представленной последовательностью и последовательностью из уровня техники.

[0435] Данное изобретение охватывает Fc варианты белки, имеющие измененные свойства связывания для Fc лиганда (например, Fc рецептор, Clq) относительно сравнимой молекулы (например, белка, имеющего ту же самую аминокислотную последовательность, за исключением того, что она имеет Fc участок дикого типа). Примеры свойств связывания включают, не ограничиваясь приведенным, специфичность связывания, константу равновесия диссоциации (K_D), скорости диссоциации и ассоциации (k_{off} и k_{on} соответственно), аффинность и/или avidность связывания. В общем, понятно, что молекула связывания (например, Fc вариантный белок, такой, как антитело) с низкой K_D может иметь преимущества для связывания молекулы с высокой K_D . Однако, в некоторых случаях, значение k_{on} или k_{off} может быть более релевантным, чем значение K_D . Специалист в данной области может определить, какой кинетический параметр является наиболее важным для применения данного антитела.

[0436] Аффинности и свойства связывания Fc домена для его лиганда могут быть определены при помощи различных способов анализа *in vitro* (биохимические или иммунологические анализы), известных из уровня техники для определения Fc-Fc γ R взаимодействий, т.е., специфичного связывания Fc участка с Fc γ R, включая, но, не ограничиваясь приведенным, равновесные способы (например, иммуносорбентный ферментный анализ (ELISA), или радиоиммунологическое исследование (RIA)), или кинетические способы (например, анализ BIACORE®) и другие способы, такие, как анализы непрямого связывания, анализы конкурентного ингибирования, резонансный перенос энергии флуоресценции (РПЭФ), гель-электрофорез и хроматография (например, гель-фильтрация). Эти и другие способы могут использовать метку на одном и более компоненте, которые исследуют и/или используют множество способов детекции, включая, но, не ограничиваясь приведенным, хромогенные, флуоресцентные, люминесцентные или изотопные метки. Подробное описание аффинностей и кинетики связывания можно найти в Paul, W.E., ed., *Fundamental Immunology*, 4th Ed., Lippincott-Raven, Philadelphia (1999), которое направлено на взаимодействия антитело-иммуноген.

[0437] В одном варианте исполнения, Fc вариантный белок имеет повышенное связывание с одним или более Fc лигандами относительно сравнимой молекулы. В другом варианте исполнения, Fc вариантный белок имеет аффинность для Fc лиганды,

которая в как минимум 2 раза, или как минимум 3 раза, или как минимум 5 раз, или как минимум 7 раз, или как минимум 10 раз, или как минимум 20 раз, или как минимум 30 раз, или как минимум 40 раз, или как минимум 50 раз, или как минимум 60 раз, или как минимум 70 раз, или как минимум 80 раз, или как минимум 90 раз, или как минимум 100 раз, или как минимум 200 раз превышает аффинность сравнимой молекулы. В конкретном варианте исполнения, Fc вариантный белок имеет повышенное связывание с Fc рецептором. В конкретном варианте исполнения, Fc вариантный белок имеет повышенное связывание с Fc рецептором FcRn.

[0438] Период полувыведения из сыворотки белков, содержащих Fc участки, может быть пролонгирован путем увеличения аффинности связывания Fc участка для FcRn. В одном варианте исполнения, Fc вариантный белок имеет пролонгированный период полувыведения из сыворотки относительно сравнимой молекулы.

[0439] В одном варианте исполнения, данное изобретение представляет композиции, где Fc участок содержит не встречающийся в природе аминокислотный остаток в одном или более положениях, выбранных из группы, состоящей из 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 251, 252, 254, 255, 256, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 279, 280, 284, 292, 296, 297, 298, 299, 305, 313, 316, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 332, 333, 334, 339, 341, 343, 370, 373, 378, 392, 416, 419, 421, 440 и 443, пронумерованных по EU индексу, как приведено в Kabat. Необязательно, Fc участок может содержать не встречающийся в природе аминокислотный остаток в дополнительных и/или альтернативных положениях, известных специалисту в данной области (см., например, патенты США 5,624,821; 6,277,375; 6,737,056; патентные публикации PCT WO 01/58957; WO 02/06919; WO 04/016750; WO 04/029207; WO 04/035752; WO 04/074455; WO 04/099249; WO 04/063351; WO 05/070963; WO 05/040217, WO 05/092925 и WO 06/020114).

[0440] В конкретном варианте исполнения, данное изобретение представляет Fc вариантную белковую композицию, где Fc участок содержит как минимум один не встречающийся в природе аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из 234D, 234E, 234N, 234Q, 234T, 234H, 234Y, 234I, 234V, 234F, 235A, 235D, 235R, 235W, 235P, 235S, 235N, 235Q, 235T, 235H, 235Y, 235I, 235V, 235F, 236E, 239D, 239E, 239N, 239Q, 239F, 239T, 239H, 239Y, 240I, 240A, 240T, 240M, 241W, 241L, 241Y, 241E, 241R, 243W, 243L, 243Y, 243R, 243Q, 244H, 245A, 247L, 247V, 247G, 251F, 252Y, 254T, 255L, 256E, 256M, 262I, 262A, 262T, 262E, 263I, 263A, 263T, 263M, 264L, 264I, 264W, 264T, 264R, 264F, 264M, 264Y, 264E, 265G, 265N, 265Q, 265Y, 265F, 265V, 265I, 265L, 265H, 265T, 266I, 266A, 266T, 266M, 267Q, 267L, 268E, 269H, 269Y, 269F, 269R, 270E, 280A, 284M, 292P, 292L, 296E, 296Q, 296D, 296N, 296S, 296T, 296L, 296I, 296H, 269G, 297S, 297D, 297E, 298H, 298I, 298T, 298F, 299I, 299L, 299A, 299S, 299V, 299H, 299F, 299E, 305I, 313F, 316D, 325Q, 325L, 325I, 325D, 325E, 325A, 325T, 325V, 325H, 327G, 327W, 327N, 327L, 328S, 328M, 328D, 328E, 328N, 328Q, 328F, 328I, 328V, 328T, 328H, 328A, 329F, 329H, 329Q, 330K, 330G, 330T, 330C, 330L, 330Y, 330V, 330I, 330F, 330R, 330H, 332D, 332S, 332W, 332F, 332E, 332N, 332Q, 332T, 332H, 332Y, 332A, 339T, 370E, 370N, 378D, 392T, 396L, 416G, 419H, 421K, 440Y и 434W, как пронумеровано при помощи ЕС индекса, как указано в Kabat. Необязательно, Fc участок может содержать дополнительные и/или альтернативные не встречающиеся в природе аминокислотные остатки, известные специалисту в данной области (см., например, патенты США 5,624,821; 6,277,375; 6,737,056; патентные публикации PCT WO 01/58957; WO 02/06919; WO 04/016750; WO 04/029207; WO 04/035752 и WO 05/040217).

[0441] В другом варианте исполнения, данное изобретение представляет Fc вариантную белковую композицию, где Fc участок содержит как минимум не встречающуюся в природе аминокислоту в одном или более положениях, выбранных

из группы, состоящей из 239, 330 и 332, как пронумеровано при помощи ЕС индекса, как приведено в Kabat. В конкретном варианте исполнения, данное изобретение представляет Fc вариантную белковую композицию, где Fc участок содержит как минимум одну не встречающуюся в природе аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из 239D, 330L и 332E, как пронумеровано при помощи ЕС индекса, как приведено в Kabat. Необязательно, Fc участок может дополнительно содержать дополнительную не встречающуюся в природе а аминокислоту в одном или более положениях, выбранную из группы, состоящей из 252, 254 и 256, как пронумеровано при помощи ЕС индекса, как приведено в Kabat. В конкретном варианте исполнения, данное изобретение представляет Fc вариантную белковую композицию, где Fc участок содержит как минимум одну не встречающуюся в природе аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из 239D, 330L и 332E, как пронумеровано при помощи EU индекса, как приведено в Kabat, и как минимум одну не встречающуюся в природе аминокислоту в одном или более положениях, которые выбирают из группы, состоящей из 252Y, 254T и 256E, как пронумеровано при помощи ЕС индекса, как приведено в Kabat.

[0442] В одном варианте исполнения, Fc варианты данного изобретения могут быть скомбинированы с другими известными Fc вариантами, такими, как описано в Ghetie et al., 1997, Nat Biotech. 15:637-40; Duncan et al., 1988, Nature 332:563-564; Lund et al., 1991, J. Immunol 147:2657-2662; Lund et al., 1992, Mol Immunol 29:53-59; Alegre et al., 1994, Transplantation 57:1537-1543; Hutchins et al., 1995, Proc Natl. Acad Sci USA 92:11980-11984; Jefferis et al., 1995, Immunol Lett. 44:111-117; Lund et al., 1995, Faseb J 9:115-119; Jefferis et al., 1996, Immunol Lett 54:101-104; Lund et al., 1996, J Immunol 157:4963-4969; Armour et al., 1999, Ser J Immunol 29:2613-2624; Idusogie et al., 2000, J Immunol 164:4178-4184; Reddy et al., 2000, J Immunol 164:1925-1933; Xu et al., 2000, Cell Immunol 200:16-26; Idusogie et al., 2001, J Immunol 166:2571-2575; Shields et al., 2001, J Biol Chem 276:6591-6604; Jefferis et al., 2002, Immunol Lett 82:57-65; Presta et al., 2002, Biochem Soc Trans. 30:487-490); патентах США №№5,624,821; 5,885,573; 5,677,425; 6,165,745; 6,277,375; 5,869,046; 6,121,022; 5,624,821; 5,648,260; 6,528,624; 6,194,551; 6,737,056; 6,821,505; 6,277,375; патентных публикациях США №№2004/0002587 и PCT публикациях WO 94/29351; WO 99/58572; WO 00/42072; WO 02/060919; WO 04/029207; WO 04/099249; WO 04/063351. Также данное изобретение охватывает Fc участки, содержащие делеции, добавления и/или модификации. Другие модификации/замещения/добавления/делеции Fc домена будут с легкостью очевидны специалисту в данной области.

[0443] Способы генерирования не встречающихся в природе Fc участков известны в данной области. Например, аминокислотные замещения и/или делеции могут быть получены при помощи способов мутагенеза, включая, но, не ограничиваясь приведенным, сайт-направленный мутагенез (Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488-492 (1985)), ПЦР мутагенез (Higuchi, in "PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications", Academic Press, San Diego, pp. 177-183 (1990)) и кассетный мутагенез (Wells et al., Gene 34:315-323 (1985)). Преимущественно, сайт-направленный мутагенез выполняют при помощи перекрывающего-расширяющего ПЦР способа (Higuchi, in "PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification", Stockton Press, New York, pp. 61-70 (1989)). Метод перекрывающего-расширяющего ПЦР (Higuchi, ibid.) может быть также использован для введения любой желательной мутации(мутаций) в последовательность-мишень (исходную ДНК). Например, первый раунд ПЦР в перекрывающем-расширяющем способе включает амплификацию последовательности-мишени внешнего праймера (праймер 1) с внутренним мутагенезным праймером (праймер 3) и отдельно со вторым внешним праймером (праймер 4) со внутренним праймером (праймер 2),

приводя к получению двух ПЦР сегментов (сегменты А и В). Внутренний мутагенезный праймер (праймер 3) разработан как содержащий несовпадения для последовательности-мишени, указывающей на желательную мутацию (мутации). Во втором цикле ПЦР, продукты первого цикла ПЦР (сегменты А и В) амплифицированы при помощи ПЦР с использованием двух внешних праймеров (праймеры 1 и 4). Полученный в результате полноразмерный ПЦР сегмент (сегмент С) расщеплен с рестриктазами и полученный фрагмент рестрикции клонирован в соответствующий вектор. В качестве первой стадии мутагенеза, начальная ДНК (например, кодирующая Fc гибридный белок, антитело или просто Fc участок), функционально клонирована в мутагенезный вектор. Праймеры разработаны для отображения желаемого аминокислотного замещения. Другие способы, полезные для генерирования вариантных Fc участков, известны из уровня техники (см., например, патенты США №№5,624,821; 5,885,573; 5,677,425; 6,165,745; 6,277,375; 5,869,046; 6,121,022; 5,624,821; 5,648,260; 6,528,624; 6,194,551; 6,737,056; 6,821,505; 6,277,375; патентные публикации США №№2004/0002587 и публикации PCT WO 94/29351; WO 99/58572; WO 00/42072; WO 02/060919; WO 04/029207; WO 04/099249; WO 04/063351).

[0444] В некоторых вариантах исполнения, Fc вариантный белок содержит одну или более сконструированных гликоформ, т.е., углеводную композицию, которая ковалентно присоединена к молекуле, содержащей Fc участок. Сконструированные гликоформы могут быть полезны для различных целей, включая, но, не ограничиваясь приведенным, повышение или снижение эффекторной функции. Сконструированные гликоформы могут быть получены любым способом, известным специалисту в данной области, например путем применения сконструированных или вариантных штаммов экспрессии, путем совместной экспрессии с одним или более ферментами, например DI N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III (GnTIII), путем экспрессии молекулы, содержащей Fc участок в различных организмах или клеточных линиях из различных организмов, или путем модифицирования углевода(ов) после экспрессии молекулы, содержащей Fc участок. Способы генерирования конструирования гликоформ известны в данной области и включают, не ограничиваясь приведенным, описанные в Umana et al., 1999, Nat. Biotechnol 17:176-180; Davies et al., 20017 Biotechnol Bioeng 74:288-294; Shields et al., 2002, J Biol Chem 277:26733-26740; Shinkawa et al., 2003, J Biol Chem 278:3466-3473) патент США №6,602,684; патентную заявку США серийный номер 10/277,370; патентную заявку США серийный номер 10/113,929; PCT WO 00/61739 A1; PCT WO 01/292246 A1; PCT WO 02/311140 A1; PCT WO 02/30954 A1; Pottilegent™ технологию (Biowa, Inc. Princeton, N.J.); технологию конструирования гликозилирования GlycoMAb™ (GLYCART biotechnology AG, Zurich, Switzerland). См., например, WO 00061739; EA 01229125; US 20030115614; Okazaki et al., 2004, JMB, 336: 1239-49.

Примеры

[0445] Данное изобретение теперь описано со ссылкой на следующие примеры. Данные примеры обеспечены только в целях иллюстрации и данное изобретение не должно быть никоим образом истолковано как ограничивающее данные примеры, но скорее должно быть истолковано как охватывающее любые и все вариации, которые становятся очевидными как результат доктрин, обеспеченных в данной заявке.

Пример 1. Выделение анти-IL-6 антитела

[0446] Подробное описание выделения Антитела 18 и других анти-IL-6 антител, которые могут быть использованы для реализации изобретений, описанных в данной заявке, обеспечено в публикации PCT № WO 2008/065378. Кратко, прекурсор к Антителу 18 был выделен посредством скрининга библиотеки фаговым дисплеем с использованием

рекомбинантного человеческого IL-6 в качестве мишени. Прекурсор подвергали оптимизации аффинности с получением нескольких высокоаффинных человеческих анти-IL-6 антител. Характеристика данных антител описана в публикации PCT № WO 2008/065378. Антитело 18 способно к блокированию IL-6 связывания с IL-6R. Антитело 18 связывается с человеческим IL-6 и IL-6 яванских макаков, но не связывает IL-6, полученное от мыши, крысы или собаки. Антитело 18 связывается с человеческим IL-6 с аффинностью, которая превышает уровень детекции 10 пМ анализа BIAcore. Аффинность Антитела 18 к человеческому IL-6 была установлена для 0,40 пМ (95% CI 0,12 пМ - 0,69 пМ) с использованием TF-1 анализа клеточной пролиферации.

Пример 2. Анти-IL-6 антитело с пролонгированным периодом полувыведения 2,1 Генерация вариантного анти-IL-6 IgG1 антитела, содержащего Fc участок, содержащий M252Y, S254T и T256E замещения

[0447] Вектор экспрессии, кодирующий Антитело 18, был модифицирован при помощи стандартных лабораторных способов для введения M252Y, S254T и T256E замещений в Fc участок. Модифицированное Антитело 18, содержащее M252Y, S254T и T256E замещения, в данной заявке имеет название Антитело 18E или 18E.

[0448] Полинуклеотиды, кодирующие тяжелые и легкие цепи анти-IL6 антитела, могут быть подвержены оптимизации нуклеиновокислотных последовательностей. Конечной целью процесса оптимизации последовательностей является создание кодирующего участка, который транскрибирован и транслирован при наибольшей возможной эффективности. Оптимизация последовательностей достигается путем комбинации: (i) оптимизации использования кодонов, (ii) адаптации содержания G/C, (iii) устранения внутренних сайтов сплайсинга и сайтов преждевременного полиаденилирования, (iv) разрушения стабильных вторичных РНК структур, (v) устранения непосредственной повторной последовательности, (vi) устранения последовательности, которая может образовывать стабильные дсРНК с транскриптами клетки-хозяина, (vii) устранения последовательности, направленной микро РНК клеток хозяев, и (viii) введения РНК стабилизирующих сигналов и сигналов РНК транслокации. Подробные способы оптимизации последовательностей описаны в WO 2004059556 A2, WO 2006015789 A2, Bradel-Tretheway et al., J. Virol. Methods 111:145-56 (2003), Valencik & McDonald, Transgenic Res. 3:269-75 (2001). Альтернативно, последовательность может быть оптимизирована коммерческим провайдером (например, GENEART Inc.).

[0449] Нуклеотидные последовательности, кодирующие VH, VL, тяжелую цепь и легкую цепь Антитела 18E были оптимизированы в соответствии со способами, описанными в данной заявке. Оптимизированные нуклеотидные последовательности, кодирующие VH, VI, тяжелую цепь и легкую цепь 18E описаны как SEQ ID NOs:1-14, соответственно.

[0450] Антитело 18E экспрессировали в пуле CHO-K1 клетки, стабильно трансфектированной вектором экспрессии, содержащим кодирующий участок полноразмерного 18E антитела. Антитело 18E очищали от супернатанта при помощи стандартных лабораторных методов.

2,2 Характеристика *in vitro* вариантного анти-IL-6 IgG1 антитела, содержащего Fc участок, имеющий M252Y, S254T и T256E замещения

[0451] Антитело 18E содержит Fc участок, имеющий M252Y, S254T и T256E замещения.

Присутствие M252Y, S254T и T256E замещений в Fc участке Антитела 18E было подтверждено при помощи анализа ELISA. В анализе в качестве улавливающих реактивов использовали два моноклональных антитела, которые специфично связывают Fc полипептид, содержащий M252Y, S254T и T256E замещения, но не соответствует Fc

полипептиду дикого типа. Анализы ELISA выполняли в соответствии со стандартными протоколами. Кривая титрования ELISA, полученная с одним замещением специфического моноклонального антитела показана на Фигуре 1. Антитело 18Е, но не антитело 18, было уловлено в анализе ELISA при помощи антитела, специфического к M252Y, S254T и T256E Fc участку замещения. Поэтому, антитело 18 содержит Fc участок, имеющий M252Y, S254T и T256E замещения.

[0452] Fc полипептиды, содержащие M252Y, S254T и T256E замещения, имели повышенную аффинность связывания при pH 6 с FcRn по сравнению с аффинностью связывания Fc полипептида дикого типа. Аффинность связывания FcRn очищенного Антитела 18 и Антитела 18Е определяли при помощи анализа BIAcore. Анализ выполняли в соответствии со стандартными протоколами. Антитело 18Е связывается как с человеческим FcRn, так и с FcRn яванских макак при pH 6 со значительно более высокой аффинностью, чем у антител 18. Значение K_d, определенные при помощи BIAcore, показаны в Таблице 1.

Таблица 1. Аффинность связывания FcRn Антитела 18 и 18Е.

Антитело	KD человеческого FcRn (нМ)	KD FcRn яванских макак (нМ)
18	2610	1160
18Е	226	365

[0453] Антитело 18 и 18Е связывает IL-6 с в существенной степени равной аффинностью. Аффинность связывания IL-6 Антитела 18 и 18Е получали при помощи анализов ELISA. E. coli экспрессирующие рекомбинантный человеческий IL-6 препарат (rhuIL-6) использовали в качестве реагента улавливателя. Анализы ELISA выполняли в соответствии со стандартными протоколами. В дополнение к Антителу 18 и 18Е, два конкурентных анти-IL-6 антитела (АВ А и АВ В) были также включены в анализ в качестве позитивных контролей. Пример полученных данных показан на Фигуре 2. Значение EC₅₀ для антитела 18 и 18Е составляло 6,1 пМ и 6,5 пМ, соответственно.

[0454] Антитело 18 и 18Е ингибируют IL-6 вызванную TF-1 клеточную пролиферацию с существенно идентичной эффективностью. Анализ IL-6 вызванной TF-1 клеточной пролиферации выполняли в существенной степени, как описано в данной заявке. В дополнение к Антителу 18 и 18Е, два конкурентных анти-IL-6 антитела (АВ А и АВ В) были также включены в анализ в качестве позитивных контролей. Репрезентативные данные приведены на Фигуре 3. Значения IC₅₀, рассчитанные для Антитела 18 и 18Е, составляли 4,5 пМ и 5,2 пМ, соответственно.

[0455] Антитело 18 и 18Е ингибирует высвобождение эндогенного вызванного IL-6 фактора роста эндотелия сосудов из человеческих синовиальных фибробластов с существенно идентичной эффективностью. Анализ выполняли в существенной степени, как описано в данной заявке. В дополнение к Антителу 18 и 18Е, два конкурентных анти-IL-6 антитела (АВ А и АВ В) были также включены в анализ в качестве позитивных контролей. Репрезентативные данные приведены на Фигуре 4. Значения IC₅₀, рассчитанные для Антитела 18 и 18Е, составляли 1,3 пМ и 1,2 пМ, соответственно.

2,3 In vivo характеристика вариантного анти-IL-6 IgG1 антитела, содержащего Fc участок, имеющий M252Y, S254T и T256E замещения.

[0456] Фармакокинетическое и фармакодинамическое исследование разовой дозы у яванских макак было проведено для определения периода полувыведения и клиренса

Антитела 18 и 18Е в сыворотке. Дизайн исследования приведен в Таблице 2.

Таблица 2. Дизайн исследования для фармакокинетического эксперимента с разовой дозой.

Группа	Лечение	Доза (мг/кг)	Маршрут дозирования	Количество
1	18	5	внутривенно	3 мужские особи
2	18	5	подкожно	3 мужские особи
3	18Е	5	внутривенно	3 мужские особи
4	18Е	5	подкожно	3 мужские особи
5	18Е	50	подкожно	3 мужские особи

[0457] PK Assay (ECL) IL-6 улавливания антигена для количественного определения Антитела 18 или Антитела 18Е в плазме яванских макак: планшеты MA2400 на 96 лунок (MSD) покрывали 2,5 г/мл рекомбинантным человеческим IL-6 (R&D Systems) в течение ночи при 2-8°C, промывали фосфатно-буферным раствором, содержащим 0,05% Tween 20 и блокировали в течение 1-2 часов при комнатной температуре буфером I-Block (Tropix). Стандартные кривые для Антитела 18 и Антитела 18Е, контроль качества (КК) и разбавления тестовой пробы получали в 1% плазме яванских макак и добавляли к блокированным планшетам в течение 1 часа при комнатной температуре. Планшеты промывали, как описано выше, и инкубировали в течение еще 1 часа с 1 микрограмм/мл MSD-TAG (Рутений) - меченое-овечьим античеловеческим IgG (H+L) обезьяним поглощенным детекторным антителом (сайт связывания). Несвязанное детекторное антитело удаляли путем промывания и добавляли 150 микроль 1X считывающего буфера Т (MSD) в лунки планшеты. Планшеты считывали сразу же с MSD секторным преобразователем изображения 2400 и концентрации Антитела 18 и Антитела 18Е в КК и разведениях тестовой пробы на каждой планшете количественно определяли с использованием стандартной кривой для данной планшеты. Все анализы производили путем нанесения стандартной кривой концентрации - сигнал ECL на кривой подгонки Log-Log на программном обеспечении Softmax Pro GxP (Molecular Devices). Аналитический диапазон для количественного определения как Антитела 18, так и Антитела 18Е, составлял 10,000-13,7 нг/мл (10-0,0137 микрограмм/мл) в 100% плазме.

[0458] Данные анализа РК: Некомпарментный токсикокинетический анализ выполняли при индивидуальных данных РК от всех животных, используя WinNonlin Professional (версия 5,2, Pharsight Corp., Mountain View, CA), в соответствии со стандартной операционной процедурой MedImmune.

[0459] Полученные результаты приведены на Фигурах 5 и 6. Фигура 5 демонстрирует концентрацию в сыворотке Антитела 18 и 18Е через время после подкожного или внутривенного введения разовой дозы 5 мг/мл антитела. Как Антитело 18, так и 18Е, проявляли линейный профиль РК. Период полувыведения Антитела 18 в сыворотке составляет приблизительно от 8,5 дней до 9,1 дней после внутривенного и подкожного введения, соответственно. Период полувыведения Антитела 18Е в сыворотке составляет приблизительно 28,4 дней и 28,8 дней после внутривенного и подкожного введения, соответственно. Клиренс Антитела 18 составляет приблизительно 12,1 мл/день/кг и 13,1

мл/день/кг после внутривенного и подкожного введения, соответственно. Клиренс Антитела 18Е составляет приблизительно 2,8 мл/день/кг и 3,0 мл/день/кг после внутривенного и подкожного введения, соответственно. Биодоступность подкожно введенного Антитела 18 и 18Е составляла 94% и 96%, соответственно.

- 5 [0460] Фигура 6 демонстрирует концентрацию в сыворотке антител 18 и 18Е через время после подкожного введения разовой дозы 5 мг/кг антитела. Фигура 6 дополнительно демонстрирует общую концентрацию IL-6 в сыворотке, детектированную у животных после подкожного введения разовой дозы 5 мг/кг Антитела 18 или 18Е. Общие уровни IL-6 возрастали приблизительно втрое логарифмически по сравнению с фоном. Большее накопление общего IL-6 наблюдали с Антителом 18Е. Уменьшение общих уровней IL-6 было приблизительно параллельным уменьшению РК.

2,3 Моделирование % нейтрализации свободного IL-6 в плазме путем подкожно введенного анти-IL-6 антитела.

- 15 [0461] Концентрации свободного IL-6 являются очень низким при фоновой линии у здоровых животных. Поэтому было сложно непосредственно оценить % направленной нейтрализации после введения анти-IL-6 антитела путем измерения уровней свободного IL-6. Мы разработали модель РК/PD на программном пакете SAAM II для прогнозирования кинетики нейтрализации свободного IL-6 по отношению к РК антитела с использованием общего IL-6 в качестве PD маркера. Модель РК/PD описывает кинетику антитела, свободное IL-6, комплекс IL-6 и антитела, растворимый рецептор и комплекс IL-6 и растворимого рецептора. Разработанная модель адекватно описывала РК антитела и общую кинетику IL-6, полученную из исследований обезьян, и была использована для симулирования профилей РК/PD у человеческих пациентов с ревматоидным артритом посредством различных режимов дозирования при помощи допущения стандартного аллометрического масштабирования. 90% уровень ингибирования в человеческой плазме уровней свободного IL-6 был установлен, исходя из концентраций в сыворотке свободного IL-6, детектированного у пациентов с ревматоидным артритом (Uson et. al., J. of Rheumatology (1997) 24(11)2069-75).

- 30 [0462] Результаты PD моделирования приведены на Фигурах 7-10 и в Таблице 3. Модель прогнозирует, что непрерывное как минимум 90% ингибирование свободного IL-6 (т.е. не связанного с sIL-6R или IL-6R) может быть достигнуто путем введения Антитела 18Е в соответствии с любым из следующих режимов дозирования:

- 100 мг Антитела 18Е вводят подкожно каждые 8 недель;
- 50 мг Антитела 18Е вводят подкожно каждые 4 недели;
- 35 - разовую дозу нагрузки 200 мг Антитела 18Е вводят подкожно с последующими 100 мг Антитела 18Е, которое вводят подкожно каждые 8 недель; и
- разовую дозу нагрузки 100 мг Антитела 18Е вводят подкожно с последующими 50 мг Антитела 18Е, которое вводят подкожно каждые 4 недели.

- 40 [0463] Модель дополнительно прогнозирует, что аналогичный уровень непрерывного ингибирования свободного IL-6 в сыворотке потребует более частых и/или больших доз Антитела 18. Например, непрерывное как минимум 90% ингибирование свободного IL-6 (т.е. не связанного с sIL-6R или IL-6R) может быть достигнуто путем подкожного введения 100 мг Антитела 18 каждые 2 недели.

Таблица 3. Краткое описание результатов модели нейтрализации свободного IL-6 в плазме.

Интервал дозирования	Доза Антитела 18	Доза Антитела 18E
2 недели	100 мг SC IL-6 ингибирование $\geq$ 90%	
4 недели	100 мг SC IL-6 ингибирование $\leq$ 90%	50 мг подкожно или 2х дозы нагрузки + 50 мг подкожно поддерживающей дозы IL-6 ингибирование $\geq$ 90%
8 недель	500 мг SC IL-6 ингибирование $\leq$ 90%	100 мг подкожно или 2х дозы нагрузки + 100 мг подкожно поддерживающей дозы IL-6 ингибирование $\geq$ 90%
12 недель		100 мг подкожно IL-6 ингибирование $\leq$ 90%

[0464] Данные результаты демонстрируют способность анти-IL-6 антитела ингибировать системный эффект IL-6 in vivo. В то же время, конкретные варианты исполнения данного изобретения описаны выше, в целях описания, и специалист в данной области поймет, что различные вариации деталей могут быть произведены, не выходя за данное изобретение, как описано в формуле изобретения, которая прилагается.

Пример 3 Эффективность в модели воспалительной боли, вызванной мышинным ПАФ

[0465] mAb406 (анти-мышинное IL-6, очищенное от моноклонального IgG1, клон MP5-20F3, лот ANV100904A, R&D Systems) анализировали на предмет способности обращать воспалительную боль, вызванную местным подкожным введением полного адьюванта Фрейнда, ("ПАФ") (20 микролитров) в мышинном хвосте (3 см от удаленного кончика хвоста). Данное вещество производит местный воспалительный ответ, постепенно увеличивающийся со временем и достигающий плато через 24-48 часов после введения. Полученное в результате воспаление продуцирует гиперчувствительность к термической или механической стимуляции хвоста. Термическая гипералгезия была оценена путем регистрации запаздывания отдергивания хвоста от термического стимула (теплая вода, 46°C), в то время как механическую гипералгезию оценивали по порогу отдергивания хвоста от постоянно возрастающего давления, производимого анальгезиметром (прибор Randall Selitto). Изотипный контроль IgG1 (mAb005, очищенный из крысиного моноклонального IgG1, клон 43414, лот CAN04904A, приобретенный у R&D Systems) и mAb406 были введены интраперитонеально через 6 часов после лечения ПАФ.

Свидетельство, предполагающее, что воспалительный ответ начат в достаточной степени, включает повышенные уровни цитокинов, выработку оксида азота и гиперчувствительность к умеренно токсичным стимулам. В начальном исследовании оценивали разовую дозу (20 мг/кг) mAb406. Данная доза продуцировала Е-макс, составляющее 50% в анализе тепловой гипералгезии как через 24, так и через 48 часов (см. Фигуру 11) и 40% обратимость механической гипералгезии через 24 и через 48 часов (см. Фигуру 12). In vitro профайлинг уровней IL-6 в плазме организма у данных животных указывал на то, что все IL-6 были нейтрализованы. Соответственно, различные дозы mAb406 (и высокая доза IgG1 контроля) были оценены для характеристики

эффективности и нейтрализации IL-6 в отношении ингибирования боли и обратимости гипералгезии. С использованием аналогичных экспериментальных парадигмальных доз в диапазоне от 1 до 20 мг/кг, интраперитонеально были исследованы как тепловая, так и механическая гипералгезия через 24 часа и 48 часов. Фигура 13 демонстрирует, что гипералгезия была обратимой в зависимости от дозы при помощи лечения анти-IL6 через 24 часа и аналогичные результаты были получены через 48 часов (см. Фигуру 14). Е-макс. в данном втором исследовании было обратимым на 64%, что немногим выше, но аналогично обратимым результатам, полученным выше. Фигуры 15 и Фигура 16 демонстрируют результаты для механической гипералгезии через 24 часа и 48 часов, соответственно. Снова зависимые от дозы обратимые результаты наблюдали при достижении Е-макс 91% через 48 часов, что превышает обратимые результаты, полученные в первом исследовании. При любой из тестовых доз и ни в одном исследовании не наблюдали побочных эффектов. В общем, эффективности *in vivo* с mAb406 были сравнимы или превышали реперную малую молекулу - соединение напроксен в той же модели (см. Фигуру 17 для напроксена при гиперчувствительности к нагреванию и Фигуру 18 для напроксена при гиперчувствительности механическому сжатию).

[0466] Все публикации, патенты и патентные заявки, приведенные в данном описании, включены путем ссылки в данное описание в той же мере, как если бы каждая из них была конкретно и отдельно указана как отдельная публикация, патент или патентная заявка, для включения в данную заявку путем ссылки.

Материалы и способы

Ингибирование IL-6 вызванной пролиферации TF-1 клетки очищенным scFv и IgG

[0467] TF-1 клетки были подарены R&D Systems и их хранили в соответствии с предоставленным протоколом. Аналитические среды включали RPMI-1640 с GLUTAMAXI (Invitrogen), содержащий 5% бычьей эмбриональной сыворотки (JRH) и 1% пирувата натрия (Sigma). Перед каждым анализом, TF-1 клетки осаждали посредством центрифугирования при 300g в течение 5 минут, среды удаляли путем отсасывания и клетки повторно суспендировали в аналитических средах. Этот процесс повторяли дважды с клетками, повторно суспендированными при конечной концентрации 5×10^5 клетки/мл в аналитической среде. Клетки высаживали на планшету при 100 мкл/лунка в аналитической планшете на 96 лунок. Планшеты инкубировали в течение 24 часов при 37°C и 5% CO₂ для истощения клетки ГМКСФ. Тестовые растворы очищенных scFv или IgG (двойные) разбавляли до желательной концентрации в аналитических средах. Нерелевантное антитело, не направленное на IL-6, использовали в качестве негативного контроля. Рекомбинантное бактериальное человеческое (R&D) и яванских макак (местных) IL-6 добавляли до конечной концентрация 20 пМ (человеческое IL-6) или 100 пМ (яванские макаки) при смешивании с соответствующим тестовым антителом в общем объеме 100 мкл/лунка. Концентрацию IL-6, которую использовали в анализе, выбирали как дозу, которая при конечной аналитической концентрации, давала приблизительно 80% максимального пролиферативного ответа. Все пробы инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре. 100 мкл IL-6 и смеси антител затем добавляли в 100 мкл клеток с получением общего аналитического объема 200 мкл/лунка. Планшеты инкубировали в течение 24 часов при 37°C и 5% CO₂. 20 мкл оттитрованного тимидина (5 мк Ci/мл) затем добавляли в каждый момент анализа и планшеты возвращали в инкубатор на еще дополнительно 24 часов. Клетки собирали на стекловолоконных фильтровальных пластинах (Perkin Elmer) при помощи харвестера

клеток. Введение тимидина определяли при помощи Packard TopCount микропланшетного жидкостного сцинтилляционного счетчика. Затем данные анализировали при помощи программного оборудования Graphpad Prism.

Ингибирование высвобождение эндогенного вызванного IL-6 фактора роста эндотелия сосудов из человеческих синовиальных фибробластов при помощи очищенного IgG

[0468] Пробы коленей с ревматоидным артритом от хирургии общей замены суставов получали в антибиотиках, содержащих среду Игла, модифицированную по Дульбекко. Синовиальную оболочку, находящуюся в средах, рассекали от сустава и тонко измельчали. Синовиальную ткань промывали средами с добавлением 10% ФСК. Клеточную суспензию инкубировали в растворе коллагеназы в течение 2 часов в CO₂ инкубаторе при 37°C. Дигестированную суспензию синовиальных клеток разрушали путем повторного отсасывания через 10 мл пипеткой, клетки процеживали и центрифугировали при 400 g при комнатной температуре в течение 5 минут. Клетки повторно суспендировали в среде Игла, модифицированной по Дульбекко, содержащей 10% ФСК, пропускали через клеточное сито, доводили до 1×10⁶ клеток на мл и инкубировали в CO₂ инкубаторе при 37°C в 225-см² колбах с клеточной культурой (3001, CoStar Corning Inc.). После прилипания, большую часть среды убирали, заменяли свежей и возвращали в инкубатор для длительной инкубации. Клетки исследовали еженедельно и пропускали при конфлюэнтности путем трипсинизации при скорости пропускания 1 в 3.

[0469] Фибробласты (P3-5) при конфлюэнтности удаляли из колб путем инкубирования с 10 мл 0,1% раствора трипсин-ЭДТК (25300-054, Gibco ФИЛе Sciences) на колбу в течение 5-10 минут при 37°C. равный объем культуральной среды на основе среды Игла, модифицированной по Дульбекко, с добавлением 10% ФСК, добавляли в клетки, которые затем осаждали центрифугированием при 330 g в течение 5 минут при комнатной температуре. После одной стадии промывания культуральной средой на основе среды Игла, модифицированной по Дульбекко, с добавлением 10% ФСК, добавляли клеточную суспензию кластера клеточных культур (1×10⁵ клеток на мл) (150 мкл на лунку) в лунки стерильных плоскодонных полистирольных планшет на 96 лунок (3598, Corning CoStar) при 1,5×10⁴ клетки на лунку. Дополнительное добавление культуральной среды на основе среды Игла, модифицированной по Дульбекко, с добавлением 10% ФСК, добавляли в каждую лунку (100 мкл на лунку) с получением общего объема 250 мкл на лунку. Клетки инкубировали при 37°C в течение ночи для того, чтобы позволить прилипание и латентность.

[0470] Планшеты на 96 лунок исследовали для того, чтобы удостовериться, что клетки были конфлюэнтны и в хорошем состоянии (например, не содержали загрязнений). Среду затем отсасывали из лунок и немедленно добавляли 100 мкл культуральной среды на основе среды Игла, модифицированной по Дульбекко, с добавлением 10% ФСК. Для этого, 50 мкл культуральной среды на основе среды Игла, модифицированной по Дульбекко. С добавлением 10% ФСК, содержащей пробу IgG или только среду, добавляли в лунки (разведенную 1 в 5 в анализе).

[0471] За этим следовало добавление 50 мкл на лунку культуральной среды на основе среды Игла, модифицированной по Дульбекко, с добавлением 10% ФСК, содержащей рекомбинантное человеческое растворимое (rhs)IL-6Rα (500 нг на мл; 12 нМ) и rhIL-1β (50 пг на мл; 2,95 пМ, разбавленное 1 в 5 в анализе).

[0472] В отдельных лунках, 50 мкл среды Иггла, модифицированной по Дульбекко, с добавлением 10% фетальной сыворотки коров, содержащей; rh-IL-6 (0,100 нг на мл; 21,5 нМ), sIL-6R α (500 ег на мл; 12 нМ), rhIL-1 β (50 пг на мл; 2,95 пМ), или добавляли только среду (разбавленную 1 к 5 в анализе). Конечный объем в каждой лунке составлял

250 мкл.
[0473] Планшеты инкубировали в течение 48 часов при 37°C. Инкубирования производили в двойных или тройных лунках, как описано в формате планшет. Планшеты центрифугировали при 330 g в течение 5 минут при комнатной температуре и супернатантные среды удаляли и хранили при -40°C в микротитрованных плоскодонных планшетах (611F96, Sterilin).

[0474] Фактор роста эндотелия сосудов измеряли при помощи ELISA (DY293B, R&D Systems) следуя инструкциям производителя. Кратко, планшеты ELISA покрывали мышинным античеловеческим антителом фактора роста эндотелия сосудов в течение ночи при 4°C и блокировали 1% альбумином бычьей сыворотки/фосфатно-буферным раствором. Планшеты промывали 0,05% Tween 20/ фосфатно-буферным раствором и инкубировали культуральными супернатантными человеческих синовиальных фибробластов и биотинилированным козлиным антителом анти-человеческого фактора роста эндотелия сосудов в течение ночи при комнатной температуре. После промывания, фактор роста эндотелия сосудов детектировали при помощи стрептавидиновой пероксидазы хрена. Планшеты развивали при помощи 1:1 H₂O₂ : тетраметилбензидина. Реакцию останавливали 2 М H₂SO₄ и оптическую плотность определяли при 450 нм с коррекционной длиной волны, установленной при 540 нм.

Измерение общих уровней IL-6 в плазме

[0475] Общее содержание IL-6 измеряли с использованием набора Milliplex™ MAP (MPXHCYT060K) в соответствии с рекомендациями производителя. Все необходимые реактивы обеспечены в наборе для анализа. Кратко, фильтровальную аналитическую планшету увлажняли 200 мкл аналитического буфера и жидкость удаляли под вакуумом. Каждый из следующих реактивов добавляли в планшету при 25 мкл/лунку: (a) аналитический буфер (b) пробы плазмы, стандарты или КК и (c) подложки, конъюгированные с анти-IL-6 иммобилизованным антителом в аналитическом матриксе. Конечный аналитический объем составлял 75 мкл и конечный аналитический матрикс составлял 133,3 мкг/мл лекарственного средства - кандидата (Антитело 18 или Антитело 18E) в 25% IL-6 обедненной нормальной ЭДТК плазме яванских макак. Планшету герметично закрывали и инкубировали всю ночь при 4°C. Через 2 промывания промывным буфером, добавляли 25 мкл/лунку биотинилированного анти-IL6 детекторного антитела. Через 30 минут инкубирования, добавляли 25 мкл/лунку SA-PE в лунки и планшету инкубировали в течение дополнительных 30 минут. Планшету дважды промывали и подложки повторно суспендировали 150 мкл/лунку проточной жидкостью Luminex. Интенсивность флуоресценции, связанную с подложками, измеряли при помощи планшетного ридера Luminex200. Поскольку как улавливание, так и детекция анти-IL-6 антитела способны связывать IL-6 в присутствии Антитела 18 или Антитела 18E, интенсивность флуоресценции пропорциональна общей концентрации IL-6 в пробе. Концентрацию IL-6 экстраполировали из стандартной кривой, нанесенной при помощи программного обеспечения Bead View (Upstate Cell Signaling Solutions). Диапазон детекции для IL-6 составлял от 1,8 пг/мл до 5769 пг/мл в 100% плазме яванских макак.

[0476] Все ссылки, процитированные по всей данной заявке, включая процитированные в любом месте выше, включены путем ссылки полностью и для всех

целей.

Последовательности

5 SEQ ID NO: 1; Ab 18 VH CDR1

10 SNYMI

15 SEQ ID NO: 2; Ab 18 VH CDR2

20 DLYYYAGDTYYADSVKG

25 SEQ ID NO: 3; Ab 18 VH CDR3

30 WADDHPPWIDL

SEQ ID NO: 4; Ab 18 VL CDR1
RASQGISSWLA

5 SEQ ID NO: 5 Ab 18 VL CDR2
KASTLES

10 SEQ ID NO: 6 Ab 18 VL CDR3.
QQSWLGGS

SEQ ID NO: 7 Ab 18 VH
15 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISSNYMIWVRQAPGKGLEWVSDLYYYAG
DTYYADSVKGRFTMSRDISKNTVYLMNSLRAЭДTKVYYCARWADDHPPWIDLWG
RGTLVTVSS

20 SEQ ID NO:8 Ab 18 VL
DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKVLIIYKASTLESGV
PSRFGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQSWLGGSFGQGGTKLEIK

25 SEQ ID NO: 9 Ab 18E HC
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISSNYMIWVRQAPGKGLEWVSDLYYYAG
DTYYADSVKGRFTMSRDISKNTVYLMNSLRAЭДTKVYYCARWADDHPPWIDLWG
30 RGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYPCPSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSLQDKT
HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
35 KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKCPCCLSPGK

40 SEQ ID NO:10 Ab 18E LC
DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKVLIIYKASTLESGV
PSRFGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQSWLGGSFGQGGTKLEIKRTVAAPSVFIFP
PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDHKLQSGNSQESVTEQDSKDSTYCP
45 CSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:11 Ab 18 оптимизированный VH

GAGGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCTCCCTGC
GGCTGTCCTGCGCCGCCTCCGGCTTCACCATCTCCTCCAACATGATTTGGGTC
CGCCAGGCACCTGGCAAGGGGCTCGAGTGGGTGTCCGACCTGTACTACTACGCCG
GCGACACCTACTACGCTGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATGTCCAGGGACAT
CTCCAAGAACACCGTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAGGACACCGCC
GTGTACTACTGCGCCAGATGGGCGGACGACCACCCTCCTTGGATCGACCTGTGGG
GCAGGGGCACCCTGGTCACCGTCAGCTCC

SEQ ID NO:12 Ab 18 оптимизированный VL

GACATCCAGATGACCCAGTCCCCCTCCACCCTGTCCGCCAGCGTCGGCGACAGAG
TGACCATCACCTGCCGGGCCTCCCAGGGCATCTCCAGCTGGCTGGCCTGGTATCA
GCAGAAGCCTGGCAAGGCCCTAAGGTGCTGATCTACAAGGCCAGCACCCCTGGA
GTCCGGCGTGCCTTCCCGGTTCTCCGGCTCCGGCAGCGGCACCGAGTTCACCCTG
ACCATCTCCTCCCTGCAGCCTGACGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTCCTG
GCTGGGCGGCTCCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAG

SEQ ID NO:13 Ab 18E оптимизированный HC

GAGGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCTCCCTGC
GGCTGTCCTGCGCCGCCTCCGGCTTCACCATCTCCTCCAACATGATTTGGGTC
CGCCAGGCACCTGGCAAGGGGCTCGAGTGGGTGTCCGACCTGTACTACTACGCCG
GCGACACCTACTACGCTGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATGTCCAGGGACAT
CTCCAAGAACACCGTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAGGACACCGCC
GTGTACTACTGCGCCAGATGGGCGGACGACCACCCTCCTTGGATCGACCTGTGGG
GCAGGGGCACCCTGGTCACCGTCAGCTCCGCCTCCACCAAGGGCCCCAGCGTGTT
CCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCTCCGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGC
CTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACCGTGTCTGGAACAGCGGCGCTC
TGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAG
CCTGAGCAGCGTGGTGACAGTGCCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACAT
CTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGAGGCC
CAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGCCCCCCTGCCCTGCCCTGAGCTGCTG
GGCGGACCTAGCGTGTTCTGTTCCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGTACATCA
CCAGGGAGCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAGGACCCTG

AGGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCA
AGCCCAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCG
TGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGCAAGGTCTCCAACA
AGGCCCTGCCTGCCCCCATCGAAAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTC
GGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCCGGGAGGAGATGACCAAGAACC
AGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGA
GTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCTGTGCT
GGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAG
GTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAA
CCTACTACCCAGAAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCCGGCAAG

SEQ ID NO:14 Ab 18E оптимизированный LC

GACATCCAGATGACCCAGTCCCCCTCCACCCTGTCCGCCAGCGTCGGCGACAGAG
TGACCATCACCTGCCGGGCCTCCCAGGGCATCTCCAGCTGGCTGGCCTGGTATCA
GCAGAAAGCCTGGCAAGGCCCTAAGGTGCTGATCTACAAGGCCAGCACCTGGA
GTCCGGCGTGCTTCCCGGTTCTCCGGCTCCGGCAGCGGCACCGAGTTCACCCTG
ACCATCTCCTCCCTGCAGCCTGACGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTCCTG
GCTGGGCGGCTCCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGCGTACGGTGGC
CGTCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACC
GCCTCCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCCGCGAGGCCAAGGTGCAGT
GGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGC
AGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGCAAGG
CCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGT
CCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGTGC

SEQ ID NO: 15 человеческое IL-6

MNSFSTSAFGPVAFSGLLLVLPAAFPAPVPPGEDSKDVAAPHRQPLTSSERIDKQIRYILD
GISALRKETCNKSHMCESSKEALAENNLNLPKMAEKDGCQSGFNEETCLVKIITGLLEFEV
YLEYLQNRFESEEQARAVQMSTKVLIQFLQKKAKNLDAITTPDPTTNASLLTKLQAQNQWL
QDMTTHLILRSFKEFLQSSLRALRQM

SEQ ID NO:16 зрелое человеческое IL-6

VPPGEDSKDVAAPHRQPLTSSERIDKQIRYILDGISALRKETCNKSHMCESSKEALAENNLN
LPKMAEKDGCFAQSGFNEETCLVKIITGLLEFEVYLEYLQNRFESSEEQARAVQMSTKVLIQF
LQKKAKNLDAITTPDPTTNASLLTKLQAQNQWLQDMTTHLILRSFKEFLQSSLRALRQM

SEQ ID NO:17 sIL-6Ra

MLAVGCALLAALLAAPGAALAPRRCPAQEVARGVLTSLPGDSVTLTCPGVEPEDHKTVHWVL
RKPAAGSHPSRWAGMGRLLLLRSVQLHDSGNYSYRAGRPAAGTVHLLVDVPPEEPQLSCFRK
SPLSNVVCEWGRSTPSLTTKAVLLVRKFQNSPAEDFQEPQYSQESQKFSCQLAVNПГDSS
FYIVSMCVASSVGSKFSTQTFQCGILQPDPPANITVTAVARNPRWLSVTWQDPHSWNSSF
YRLRFELRYRAERSKTFTTWMVKDLQHHCVIHDAWSGLRHVVQLRAQEEFGQGEWSEWSPEA
MGTPWTESRSPPAENEVSTПMQALTТNKDDDNILFRDSANATSLPVQD

SEQ ID NO:18 трансмембранный домен IL-6Ra

MLAVGCALLAALLAAPGAALAPRRCPAQEVARGVLTSLPGDSVTLTCPGVEPEDHKTVHWVL
RKPAAGSHPSRWAGMGRLLLLRSVQLHDSGNYSYRAGRPAAGTVHLLVDVPPEEPQLSCFRK
SPLSNVVCEWGRSTPSLTTKAVLLVRKFQNSPAEDFQEPQYSQESQKFSCQLAVNПГDSS
FYIVSMCVASSVGSKFSTQTFQCGILQPDPPANITVTAVARNPRWLSVTWQDPHSWNSSF
YRLRFELRYRAERSKTFTTWMVKDLQHHCVIHDAWSGLRHVVQLRAQEEFGQGEWSEWSPEA
MGTPWTESRSPPAENEVSTПMQALTТNKDDDNILFRDSANATSLPVQDSSSVPLPTFLVAGG
SLAFGTLLCIAIVLRFKKTWKLRLALKEGKTSMHPPYSLGQLVPERPRPTPVLVPLISPPVSP
SSLGSDNTSSHNRPDARDPRSPYDISNTDYFFPR

SEQ ID NO:19 Gp130

MLTLQTWLVQALFIFLTTESTGELLDPGCIISPESPVVQLHSNFTAVCVLKEKCMDYFHVNA
NYIVWKTNHFTIPKEQYTIINRTASSVTFTDIASLNIQLTCNILTFGQLEQNVYGITIIISGL
PPEKPKNLSCIVNEGKKMRCEWDGGRETHLETNFTLKSEWATHKFADCKAKRDTPTSTCTVDY
STVYFVNIEVWVEAENALGKVTSDFHINFDVYKVKPNPPHNLSVINSEELSSILKLTWTNPS
IKSVIILKYNIQYRTKDASTWSQIPPЭДТKSTRSSFTVQDLKPFTEYVFRIRCMKEDGKGYW
SDWSEEASGITYEDRPSKAPSFYKIDPSHTQGYRTVQLVWKTLPPEANGKILDYEVTLTR
WKSHLQNYTVNATKLTVNLTNDRYLATLTVRNLVGKSDAAVLTIPACДFQATHPVMDLKAFP
KDHMLWVEWTTPRESVKKYILEWCVLSDKAPCITDWQQEDGTVHRTYLRGNLAESKCYLITV
TPVYADGPGSPESIKAYLKQAPPSKGPTVRTKKVGKNEAVLEWDQLPVDVQNGFIRNYTIFY
RTIIGNETAENVVDSSHTYTLSSLTSDTLYMVRMAAYTDEGGKDGPEFTFTTPKFAQGEIEA
IVVPVCLAFLLTTLLGVLF CFNKRDLIKKHIWPNVPDPSKSHIAQWSPHTPPRHNFNNSKDQM

YSDGNFTDVSVEIEANDKKPFPEDLKSLDLFKKEKINTEGHSSGIGGXЦHMSSSRPSISSS
DENESSQNTSSTVQYSTVVHSGYRHQVPSVQVFSRSESTQPLLDSEERPEDLQLVDHVDGGD
GILPRQQYFKQNCSEQHESSPDISHFERSKQVSSVNEEDFVRLKQQISDHISQSCGSGQMCMF
5 QEVSAADAFGPGTEGQVERFETVGMEAATDEGMPKSYLPQTVRQGGYMPQ

(57) Формула изобретения

1. Выделенное антитело, которое специфично связывается с IL-6, где это антитело включает аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10.

10 2. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10.

3. Нуклеиновая кислота по п. 2, содержащая нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 14.

15 4. Вектор для экспрессии антитела по п. 1, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 3.

5. Выделенная клетка для получения антитела по п. 1, содержащая вектор по п. 4.

6. Выделенная клеточная линия яичников китайского хомячка (CHO) для получения антитела по п. 1, экспрессирующая антитело по п. 1, включающая нуклеиновую кислоту, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10.

20 7. Фармацевтическая композиция для лечения или профилактики расстройства, ассоциированного с IL-6, содержащая антитело по п. 1 в фармацевтически приемлемом носителе.

8. Способ лечения или профилактики боли у человека, включающий введение человеку, который нуждается в этом, терапевтически эффективного количества анти-IL-6 антитела, причем анти-IL-6 антитело включает аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10.

9. Способ по п. 8, отличающийся тем, что боль связана с или является результатом воспалительного и/или аутоиммунного расстройства.

30 10. Способ по п. 9, отличающийся тем, что воспалительное и/или аутоиммунное расстройство выбирают из группы, состоящей из ревматоидного артрита, остеоартрита, кахексии, хронического обструктивного легочного заболевания (ХОБЛ), ювенильного идиопатического артрита, астмы, системной красной волчанки, воспалительного заболевания кишечника, болезни Хрона, язвенного колита и атеросклероза.

35 11. Способ по п. 9, отличающийся тем, что воспалительное и/или аутоиммунное расстройство является системной красной волчанкой, остеоартритом или ревматоидным артритом.

12. Способ по п. 9, отличающийся тем, что боль связана с или является результатом состояния, вызванного повышенными уровнями IL-6.

40 13. Способ по п. 9, отличающийся тем, что боль связана с или является результатом анкилозирующего спондилита, воспалительного люмбаго, нейропатии, подагры, неврономы, фибромиалгии, острой и/или хронической головной боли, мигреней, панкреатита, сдавливания спинномозгового нерва, незлокачественной скелетной боли или рака.

45 14. Способ по п. 9, отличающийся тем, что боль связана с или является результатом ран, медицинской процедуры, хирургического вмешательства, поражения или травмы.

15. Способ по п. 9, отличающийся тем, что антитело вводят человеку профилактически до получения ранения, до проведения медицинской процедуры, хирургического вмешательства, до поражения или травмы.

16. Способ по п. 9, отличающийся тем, что нейтрализуют как минимум 90% свободного IL-6 в сыворотке.

17. Способ по п. 9, отличающийся тем, что в ткани-мишени ингибируют как минимум 90% IL-6 опосредованной сигнализации в пораженной ткани.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

217

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> МЕДИМУН, ЛЛК
 <120> ЧЕЛОВЕЧЕСКИЕ АНТИ-IL-6 АНТИТЕЛА С ПРОЛОНГИРОВАННЫМ ПЕРИОДОМ
 ВЫВЕДЕНИЯ IN VIVO И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ,
 АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ И ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ
 <130> IS310PCT
 <140> PCT/US10/22478
 <141> 2010-01-29
 <150> US 61/148,106
 <151> 2009-01-29
 <150> US 61/184,182
 <151> 2009-06-04
 <160> 19
 <170> Патентная версия 3.5
 <210> 1
 <211> 5
 <212> белок
 <213> искусственная последовательность
 <220>
 <223> Ab 18 VH CDR1
 <400> 1
 Ser Asn Tyr Met Ile
 1 5
 <210> 2
 <211> 17
 <212> белок
 <213> искусственный
 <220>
 <223> Ab 18 VH CDR2
 <400> 2
 Asp Leu Tyr Tyr Tyr Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 3
 <211> 11
 <212> белок
 <213> искусственный
 <220>
 <223> Ab 18 VH CDR3
 <400> 3
 Trp Ala Asp Asp His Pro Pro Trp Ile Asp Leu
 1 5 10

218

<210> 4
 <211> 11
 <212> белок
 <213> искусственный

<220>
 <223> Ab 18 VL CDR1

<400> 4

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
 1 5 10

<210> 5
 <211> 7
 <212> белок
 <213> искусственный

<220>
 <223> Ab 18 VL CDR2

<400> 5

Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser
 1 5

<210> 6
 <211> 8
 <212> белок
 <213> искусственный

<220>
 <223> Ab 18 VL CDR3

<400> 6

Gln Gln Ser Trp Leu Gly Gly Ser
 1 5

<210> 7
 <211> 120
 <212> белок
 <213> искусственный
 <220>
 <223> Ab 18 VH

<400> 7

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

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

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

Ser Asp Leu Tyr Tyr Tyr Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

219

Lys Gly Arg Phe Thr Met Ser Arg Asp Ile Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Trp Ala Asp Asp His Pro Pro Trp Ile Asp Leu Trp Gly Arg
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 8
<211> 106
<212> белок
<213> искусственный

<220>
<223> Ab 18 VL

<400> 8

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

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

<210> 9
<211> 450
<212> белок
<213> искусственный

<220>
<223> Ab 18E HC

<400> 9

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

220

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser Ser Asn
 20 25 30
 Tyr Met Ile Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Asp Leu Tyr Tyr Tyr Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Met Ser Arg Asp Ile Ser Lys Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Trp Ala Asp Asp His Pro Pro Trp Ile Asp Leu Trp Gly Arg
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile
 245 250 255
 Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285

221

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 10
<211> 213
<212> белок
<213> искусственный

<220>
<223> Ab 18E LC

<400> 10

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30

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

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

222

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 11
<211> 360
<212> ДНК
<213> искусственный

<220>
<223> Ab 18 оптимизированный VH

<400> 11
gaggtgcagc tggtcgagtc tggcggcgga ctggtgcagc ctggcggctc cctgcggctg 60
tcctgcgccg cctccggctt caccatctcc tccaactaca tgatttgggt ccgccaggca 120
cctggcaagg ggctcgagtg ggtgtccgac ctgtactact acgccggcga cacctactac 180
gctgactccg tgaagggccg gttcaccatg tccagggaca tctccaagaa caccgtgtac 240
ctgcagatga actccctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc cagatgggcc 300
gacgaccacc ctccttgat cgacctgtgg ggcaggggca ccctgggtcac cgtcagctcc 360

<210> 12
<211> 318
<212> ДНК
<213> искусственный

223

<220>

<223> Аб 18 оптимизированный VL

<400> 12

gacatccaga tgacccagtc cccctccacc ctgtccgcca gcgtcggcga cagagtgacc	60
atcacctgcc gggcctccca gggcatctcc agctggctgg cctggatca gcagaagcct	120
ggcaaggccc ctaagtgct gatctacaag gccagcacc tggagtccg cgtgccttc	180
cggttctccg gctccggcag cggcaccgag ttacacctga ccatctctc cctgcagcct	240
gacgacttcg ccacctacta ctgccagcag tcctggctgg gcggctcctt cggccagggc	300
accaagctgg agatcaag	318

<210> 13

<211> 1350

<212> ДНК

<213> искусственный

<220>

<223> Аб 18Е оптимизированный HC

<400> 13

gaggtgcagc tggtcgagtc tggcggcgga ctggtgcagc ctggcggctc cctgcggctg	60
tcctgcgccc cctccggctt caccatctcc tccaactaca tgatttgggt ccgccaggca	120
cctggcaagg ggtcgcagtg ggtgtccgac ctgtactact acgccggcga cacctactac	180
gctgactccg tgaaggccg gttcaccatg tccagggaca tctccaagaa caccgtgtac	240
ctgcagatga actccctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgccc cagatgggcc	300
gacgaccacc ctccctggat cgacctgtgg ggcaggggca ccctgggtcac cgtcagctcc	360
gcctccacca agggccccag cgtgttcccc ctggccccc gcagcaagag cacctccggc	420
ggcacagccg ccctgggctg cctggtgaag gactacttcc ccgaaccggt gaccgtgtcc	480
tggaacagcg gcgctctgac cagcggcggt cacaccttcc ccgccgtgct gcagagcagc	540
ggcctgtaca gcctgagcag cgtggtgaca gtgcccagca gcagcctggg caccagacc	600
tacatctgca acgtgaacca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agtggagccc	660
aagagctgcg acaagacca cacctgcccc ccctgccctg cccctgagct gctgggcgga	720
cctagcgtgt tcctgttccc cccaagccc aaggacccc tgtacatcac caggagagccc	780
gaggtgacct gcgtggtggt ggacgtgagc cagcaggacc ctgaggtgaa gttcaattgg	840
tacgtggacg gcgtggaggt gcacaacgcc aagaccaagc ccagagagga gcagtacaac	900
agcacctaca ggggtgtgtc cgtgctgacc gtgctgcacc aggactggct gaacggcaag	960
gaatacaagt gcaaggtctc caacaaggcc ctgcctgccc ccatcgaaaa gaccatcagc	1020
aaggccaagg gccagcctcg ggagccccag gtgtacaccc tgcccctag ccgggaggag	1080
atgaccaaga accaggtgtc cctgacctgt ctggtgaagg gcttctaccc cagcgacatc	1140
gccgtggagt gggagagcaa cggccagccc gagaacaact acaagaccac cccccctgtg	1200
ctggacagcg acggcagctt ctccctgtac agcaagctga ccgtggacaa gtccaggtgg	1260

224

cagcagggca acgtgttcag ctgcagcgtg atgcacgagg ccctgcacaa ccactacacc 1320
 cagaagagcc tgagcctgtc ccccggcaag 1350

<210> 14
 <211> 639
 <212> ДНК
 <213> искусственный

<220>
 <223> Аб 18Е оптимизированный LC

<400> 14
 gacatccaga tgacccagtc cccctccacc ctgtccgcc a gcgtcggcga cagagtgacc 60
 atcacctgcc gggcctccca gggcatctcc agctggctgg cctggtatca gcagaagcct 120
 ggcaaggccc ctaaggtgct gatctacaag gccagcacc tggagtccgg cgtgccttcc 180
 cggttctcgc gctccggcag cggcaccgag ttcaccctga ccatctctc cctgcagcct 240
 gacgacttcg ccactacta ctgccagcag tcctggctgg gcggctcctt cggccagggc 300
 accaagctgg agatcaagcg tacggtggcc gctcccagcg tgttcattct cccccccagc 360
 gacgagcagc tgaagagcgg caccgcctcc gtggtgtgcc tgctgaacaa cttctacccc 420
 cgcgaggcca aggtgcagtg gaaggtggac aacgcctgc agtccggcaa cagccaggag 480
 agcgtcaccg agcaggacag caaggactcc acctacagcc tgagcagcac cctgaccctg 540
 agcaaggccg actacagaaa gcacaagggtg tacgcctgcg aggtgaccca ccagggcctg 600
 tccagccccg tgaccaagag cttcaacagg ggcgagtgc 639

<210> 15
 <211> 212
 <212> белок
 <213> Homo sapiens

<400> 15

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

Gly Leu Leu Leu Val Leu Pro Ala Ala Phe Pro Ala Pro Val Pro Pro
 20 25 30

Gly Glu Asp Ser Lys Asp Val Ala Ala Pro His Arg Gln Pro Leu Thr
 35 40 45

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

Ser Ala Leu Arg Lys Glu Thr Cys Asn Lys Ser Asn Met Cys Glu Ser
 65 70 75 80

Ser Lys Glu Ala Leu Ala Glu Asn Asn Leu Asn Leu Pro Lys Met Ala
 85 90 95

225

Glu Lys Asp Gly Cys Phe Gln Ser Gly Phe Asn Glu Glu Thr Cys Leu
 100 105 110
 Val Lys Ile Ile Thr Gly Leu Leu Glu Phe Glu Val Tyr Leu Glu Tyr
 115 120 125
 Leu Gln Asn Arg Phe Glu Ser Ser Glu Glu Gln Ala Arg Ala Val Gln
 130 135 140
 Met Ser Thr Lys Val Leu Ile Gln Phe Leu Gln Lys Lys Ala Lys Asn
 145 150 155 160
 Leu Asp Ala Ile Thr Thr Pro Asp Pro Thr Thr Asn Ala Ser Leu Leu
 165 170 175
 Thr Lys Leu Gln Ala Gln Asn Gln Trp Leu Gln Asp Met Thr Thr His
 180 185 190
 Leu Ile Leu Arg Ser Phe Lys Glu Phe Leu Gln Ser Ser Leu Arg Ala
 195 200 205
 Leu Arg Gln Met
 210
 <210> 16
 <211> 183
 <212> белок
 <213> Homo sapiens
 <400> 16
 Val Pro Pro Gly Glu Asp Ser Lys Asp Val Ala Ala Pro His Arg Gln
 1 5 10 15
 Pro Leu Thr Ser Ser Glu Arg Ile Asp Lys Gln Ile Arg Tyr Ile Leu
 20 25 30
 Asp Gly Ile Ser Ala Leu Arg Lys Glu Thr Cys Asn Lys Ser Asn Met
 35 40 45
 Cys Glu Ser Ser Lys Glu Ala Leu Ala Glu Asn Asn Leu Asn Leu Pro
 50 55 60
 Lys Met Ala Glu Lys Asp Gly Cys Phe Gln Ser Gly Phe Asn Glu Glu
 65 70 75 80
 Thr Cys Leu Val Lys Ile Ile Thr Gly Leu Leu Glu Phe Glu Val Tyr
 85 90 95
 Leu Glu Tyr Leu Gln Asn Arg Phe Glu Ser Ser Glu Glu Gln Ala Arg
 100 105 110

226

Ala Val Gln Met Ser Thr Lys Val Leu Ile Gln Phe Leu Gln Lys Lys
 115 120 125

Ala Lys Asn Leu Asp Ala Ile Thr Thr Pro Asp Pro Thr Thr Asn Ala
 130 135 140

Ser Leu Leu Thr Lys Leu Gln Ala Gln Asn Gln Trp Leu Gln Asp Met
 145 150 155 160

Thr Thr His Leu Ile Leu Arg Ser Phe Lys Glu Phe Leu Gln Ser Ser
 165 170 175

Leu Arg Ala Leu Arg Gln Met
 180

<210> 17
 <211> 358
 <212> белок
 <213> Homo sapiens

<400> 17

Met Leu Ala Val Gly Cys Ala Leu Leu Ala Ala Leu Leu Ala Ala Pro
 1 5 10 15

Gly Ala Ala Leu Ala Pro Arg Arg Cys Pro Ala Gln Glu Val Ala Arg
 20 25 30

Gly Val Leu Thr Ser Leu Pro Gly Asp Ser Val Thr Leu Thr Cys Pro
 35 40 45

Gly Val Glu Pro Glu Asp Asn Ala Thr Val His Trp Val Leu Arg Lys
 50 55 60

Pro Ala Ala Gly Ser His Pro Ser Arg Trp Ala Gly Met Gly Arg Arg
 65 70 75 80

Leu Leu Leu Arg Ser Val Gln Leu His Asp Ser Gly Asn Tyr Ser Cys
 85 90 95

Tyr Arg Ala Gly Arg Pro Ala Gly Thr Val His Leu Leu Val Asp Val
 100 105 110

Pro Pro Glu Glu Pro Gln Leu Ser Cys Phe Arg Lys Ser Pro Leu Ser
 115 120 125

Asn Val Val Cys Glu Trp Gly Pro Arg Ser Thr Pro Ser Leu Thr Thr
 130 135 140

Lys Ala Val Leu Leu Val Arg Lys Phe Gln Asn Ser Pro Ala Glu Asp
 145 150 155 160

Phe Gln Glu Pro Cys Gln Tyr Ser Gln Glu Ser Gln Lys Phe Ser Cys

227.

165 170 175
 Gln Leu Ala Val Pro Glu Gly Asp Ser Ser Phe Tyr Ile Val Ser Met
 180 185 190
 Cys Val Ala Ser Ser Val Gly Ser Lys Phe Ser Lys Thr Gln Thr Phe
 195 200 205
 Gln Gly Cys Gly Ile Leu Gln Pro Asp Pro Pro Ala Asn Ile Thr Val
 210 215 220
 Thr Ala Val Ala Arg Asn Pro Arg Trp Leu Ser Val Thr Trp Gln Asp
 225 230 235 240
 Pro His Ser Trp Asn Ser Ser Phe Tyr Arg Leu Arg Phe Glu Leu Arg
 245 250 255
 Tyr Arg Ala Glu Arg Ser Lys Thr Phe Thr Thr Trp Met Val Lys Asp
 260 265 270
 Leu Gln His His Cys Val Ile His Asp Ala Trp Ser Gly Leu Arg His
 275 280 285
 Val Val Gln Leu Arg Ala Gln Glu Glu Phe Gly Gln Gly Glu Trp Ser
 290 295 300
 Glu Trp Ser Pro Glu Ala Met Gly Thr Pro Trp Thr Glu Ser Arg Ser
 305 310 315 320
 Pro Pro Ala Glu Asn Glu Val Ser Thr Pro Met Gln Ala Leu Thr Thr
 325 330 335
 Asn Lys Asp Asp Asp Asn Ile Leu Phe Arg Asp Ser Ala Asn Ala Thr
 340 345 350
 Ser Leu Pro Val Gln Asp
 355
 <210> 18
 <211> 468
 <212> белок
 <213> Homo sapiens
 <400> 18
 Met Leu Ala Val Gly Cys Ala Leu Leu Ala Ala Leu Leu Ala Ala Pro
 1 5 10 15
 Gly Ala Ala Leu Ala Pro Arg Arg Cys Pro Ala Gln Glu Val Ala Arg
 20 25 30
 Gly Val Leu Thr Ser Leu Pro Gly Asp Ser Val Thr Leu Thr Cys Pro
 35 40 45

229

Pro Pro Ala Glu Asn Glu Val Ser Thr Pro Met Gln Ala Leu Thr Thr
 325 330 335
 Asn Lys Asp Asp Asp Asn Ile Leu Phe Arg Asp Ser Ala Asn Ala Thr
 340 345 350
 Ser Leu Pro Val Gln Asp Ser Ser Ser Val Pro Leu Pro Thr Phe Leu
 355 360 365
 Val Ala Gly Gly Ser Leu Ala Phe Gly Thr Leu Leu Cys Ile Ala Ile
 370 375 380
 Val Leu Arg Phe Lys Lys Thr Trp Lys Leu Arg Ala Leu Lys Glu Gly
 385 390 395 400
 Lys Thr Ser Met His Pro Pro Tyr Ser Leu Gly Gln Leu Val Pro Glu
 405 410 415
 Arg Pro Arg Pro Thr Pro Val Leu Val Pro Leu Ile Ser Pro Pro Val
 420 425 430
 Ser Pro Ser Ser Leu Gly Ser Asp Asn Thr Ser Ser His Asn Arg Pro
 435 440 445
 Asp Ala Arg Asp Pro Arg Ser Pro Tyr Asp Ile Ser Asn Thr Asp Tyr
 450 455 460
 Phe Phe Pro Arg
 465
 <210> 19
 <211> 918
 <212> белок
 <213> Homo sapiens
 <400> 19
 Met Leu Thr Leu Gln Thr Trp Leu Val Gln Ala Leu Phe Ile Phe Leu
 1 5 10 15
 Thr Thr Glu Ser Thr Gly Glu Leu Leu Asp Pro Cys Gly Tyr Ile Ser
 20 25 30
 Pro Glu Ser Pro Val Val Gln Leu His Ser Asn Phe Thr Ala Val Cys
 35 40 45
 Val Leu Lys Glu Lys Cys Met Asp Tyr Phe His Val Asn Ala Asn Tyr
 50 55 60
 Ile Val Trp Lys Thr Asn His Phe Thr Ile Pro Lys Glu Gln Tyr Thr
 65 70 75 80

228

Gly Val Glu Pro Glu Asp Asn Ala Thr Val His Trp Val Leu Arg Lys
 50 55 60
 Pro Ala Ala Gly Ser His Pro Ser Arg Trp Ala Gly Met Gly Arg Arg
 65 70 75 80
 Leu Leu Leu Arg Ser Val Gln Leu His Asp Ser Gly Asn Tyr Ser Cys
 85 90 95
 Tyr Arg Ala Gly Arg Pro Ala Gly Thr Val His Leu Leu Val Asp Val
 100 105 110
 Pro Pro Glu Glu Pro Gln Leu Ser Cys Phe Arg Lys Ser Pro Leu Ser
 115 120 125
 Asn Val Val Cys Glu Trp Gly Pro Arg Ser Thr Pro Ser Leu Thr Thr
 130 135 140
 Lys Ala Val Leu Leu Val Arg Lys Phe Gln Asn Ser Pro Ala Glu Asp
 145 150 155 160
 Phe Gln Glu Pro Cys Gln Tyr Ser Gln Glu Ser Gln Lys Phe Ser Cys
 165 170 175
 Gln Leu Ala Val Pro Glu Gly Asp Ser Ser Phe Tyr Ile Val Ser Met
 180 185 190
 Cys Val Ala Ser Ser Val Gly Ser Lys Phe Ser Lys Thr Gln Thr Phe
 195 200 205
 Gln Gly Cys Gly Ile Leu Gln Pro Asp Pro Pro Ala Asn Ile Thr Val
 210 215 220
 Thr Ala Val Ala Arg Asn Pro Arg Trp Leu Ser Val Thr Trp Gln Asp
 225 230 235 240
 Pro His Ser Trp Asn Ser Ser Phe Tyr Arg Leu Arg Phe Glu Leu Arg
 245 250 255
 Tyr Arg Ala Glu Arg Ser Lys Thr Phe Thr Thr Trp Met Val Lys Asp
 260 265 270
 Leu Gln His His Cys Val Ile His Asp Ala Trp Ser Gly Leu Arg His
 275 280 285
 Val Val Gln Leu Arg Ala Gln Glu Glu Phe Gly Gln Gly Glu Trp Ser
 290 295 300
 Glu Trp Ser Pro Glu Ala Met Gly Thr Pro Trp Thr Glu Ser Arg Ser
 305 310 315 320

230

Ile Ile Asn Arg Thr Ala Ser Ser Val Thr Phe Thr Asp Ile Ala Ser
 85 90 95
 Leu Asn Ile Gln Leu Thr Cys Asn Ile Leu Thr Phe Gly Gln Leu Glu
 100 105 110
 Gln Asn Val Tyr Gly Ile Thr Ile Ile Ser Gly Leu Pro Pro Glu Lys
 115 120 125
 Pro Lys Asn Leu Ser Cys Ile Val Asn Glu Gly Lys Lys Met Arg Cys
 130 135 140
 Glu Trp Asp Gly Gly Arg Glu Thr His Leu Glu Thr Asn Phe Thr Leu
 145 150 155 160
 Lys Ser Glu Trp Ala Thr His Lys Phe Ala Asp Cys Lys Ala Lys Arg
 165 170 175
 Asp Thr Pro Thr Ser Cys Thr Val Asp Tyr Ser Thr Val Tyr Phe Val
 180 185 190
 Asn Ile Glu Val Trp Val Glu Ala Glu Asn Ala Leu Gly Lys Val Thr
 195 200 205
 Ser Asp His Ile Asn Phe Asp Pro Val Tyr Lys Val Lys Pro Asn Pro
 210 215 220
 Pro His Asn Leu Ser Val Ile Asn Ser Glu Glu Leu Ser Ser Ile Leu
 225 230 235 240
 Lys Leu Thr Trp Thr Asn Pro Ser Ile Lys Ser Val Ile Ile Leu Lys
 245 250 255
 Tyr Asn Ile Gln Tyr Arg Thr Lys Asp Ala Ser Thr Trp Ser Gln Ile
 260 265 270
 Pro Pro Glu Asp Thr Ala Ser Thr Arg Ser Ser Phe Thr Val Gln Asp
 275 280 285
 Leu Lys Pro Phe Thr Glu Tyr Val Phe Arg Ile Arg Cys Met Lys Glu
 290 295 300
 Asp Gly Lys Gly Tyr Trp Ser Asp Trp Ser Glu Glu Ala Ser Gly Ile
 305 310 315 320
 Thr Tyr Glu Asp Arg Pro Ser Lys Ala Pro Ser Phe Trp Tyr Lys Ile
 325 330 335
 Asp Pro Ser His Thr Gln Gly Tyr Arg Thr Val Gln Leu Val Trp Lys
 340 345 350

231

Thr Leu Pro Pro Phe Glu Ala Asn Gly Lys Ile Leu Asp Tyr Glu Val
 355 360 365
 Thr Leu Thr Arg Trp Lys Ser His Leu Gln Asn Tyr Thr Val Asn Ala
 370 375 380
 Thr Lys Leu Thr Val Asn Leu Thr Asn Asp Arg Tyr Leu Ala Thr Leu
 385 390 395 400
 Thr Val Arg Asn Leu Val Gly Lys Ser Asp Ala Ala Val Leu Thr Ile
 405 410 415
 Pro Ala Cys Asp Phe Gln Ala Thr His Pro Val Met Asp Leu Lys Ala
 420 425 430
 Phe Pro Lys Asp Asn Met Leu Trp Val Glu Trp Thr Thr Pro Arg Glu
 435 440 445
 Ser Val Lys Lys Tyr Ile Leu Glu Trp Cys Val Leu Ser Asp Lys Ala
 450 455 460
 Pro Cys Ile Thr Asp Trp Gln Gln Glu Asp Gly Thr Val His Arg Thr
 465 470 475 480
 Tyr Leu Arg Gly Asn Leu Ala Glu Ser Lys Cys Tyr Leu Ile Thr Val
 485 490 495
 Thr Pro Val Tyr Ala Asp Gly Pro Gly Ser Pro Glu Ser Ile Lys Ala
 500 505 510
 Tyr Leu Lys Gln Ala Pro Pro Ser Lys Gly Pro Thr Val Arg Thr Lys
 515 520 525
 Lys Val Gly Lys Asn Glu Ala Val Leu Glu Trp Asp Gln Leu Pro Val
 530 535 540
 Asp Val Gln Asn Gly Phe Ile Arg Asn Tyr Thr Ile Phe Tyr Arg Thr
 545 550 555 560
 Ile Ile Gly Asn Glu Thr Ala Val Asn Val Asp Ser Ser His Thr Glu
 565 570 575
 Tyr Thr Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Thr Leu Tyr Met Val Arg Met
 580 585 590
 Ala Ala Tyr Thr Asp Glu Gly Gly Lys Asp Gly Pro Glu Phe Thr Phe
 595 600 605
 Thr Thr Pro Lys Phe Ala Gln Gly Glu Ile Glu Ala Ile Val Val Pro
 610 615 620

232

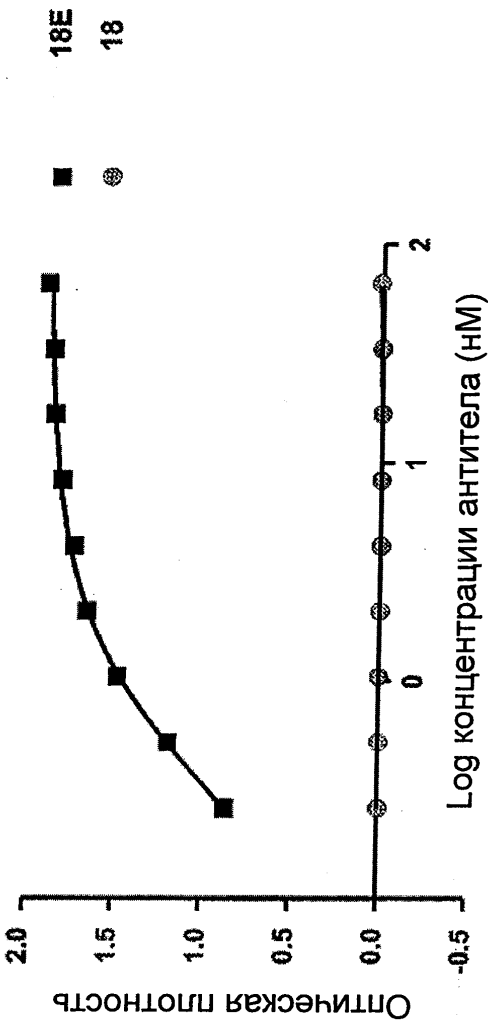
Val Cys Leu Ala Phe Leu Leu Thr Thr Leu Leu Gly Val Leu Phe Cys
 625 630 635 640
 Phe Asn Lys Arg Asp Leu Ile Lys Lys His Ile Trp Pro Asn Val Pro
 645 650 655
 Asp Pro Ser Lys Ser His Ile Ala Gln Trp Ser Pro His Thr Pro Pro
 660 665 670
 Arg His Asn Phe Asn Ser Lys Asp Gln Met Tyr Ser Asp Gly Asn Phe
 675 680 685
 Thr Asp Val Ser Val Val Glu Ile Glu Ala Asn Asp Lys Lys Pro Phe
 690 695 700
 Pro Glu Asp Leu Lys Ser Leu Asp Leu Phe Lys Lys Glu Lys Ile Asn
 705 710 715 720
 Thr Glu Gly His Ser Ser Gly Ile Gly Gly Ser Ser Cys Met Ser Ser
 725 730 735
 Ser Arg Pro Ser Ile Ser Ser Ser Asp Glu Asn Glu Ser Ser Gln Asn
 740 745 750
 Thr Ser Ser Thr Val Gln Tyr Ser Thr Val Val His Ser Gly Tyr Arg
 755 760 765
 His Gln Val Pro Ser Val Gln Val Phe Ser Arg Ser Glu Ser Thr Gln
 770 775 780
 Pro Leu Leu Asp Ser Glu Glu Arg Pro Glu Asp Leu Gln Leu Val Asp
 785 790 795 800
 His Val Asp Gly Gly Asp Gly Ile Leu Pro Arg Gln Gln Tyr Phe Lys
 805 810 815
 Gln Asn Cys Ser Gln His Glu Ser Ser Pro Asp Ile Ser His Phe Glu
 820 825 830
 Arg Ser Lys Gln Val Ser Ser Val Asn Glu Glu Asp Phe Val Arg Leu
 835 840 845
 Lys Gln Gln Ile Ser Asp His Ile Ser Gln Ser Cys Gly Ser Gly Gln
 850 855 860
 Met Lys Met Phe Gln Glu Val Ser Ala Ala Asp Ala Phe Gly Pro Gly
 865 870 875 880
 Thr Glu Gly Gln Val Glu Arg Phe Glu Thr Val Gly Met Glu Ala Ala
 885 890 895

233

Thr	Asp	Glu	Gly	Met	Pro	Lys	Ser	Tyr	Leu	Pro	Gln	Thr	Val	Arg	Gln
			900					905					910		

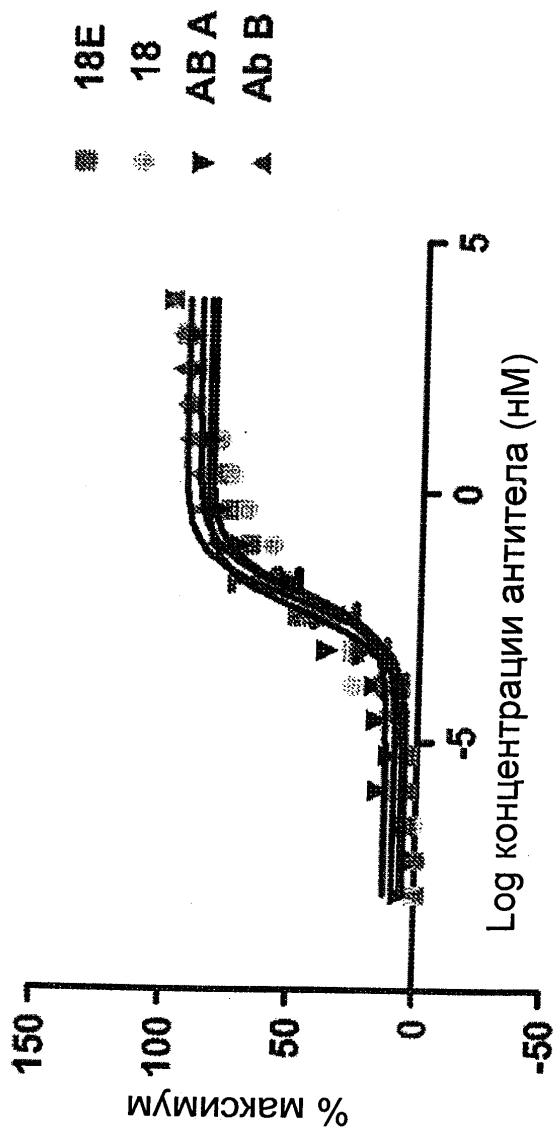
Gly	Gly	Tyr	Met	Pro	Gln
		915			

1/18



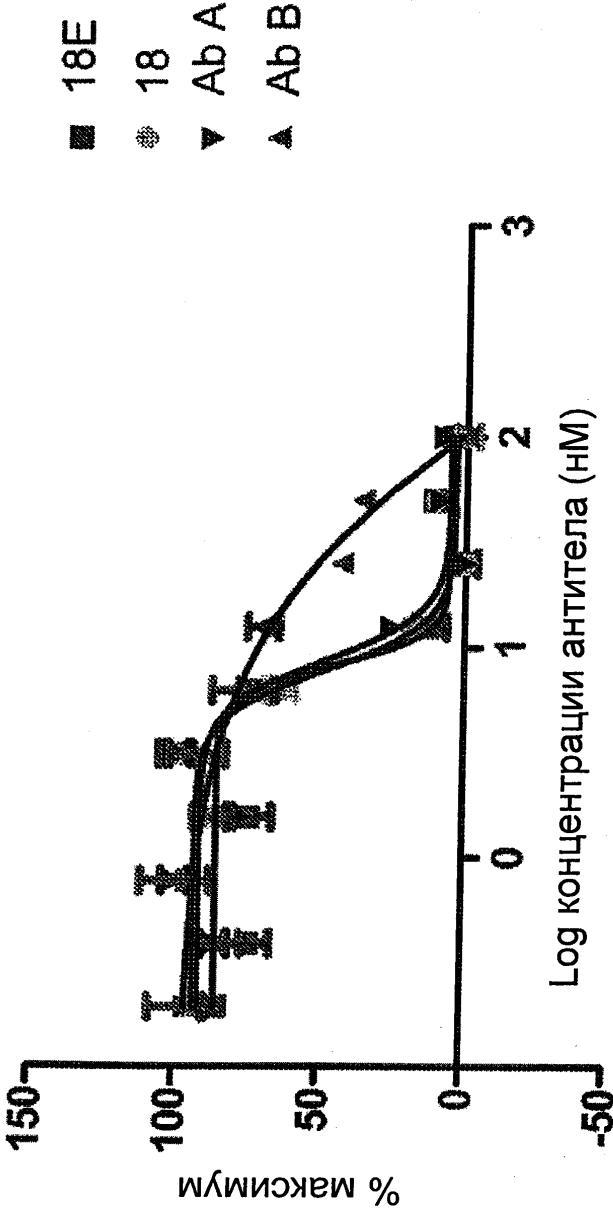
Фигура 1

2/18



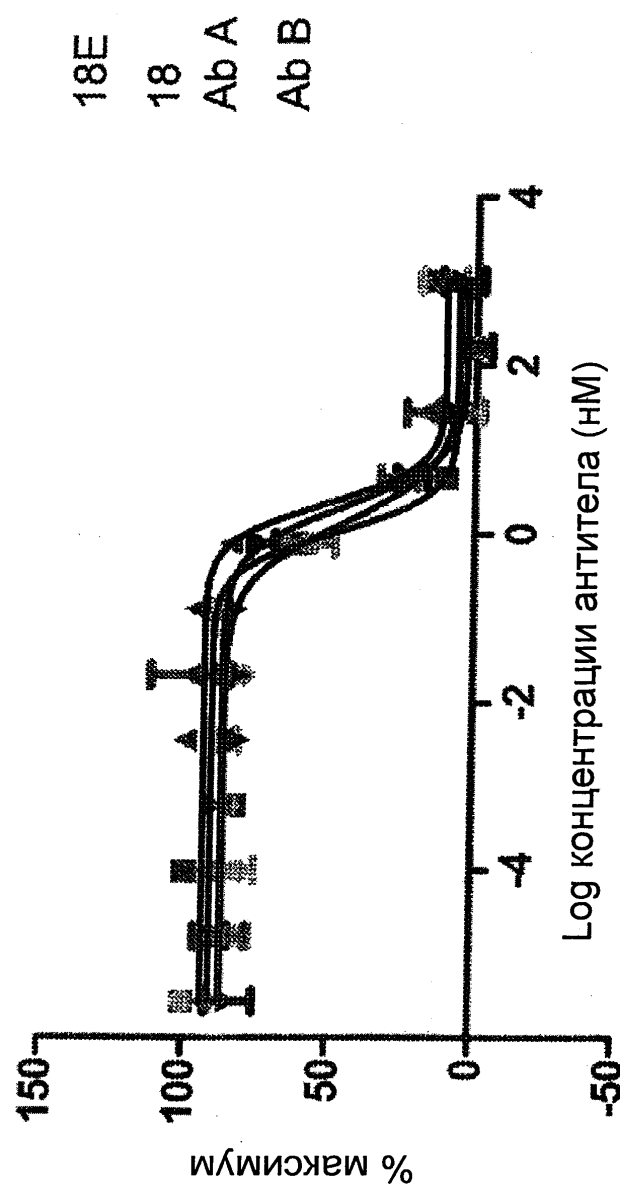
Фигура 2

3/18



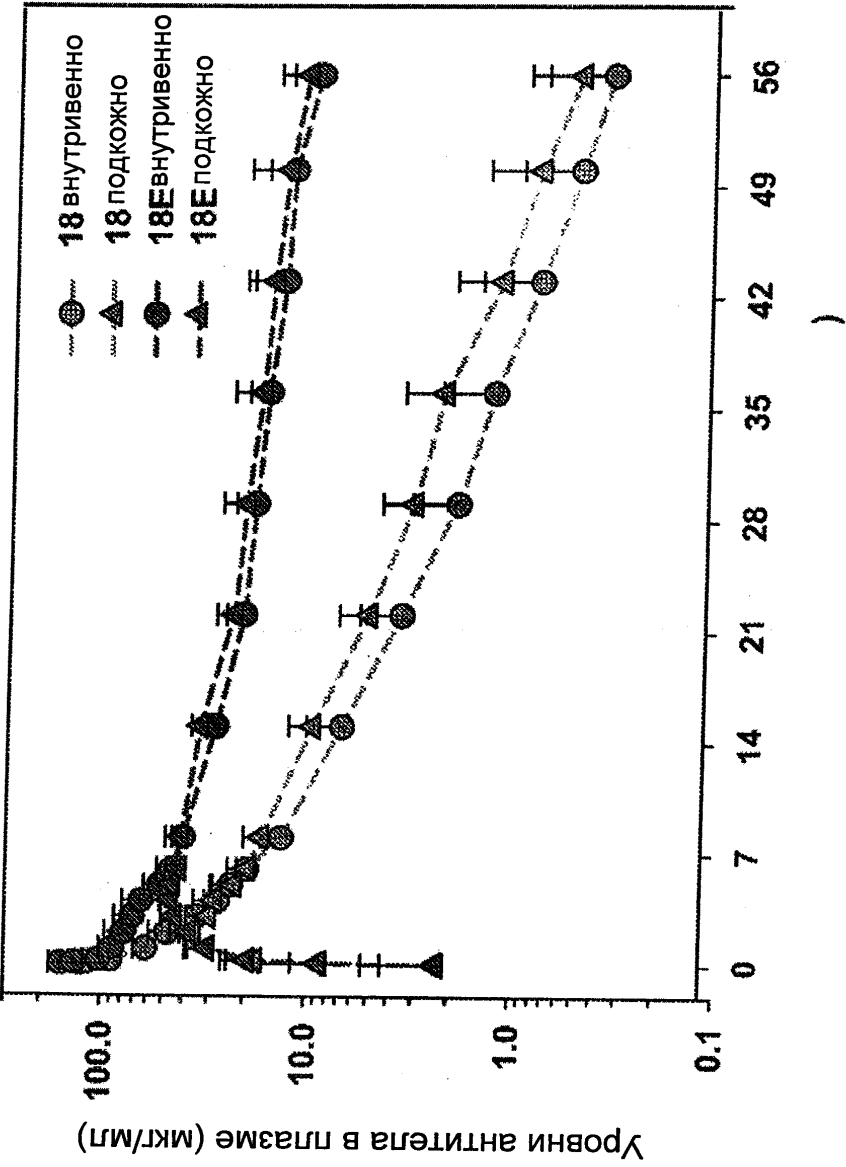
Фигура 3

4/18



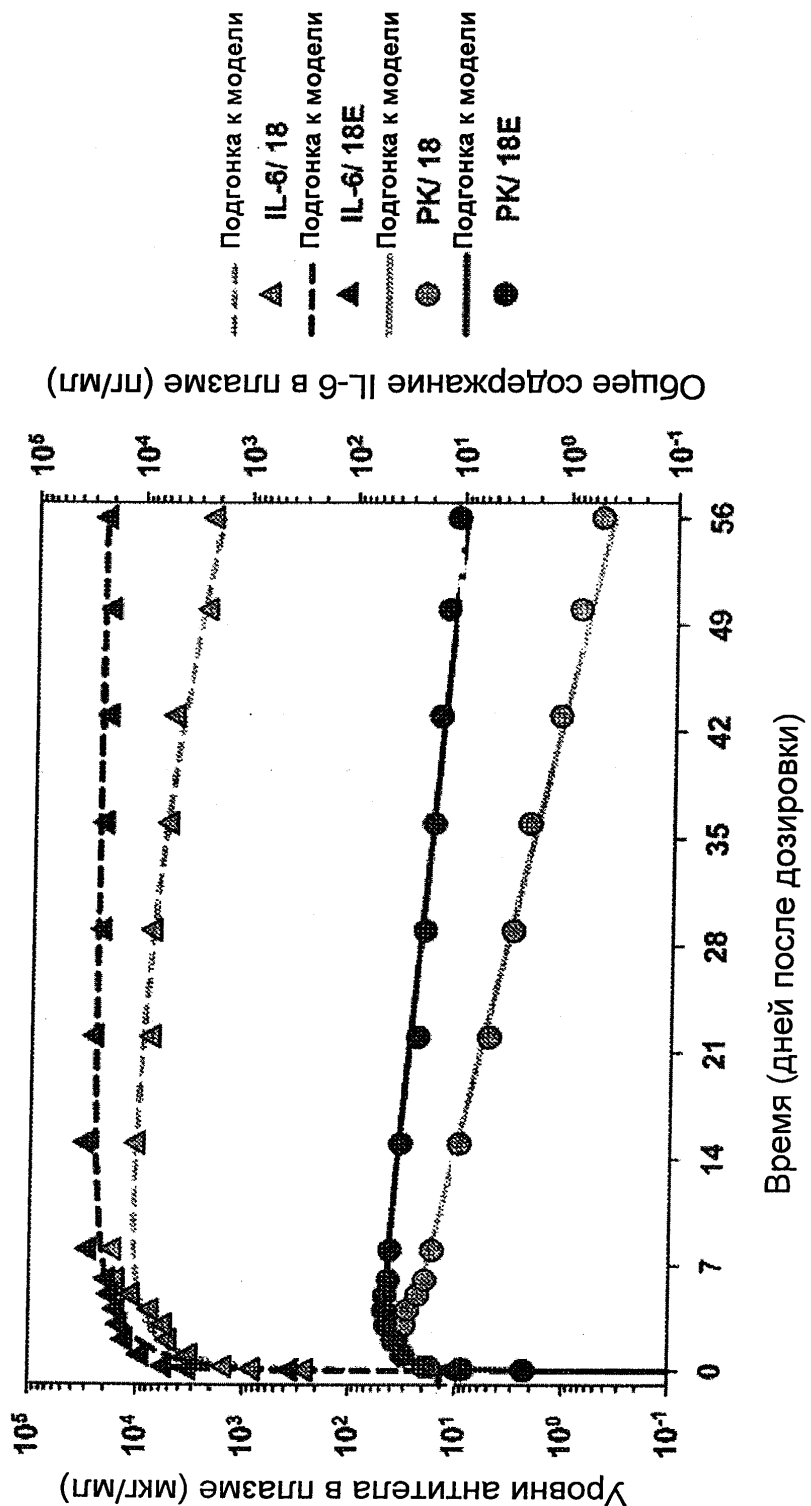
Фигура 4

5/18



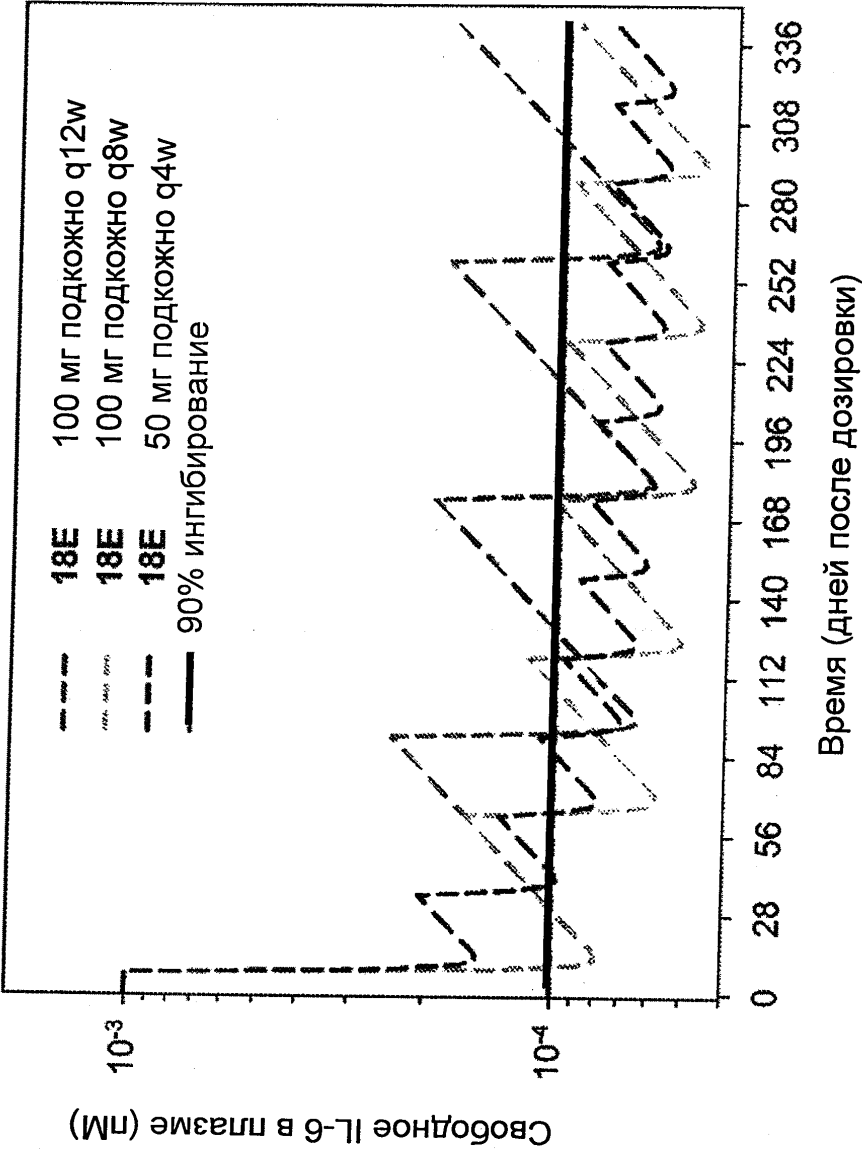
Фигура 5

6/18



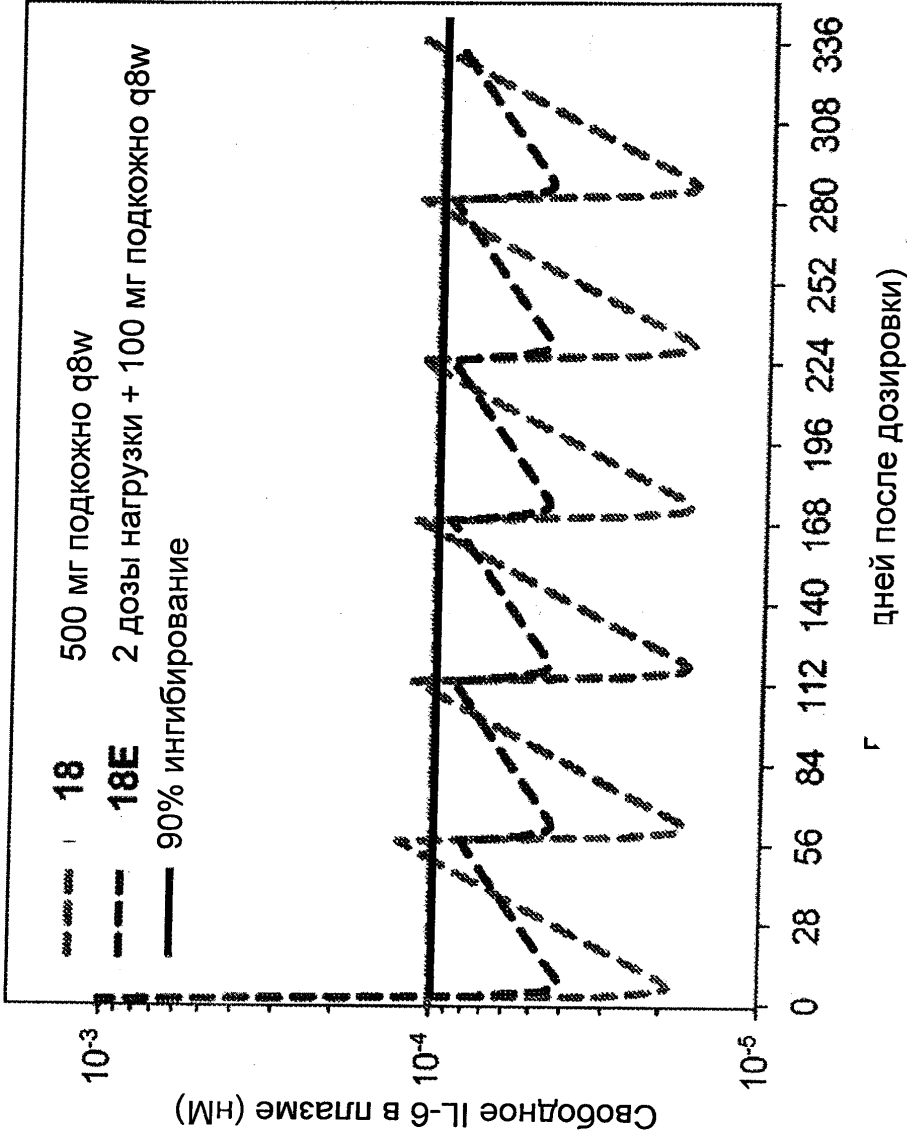
Фигура 6

7/18



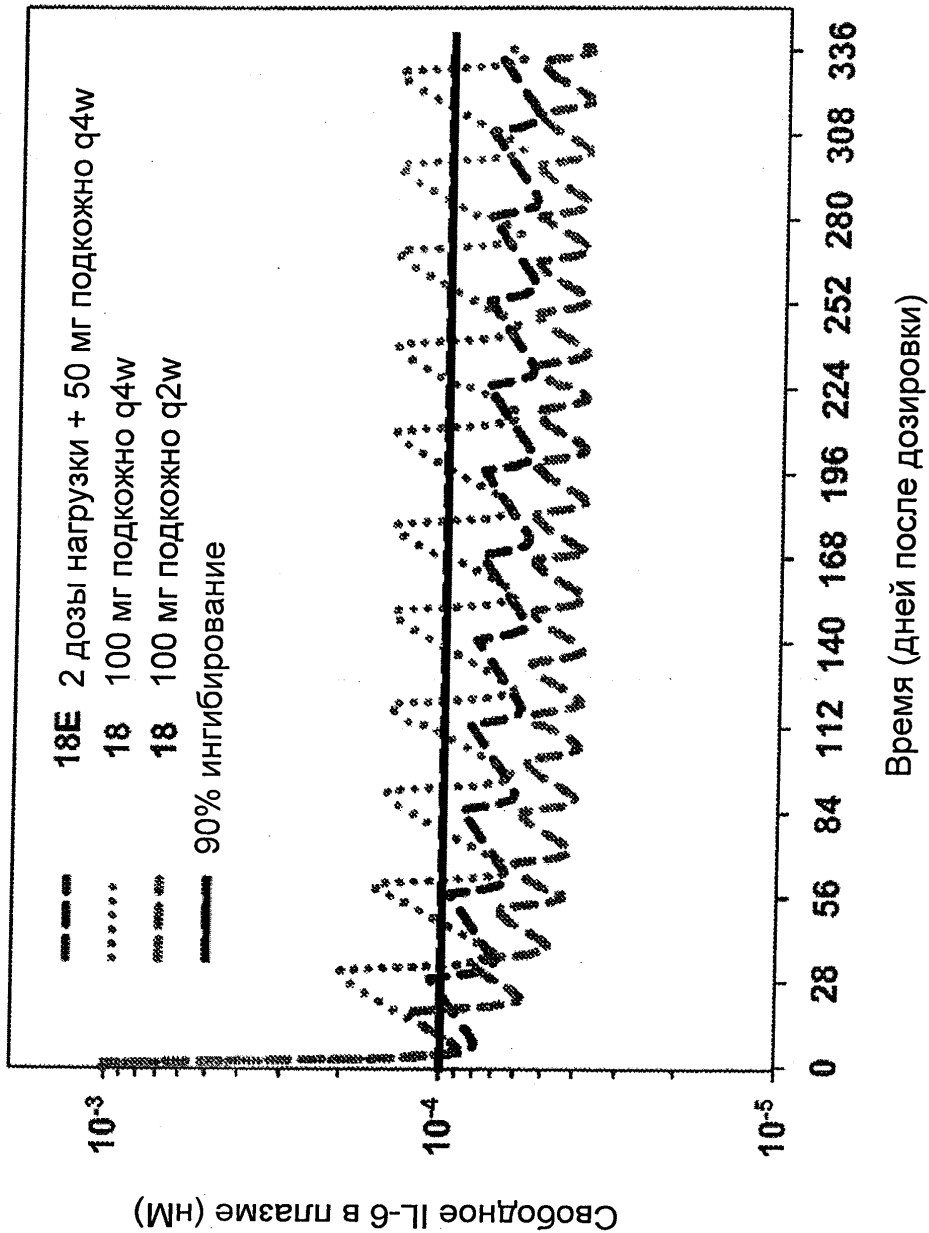
Фигура 7

8/18



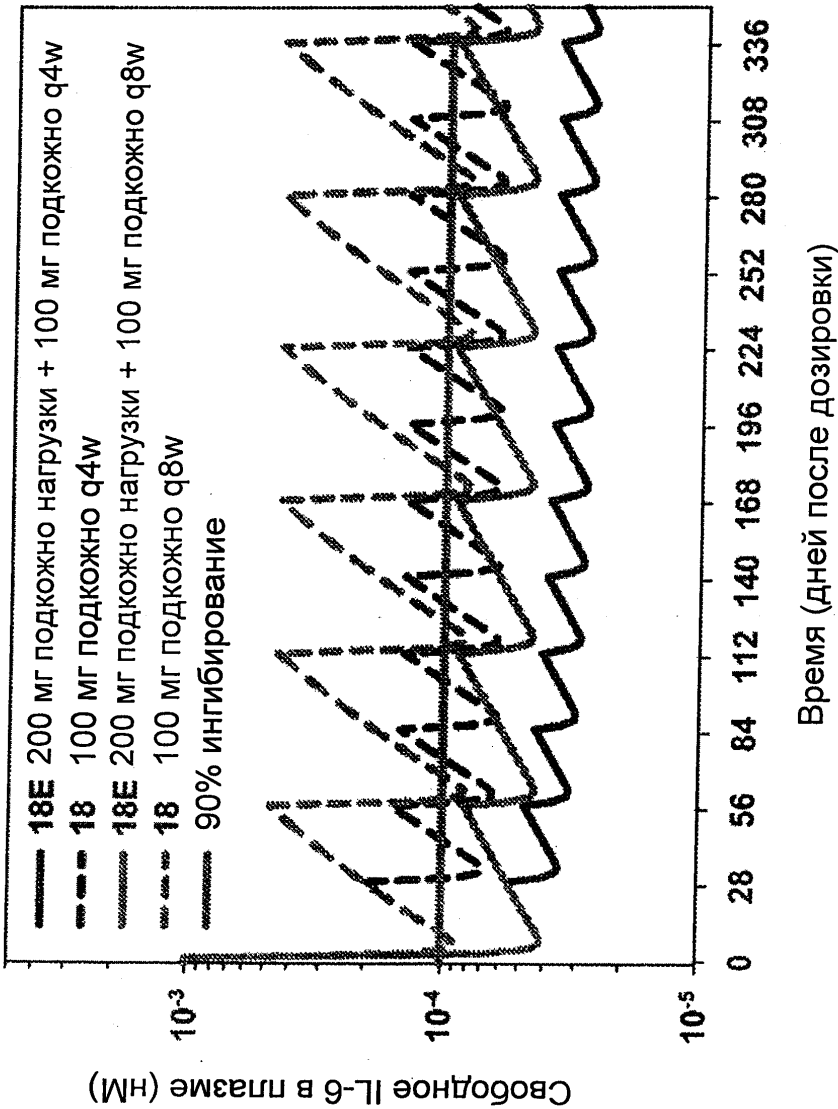
Фигура 8

9/18



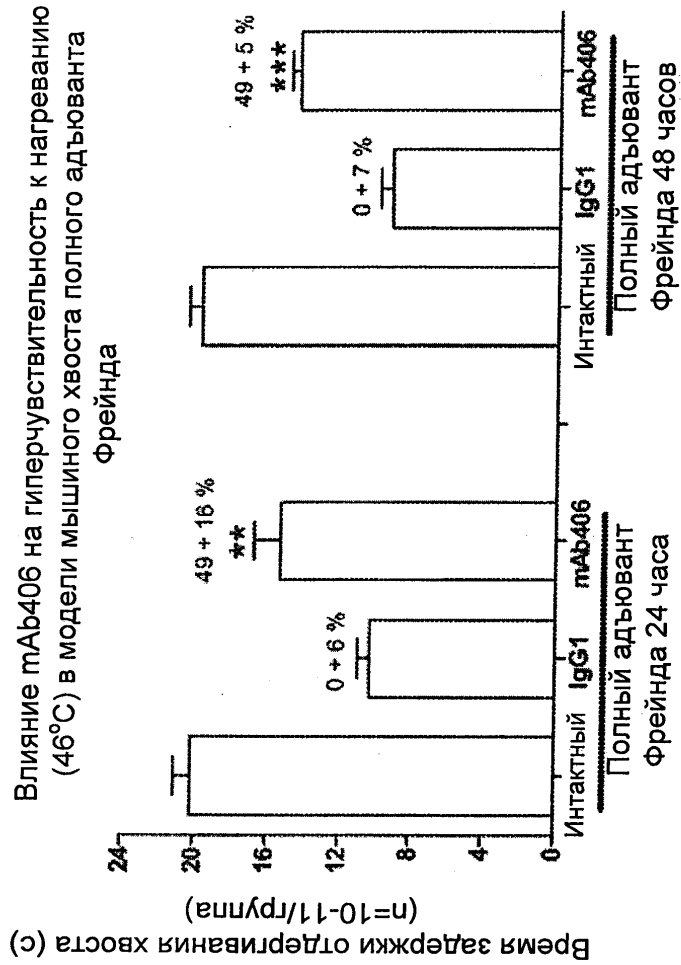
Фигура 9

10/18



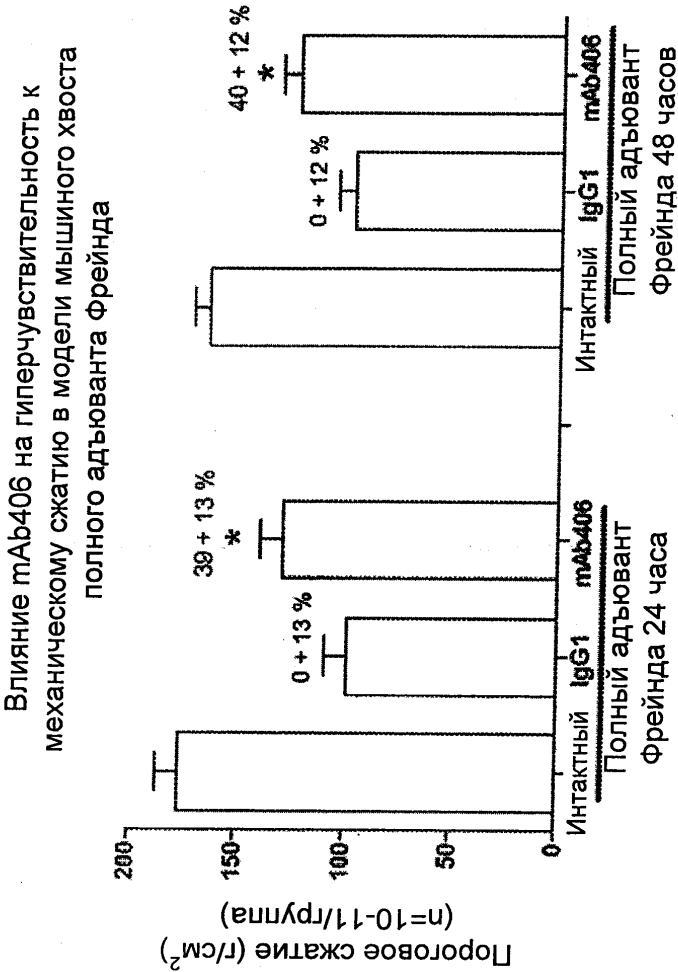
Фигура 10

11/18



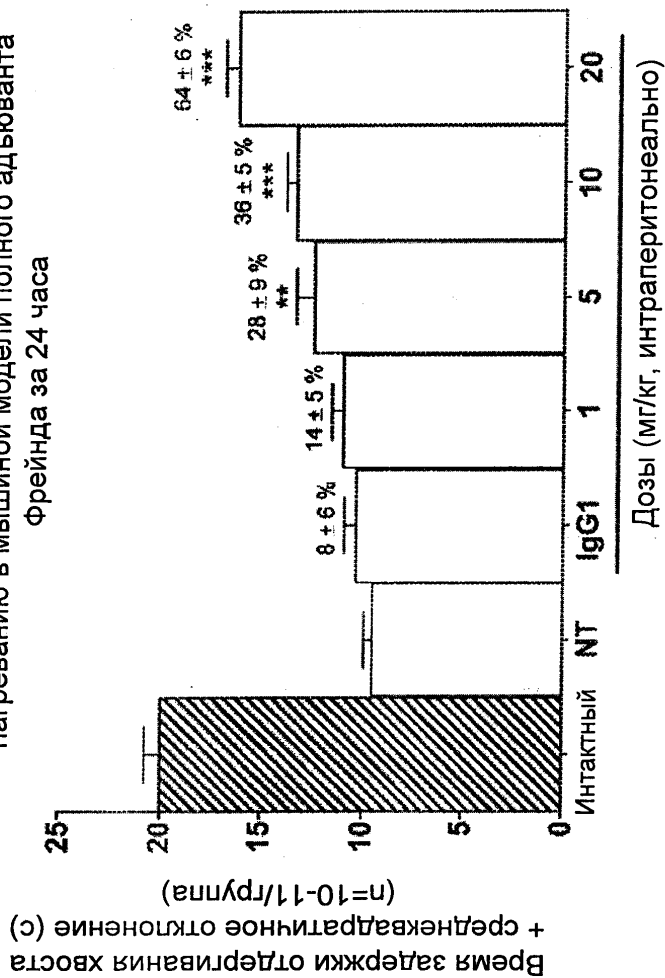
Фигура 11

12/18



Фигура 12

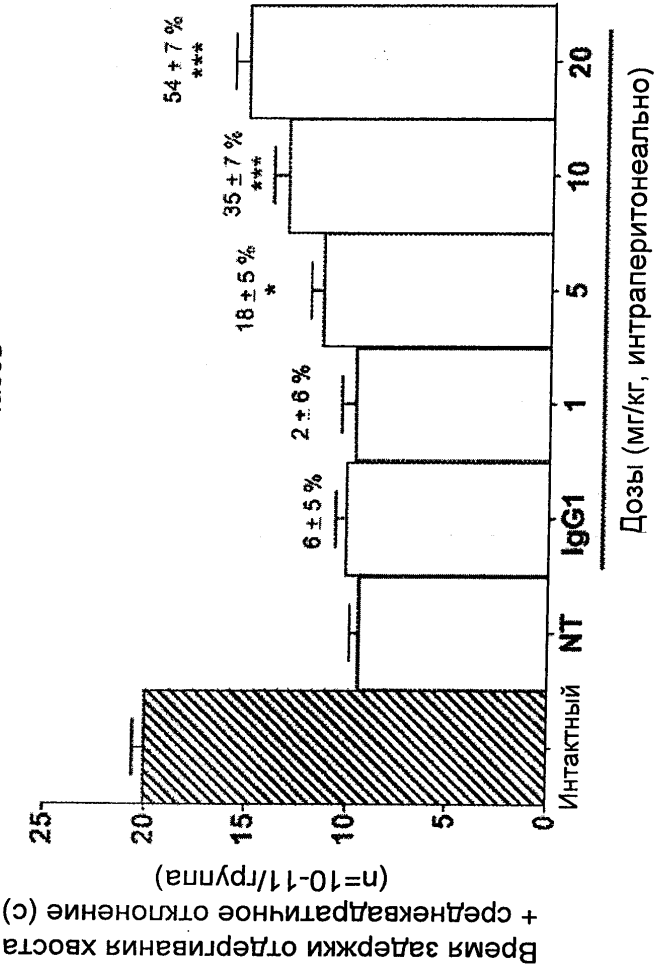
Влияние mAb406 на гиперчувствительность к
нагреванию в мышинной модели полного адьюванта
Фрейнда за 24 часа



Фигура 13

14/18

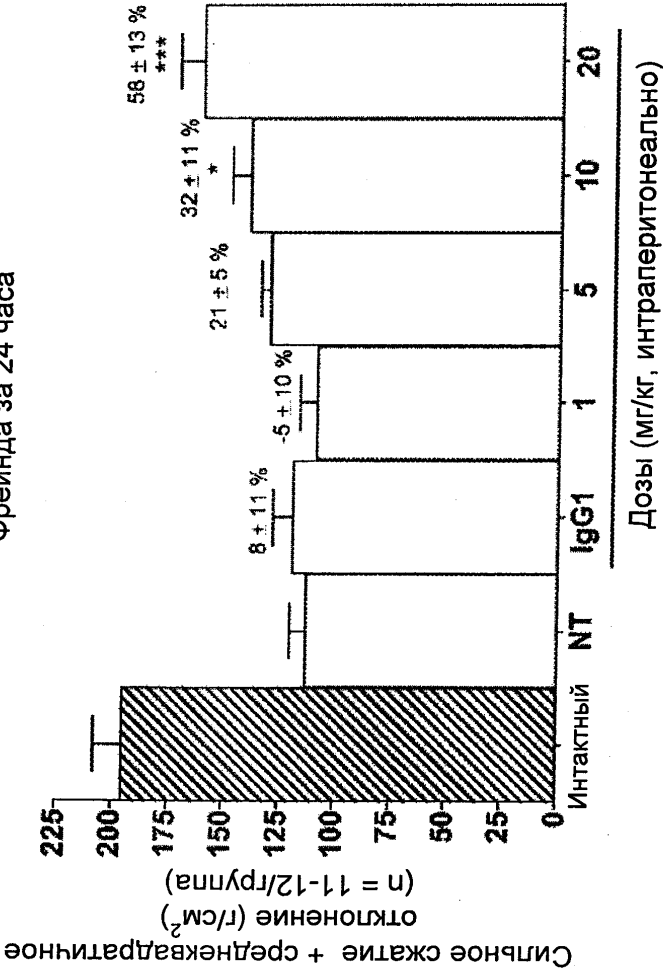
Влияние mAb406 на гиперчувствительность к нагреванию
в мышинной модели полного адьюванта Фрейнда за 48
часов



Фигура 14

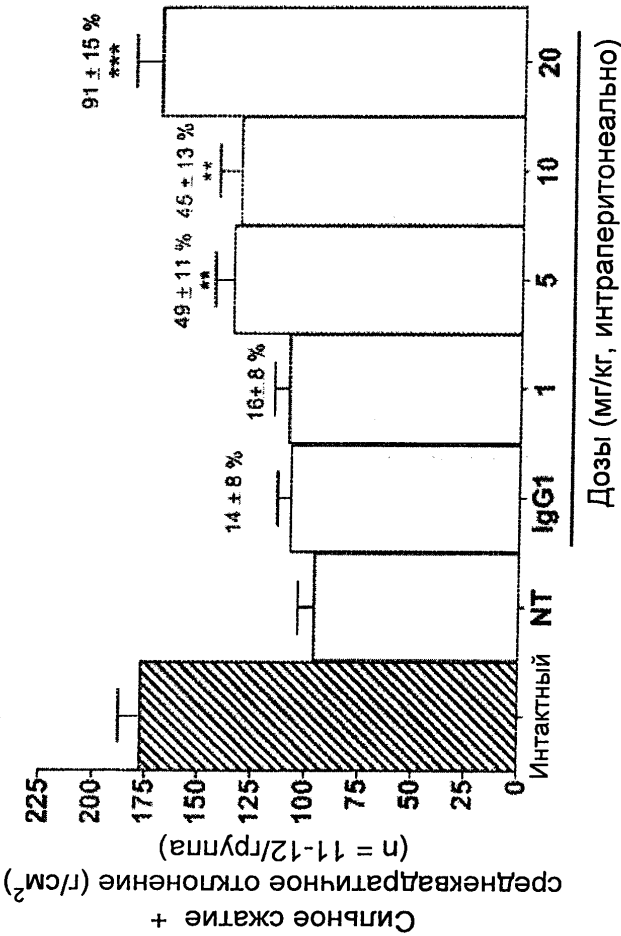
15/18

Зависимое от дозы влияние mAb406 на гиперчувствительность к механическому сжатию в мышечной модели полного адьюванта Фрейнда за 24 часа

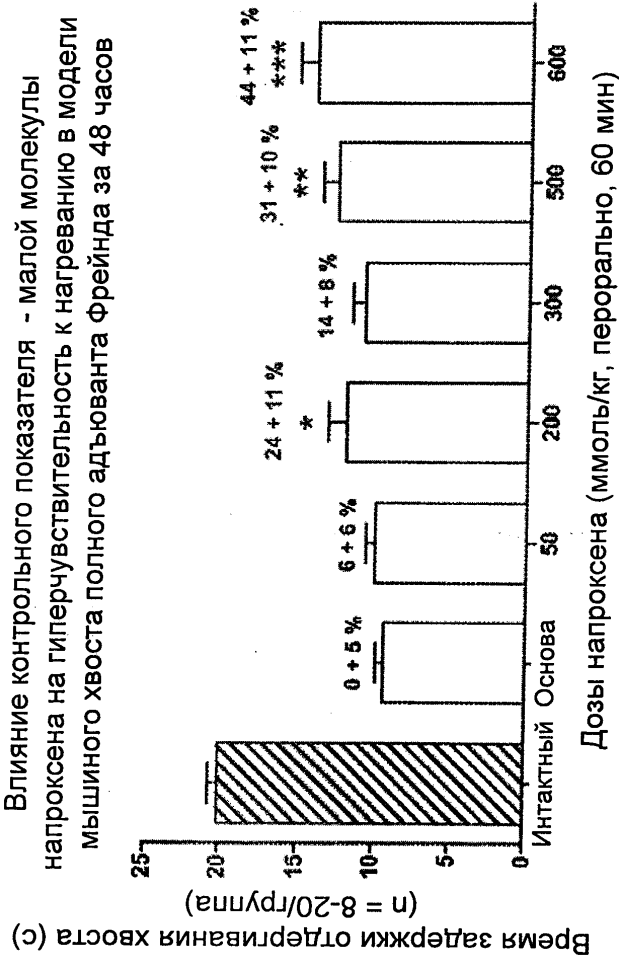


Фигура 15

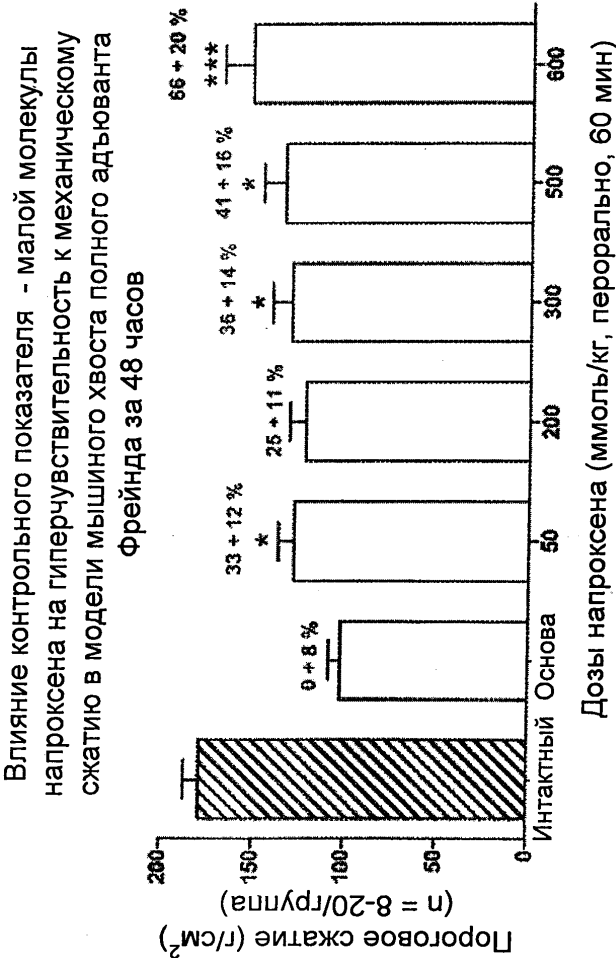
Зависимое от дозы влияние mAb406 на гиперчувствительность к
механическому сжатию в мышинной модели полного адьюванта Фрейнда за
48 часов



Фигура 16



Фигура 17



Фигура 18